

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

Einfluss apoptotischer Zellen auf die Funktionen neutrophiler Granulozyten

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

– Aus der medizinischen Fakultät –

vorgelegt von

Christian Idel

aus Hamburg

Lübeck 2010

1. Berichtersteller: Prof. Dr. (Univ. Budapest) Tamás Laskay

2. Berichtersteller: Priv.-Doz. Dr. med. Christoph Frohn

Tag der mündlichen Prüfung: 13.09.2010

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 13.09.2010

„Tja mein Junge, von nichts kommt nun mal auch nichts.“

Für meine Großmutter Hermine Idel (30.11.1919 - 14.03.2006)

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
EINLEITUNG	1 -
1.1. Granulozyten in der Entzündungsreaktion	1 -
1.2. Neutrophile Granulozyten	1 -
1.2.1. Lebenszyklus der PMN	1 -
1.2.2. Zytokinfreisetzung durch neutrophile Granulozyten	3 -
1.2.3. Phagozytose.....	4 -
1.2.4. Antimikrobielle Funktionen	5 -
1.2.5. Zelltod	6 -
1.3. Abräumung apoptotischer Zellen und deren immunmodulatorischen Effekte	9 -
1.4. Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN.....	16 -
2. FRAGESTELLUNG	18 -
3. MATERIALIEN UND METHODEN.....	19 -
3.1. Materiallisten.....	19 -
3.1.1. Laborverbrauchsmaterialien	19 -
3.1.2. Chemikalien	20 -
3.1.3. ELISA-Sets	21 -
3.1.4. Geräte	21 -
3.1.5. Kulturmedien und Puffer	22 -
3.1.6. Software.....	22 -
3.2. Methodik	22 -
3.2.1. Gewinnung von neutrophilen Granulozyten aus peripherenvenösem humanen Vollblut	22 -
3.2.2. Gewinnung von humanem Serum	24 -
3.2.3. Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer.....	24 -
3.2.4. Herstellung von Zytopsin-Präparaten und Färbung nach Giemsa.....	24 -
3.2.5. Apoptose-Induktion in neutrophilen Granulozyten durch UV-Bestrahlung ...	25 -
3.2.6. Apoptose-Nachweismethoden.....	25 -

3.2.7.	Zellfärbung mit PKH-Farbstoffen.....	26 -
3.2.8.	Phagozytose apoptotischer PMN durch nicht-apoptotische PMN.....	26 -
3.2.9.	<i>In vitro</i> Kultur von isolierten humanen PMN.....	27 -
3.2.10.	Messung reaktiver Sauerstoff-Radikale.....	27 -
3.2.11.	Zytokin-Nachweis in Zellkultur-Überständen.....	28 -
3.2.12.	Inkubation apoptotischer und nicht-apoptotischer PMN in C1q-defizientem Serum.....	29 -
3.2.13.	Fluoreszenzmikroskopie.....	29 -
3.2.14.	Durchflusszytometrie.....	30 -
3.2.15.	Statistische Bearbeitung.....	31 -
4.	ERGEBNISSE.....	32 -
4.1.	Vorversuche.....	32 -
4.1.1.	Reinheit der neutrophilen Granulozyten.....	32 -
4.1.2.	Reinheit der apoptotischen Zellen.....	33 -
4.1.3.	Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN.....	34 -
4.2.	Apoptotische Zellen senken die Produktion von Sauerstoffradikalen in PMN.....	36 -
4.3.	Wirkung von apoptotischen Zellen auf die Zytokin-Freisetzung durch PMN.....	39 -
4.3.1.	Verminderte IP-10-Sekretion durch Co-Kultur mit apoptotischen PMN.....	40 -
4.3.2.	Gesteigerte IL-8-Sekretion durch Co-Kultur mit apoptotischen PMN.....	43 -
4.4.	Verminderte Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN in C1q-defizientem Serum.....	46 -
5.	DISKUSSION.....	49 -
5.1.	Verminderte Bildung reaktiver Sauerstoffradikale in PMN durch den Kontakt mit apoptotischen Zellen.....	50 -
5.2.	Veränderungen der Zytokinsekretion durch Co-Kultur apoptotischer und nicht-apoptotischer PMN.....	54 -
5.2.1.	Verminderte IP-10-Sekretion von PMN durch Co-Kultur mit apoptotischen Zellen.....	54 -
5.2.2.	Gesteigerte IL-8-Sekretion von PMN durch Co-Kultur mit apoptotischen Zellen.....	55 -
5.2.3.	Verminderte TNF- α - Sekretion von PMN durch Co-Kultur mit apoptotischen Zellen, keine Sekretion von IL-10 und TGF- β	58 -
5.3.	Verminderte Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN bei Fehlen von C1q.....	59 -
6.	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK.....	61 -

7.	ZUSAMMENFASSUNG	- 64 -
8.	LITERATURVERZEICHNIS.....	- 65 -
9.	DANKSAGUNGEN	- 77 -
10.	LEBENS LAUF.....	- 79 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Rezeptoren und Moleküle zur Erkennung apoptotischer Zellen.	13 -
Abbildung 2: Phagozytose eines apoptotischen Granulozyten durch einen PMN.	16 -
Abbildung 3: Isolierung von Granulozyten aus Vollblut.	23 -
Abbildung 4: Apoptotische und nicht-apoptotische PMN gefärbt nach Giemsa.	33 -
Abbildung 5: Annexin-V-Färbung zur Unterscheidung zwischen apoptotischen und nicht-apoptotischen PMN.	34 -
Abbildung 6: FACS-Analyse der Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN.	35 -
Abbildung 7: Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN.	36 -
Abbildung 8: FACS-Analyse zur Sauerstoffradikal-Produktion in PMN.	38 -
Abbildung 9: IP-10-Freisetzung durch PMN in der An- und Abwesenheit von apoptotischen Zellen in der Serum-Kultur.	41 -
Abbildung 10: Statistische Darstellung der Ergebnisse der IP-10-Elisa-Versuche mit humanem Serum.	42 -
Abbildung 11: IP-10-Freisetzung durch PMN in der An- und Abwesenheit von apoptotischen Zellen ohne Serum.	43 -
Abbildung 12: IL-8-Freisetzung durch PMN in der An- und Abwesenheit von apoptotischen Zellen in der Serum-Kultur.	44 -
Abbildung 13: Statistische Darstellung der Ergebnisse der IL-8-Elisa-Versuche mit humanem Serum.	45 -
Abbildung 14: IL-8-Freisetzung durch PMN in der An- und Abwesenheit von apoptotischen Zellen ohne Serum.	46 -
Abbildung 15: FACS-Analyse zum Einfluss von C1q auf die Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN.	47 -

Abkürzungsverzeichnis

Bp	Basenpaare
BPI	Bactericidal permeability increasing protein
BSA	Bovine serum albumine
C1q	Spaltprodukt q des Komplementfaktor 1
cC1qR	Rezeptor für die Kollagen-Domäne von C1q
C3	Komplementfaktor 3
Ca ²⁺	Kalzium ²⁺
CaCl ₂	Kalziumchlorid
Caspasen	Cystein-Aspartat-spezifische Proteasen
CD	Cluster of differentiation
CINC-1	Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant-1
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CR	Complement Receptor
CRT	Calreticulin
CXCCL-12	CXC-Chemokine Ligand 12
DHR	Dihydrorhodamin 123
DNA	Desoxribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
FACS	Fluorescence activated cell sorter
Fc	kristalisierbares Fragment von Antikörpern
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
fMLP	Formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin
FSC	Forward scatter
G-CSF	Granulocyte-colony-stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor
GULP	engulfment adapter protein
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure]

HO ⁻	Hydroxid-Ionen
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IP-10	Interferon- γ -Inducible Protein-10
KC	Keratinocyte-derived chemokine
LOX-1	Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1
LPS	Lipopolysaccharid
LRP	LDL-receptor-related protein
mAb	Monoclonal antibody
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP-1	Monocyte-Chemoattractant Protein-1
MIP-2	Makrophagen-Inflammatorisches Protein 2
n. d.	nicht detektierbar
NET	Neutrophil extracellular traps
NK-Zellen	Natürliche-Killer-Zellen
NO	Stickstoffoxid
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PMN	Polymorphonukleäre neutrophile Granulozyten
RAC-1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SLPI	Sekretorischer Leukoproteinase Inhibitor
SR-A	Klasse A Makrophagen Scavenger Rezeptor
SR-BI	Klasse B Scavenger Rezeptor Typ I
SSC	Sideward scatter
TGF- β	Transforming-growth-factor β
Th1 Zellen	T-Helferzellen vom Typ 1
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TNF	Tumornekrose-Faktor
UV	ultraviolett
Vav3	Vav3 guanine nucleotide exchange factor

Einleitung

1.1. Granulozyten in der Entzündungsreaktion

Bei einer Entzündung im menschlichen Körper kommt es in der frühen Phase zum Einstrom von Leukozyten aus der Blutbahn in das entzündete Gewebe. Die größte Subpopulation bilden dabei neutrophile Granulozyten (PMN). (Schleimer et al., 1989). Sie folgen verschiedenen Botenstoffen, die chemotaktisch wirken (Spertini et al., 1991; Gillitzer et al., 2001). Erst verzögert kommt es zum Einstrom anderer Zellen des Immunsystems, wie zum Beispiel den Monozyten/Makrophagen. Im Rahmen der Entzündung gehen die PMN in den kontrollierten Zelltod, die so genannte Apoptose (Savill et al., 1995). Sie müssen anschließend entfernt werden, damit Ihre Proteasen und reaktiven Sauerstoffverbindungen nicht unkontrolliert freigesetzt werden und zu einer Gewebsschädigung führen (Henson et al., 1987; Savill et al., 1989).

1.2. Neutrophile Granulozyten

1.2.1. Lebenszyklus der PMN

Die PMN entstehen im Knochenmark in sechs Stufen: Myeloblast => Pro-Myelozyt => Myelozyt => Metamyelozyt => stabkerniger neutrophiler Granulozyt => segmentkerniger neutrophiler Granulozyt. Diese Entwicklung benötigt ca. 14 Tage. Die reife Zelle wird im Knochenmark gespeichert und kann bei Bedarf in die Blutbahn abgegeben werden. Die Entwicklung der PMN im Knochenmark und die anschließende Abgabe in die Blutbahn unterliegt komplizierten Regelkreisen, um die Homöostase aufrecht zu erhalten. Nur ca. 10 % befinden sich tatsächlich im zirkulierenden Blut, wobei selbst davon ca. die Hälfte als „marginaler Pool“ am Gefäßendothel haftet. Im Knochenmark ruhen ca. 90% aller PMN im menschlichen Körper, die bei Bedarf mobilisiert werden können (Athens et al., 1961; Holland et al., 2003). Eine entscheidende Rolle bei der Homöostase und der Mobilisierung spielt der Granulozyten-Kolonie-stimulierende-Faktor (G-CSF). G-CSF unterdrückt zum einen die Expression von CXC-Chemokine Ligand 12 (CXCL-12) auf den Stromazellen im Knochenmark, welches am Zurückhalten der PMN im Knochenmark beteiligt ist; zum anderen regt es die Progenitorzellen zur Proliferation an (Semerad et al., 2002). G-CSF

stimuliert die PMN im Knochenmark zur Sezernierung von Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9). Diese bewirkt die Freisetzung von löslichem KIT-Ligand, welcher an der Mobilisation der haematopoetischen Stammzellen im Knochenmark beteiligt ist (Heissig et al., 2002).

Nach der Freisetzung aus dem Knochenmark verbleiben die PMN entweder für ihren Lebenszyklus in der Blutbahn und werden nach Erreichen der natürlichen Lebensspanne (ca. 10 h im peripheren Blut) in Knochenmark, Milz und Leber abgebaut, oder sie wandern bei Bedarf im Rahmen einer Entzündung ins Gewebe ein und erfüllen ihre Funktionen unter anderem als Phagozyten (Bainton et al., 1971). Sind die PMN einmal von der Blutbahn ins Gewebe eingewandert, kehren sie nicht zurück in die Blutzirkulation, sondern sie gehen im Gewebe in die Apoptose und werden von anderen Phagozyten abgeräumt. Diese Einwanderung von PMN ins Gewebe im Rahmen einer Entzündung geschieht durch chemotaktisch wirkende Zytokine, wie z.B. Interleukin-8 (IL-8), welches von Epithel-Zellen und PMN selber freigesetzt wird (Witko-Sarsat et al., 2000). Eine erst kürzlich beschriebene Zellpopulation, welche ebenfalls eine sehr wichtige Rolle für die Aktivierung von PMN und für deren Einwanderung in das Gewebe im Rahmen der akuten Entzündung spielt, sind die sogenannten Th17-Zellen. Es handelt sich dabei um einen Subtyp der CD4⁺ T-Helferzellen, welche durch den Einfluss von IL-23 aus Dendritischen Zellen verstärkt IL-17 freisetzen. Dieses IL-17 führt zu einer Aktivierung von Makrophagen und PMN im Rahmen der akuten Entzündung und bewirkt deren verstärkte Einwanderung in das Gewebe (Mills, 2008).

Neutrophile Granulozyten stellen die mit Abstand größte Gruppe der Leukozyten dar. Die Konzentration der Leukozyten im humanen Blut beträgt unter physiologischen Bedingungen 4 000-10 000/ μ l. Davon sind ca. 50-70 % segmentkernige neutrophile Granulozyten und 3-5 % stabkernige neutrophile Granulozyten. Die segmentkernigen PMN sind die adulten Zellen und die stabkernigen PMN die jugendlichen Zellen. Der Anteil an stabkernigen PMN steigt z. B. während einer Infektionskrankheit an, da es zu einem erhöhten Zellumsatz von PMN kommt (Holland et al., 2003).

Die PMN haben außerhalb des Knochenmarks nur eine sehr kurze Lebensdauer. Sie zirkulieren einige Stunden im Blut und überleben dort nur ca. 10 Stunden. Im Gewebe können Sie nach der Einwanderung jedoch 1-2 Tage überleben (Bainton et al., 1971). Die Lebensdauer der PMN kann durch verschiedene pro-entzündliche Zytokine verlängert werden, wie z. B. Granulozyten-Macrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor (GM-CSF) und IL-8 (Hofman, 2004).

1.2.2. Zytokinfreisetzung durch neutrophile Granulozyten

Neben der Phagozytose ist die Produktion von Zytokinen eine sehr wichtige Funktion der neutrophilen Granulozyten. Mit diesen verschiedenen Botenstoffen nehmen die PMN Einfluss auf eine Entzündung und interagieren mit anderen Immunzellen (Scapini et al., 2000; Kasama et al., 2005; Kobayashi, 2008). Diese Botenstoffe lassen sich unterteilen in einerseits solche mit überwiegend pro-entzündlichen Eigenschaften und andererseits in solche mit eher anti-entzündlichen Eigenschaften.

Als wichtige Vertreter der pro-entzündlichen Botenstoffe sind hierbei das Zytokin Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und die CXC-Chemokine IL-8 und Interferon- γ -induziertes Protein-10 (IP-10) zu nennen. TNF- α ist ein pleiotrop wirkendes pro-entzündliches Zytokin. In adherenten PMN bewirkt es z. B. eine verstärkte Produktion und Freisetzung von Sauerstoffradikalen (Nathan, 2006).

PMN produzieren zum einen IL-8, zum anderen stellen sie auch eine der wichtigsten Zielzellen für IL-8 dar. Es wirkt chemotaktisch auf PMN, führt zu einer verstärkten Expression von Adhäsions-Molekülen an der Zelloberfläche, zu verstärkter Adhäsion an Endothelzellen, zu einer erhöhten Transmigration durch Endothelzellschichten, zu einer vermehrten Freisetzung von Granula-Enzymen und zu einer Erhöhung der Sauerstoff-Radikal-Produktion (Oppenheim et al., 1991; Baggiolini et al., 1994; Huber et al., 1991; Gaiet et al., 1998; Gillitzer et al., 2001). Daneben wirkt IL-8 aber auch auf andere Zellen wie z. B. basophile Granulozyten und T-Lymphozyten.

IP-10 ist ebenfalls ein pro-entzündliches Zytokin. Es wirkt wesentlich chemotaktisch auf T-Helferzellen vom Typ1 (Th1 Zellen) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen), um diese an den Ort der Entzündung zu locken (Proost et al., 2003).

Als klassische anti-entzündliche Botenstoffe, die durch PMN sezerniert werden, dienen als Beispiele IL-10 und Transforming-growth-factor β (TGF- β). Diese wirken allgemein auf Phagozyten, indem sie die Fähigkeiten zur Phagozytose und Abtötung von Erregern in Phagozyten vermindern (Zuba et al., 2004; Li et al., 2006). Dabei wirken beide über verschiedene Rezeptoren und Signalkaskaden. Die Wirkung von IL-10 wird dabei z.B. über STAT-3 vermittelt und TGF- β wirkt unter anderem über Smad2, Smad3 und Smad7 (Rossato et al., 2007; Murakami et al., 2009).

1.2.3. Phagozytose

Neutrophile Granulozyten sind die ersten Zellen, die während der Frühphase einer akuten Entzündung in infiziertes oder andersartig geschädigtes Gewebe einwandern (Gillitzer et al., 2001). Ihre Kernaufgabe ist die Bekämpfung von Fremdkörpern und „verfremdeten“ Zellen, was vornehmlich durch Phagozytose geschieht. Das bedeutet, dass PMN feste Partikel aufnehmen und abbauen können. Dabei handelt es sich um Mikroorganismen, Zellen oder Fremdkörper (Furze et al., 2008). Entscheidend ist dafür zunächst, dass diese Partikel durch PMN als „zur Phagozytose geeignet“ erkannt werden. Dazu müssen Rezeptoren auf den PMN bestehen, die die jeweiligen Partikel erkennen und binden.

Ersteres geschieht einerseits, indem die PMN die zu phagozytierenden Partikel direkt erkennen können. Auf der Oberfläche von PMN dienen dafür CD14 und Toll-Like-Rezeptoren (TLR) (Sabroe et al., 2002). Andererseits können extrazelluläre, körpereigene Stoffe, so genannte Opsonine, Partikel markieren und damit die Erkennung erleichtern. Als solche Opsonine dienen Antikörper, Komplementfaktoren und Akute-Phase-Proteine. Diese können nach der Bindung an die Partikel von den PMN durch zwei Typen von Opsoninrezeptoren erkannt werden: Für Partikel, die mit Komplementfaktoren opsoniert sind, haben PMN Komplementrezeptoren. Sind Partikel aber mit Antikörpern oder Akute-Phase-Proteinen opsoniert, binden PMN mit ihren Rezeptoren für das kristallisierbare Fragment von Antikörpern (Fc-Rezeptor) an sie. Von diesen beiden Rezeptorklassen exprimieren PMN des peripheren Blutes die Komplementrezeptoren CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) und CR4 (CD11c/CD18), sowie die Fc-Rezeptoren FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) und FcαR (CD89) (Witko-Sarsat et al., 2000).

Dass bei diesen verschiedenen Erkennungssystemen nicht nur „schwarz und weiß“ existiert, also Rezeptoren nur für die opsoninabhängige Erkennung und Rezeptoren nur für die opsoninunabhängige, macht der Komplementrezeptor CR3 (CD11b/CD18) deutlich. Es konnte gezeigt werden, dass er neben opsonierten Partikeln auch „nackte“ Streptokokken der Gruppe B direkt erkennen kann (Antal et al., 1992).

Die eigentliche Aufnahme geschieht, indem der jeweilige Partikel durch die Pseudopodien eines PMN umfasst wird und somit in einem mit einer Membran ummantelten Vesikel, dem Phagosom, in das Innere der Zelle gelangt. Dieses fusioniert intrazellulär mit dem Lysosom zum Phago-Lysosom, wodurch verschiedene reaktive Sauerstoffverbindungen, Enzyme und Peptide zum Abbau des Partikels in das Phagosom gelangen (siehe dazu Kapitel 1.2.4).

1.2.4. Antimikrobielle Funktionen

PMN haben verschiedene antimikrobiell wirksame Systeme: reaktive Sauerstoffradikale, antimikrobielle Proteine und Proteasen.

Bei den reaktiven Sauerstoffverbindungen handelt es sich hauptsächlich um Wasserstoffperoxid (H_2O_2), oxidierte Halogene und oxidierende Radikale. Die im Wesentlichen dafür verantwortlichen Enzyme sind NADPH-Oxidase, Myeloperoxidase und Superoxiddismutase, welche unter Sauerstoffverbrauch wirken. Die NADPH-Oxidase ist ein enzymatischer Komplex aus zytosolischen und Membran-gebundenen Bestandteilen und dient der Produktion von H_2O_2 über die Generierung von O_2^- . Dieses H_2O_2 kann durch die Myeloperoxidase zu halogenierten Oxidantien und anderen reaktiven Zwischenstufen verändert und somit in seinem toxischen Potential gesteigert werden. Die Myeloperoxidase kommt in der azurophilen Granula vor. Durch Zellaktivierung, z.B. durch Zytokine wie GM-CSF und durch die Phagozytose von Bakterien, wird die Myeloperoxidase aus der azurophilen Granula zum einen in das Phagolysosom entlassen, um dort verstärkt antimikrobielle reaktive Sauerstoffverbindungen zu bilden. Zum anderen kann die Myeloperoxidase aber auch in den Extrazellularraum sezerniert werden, um dort reaktive Sauerstoffverbindungen zu bilden. Extrazellulär wirken sie dadurch antimikrobiell und schädigen jedoch auch das umliegende Gewebe im Rahmen einer Entzündung (Hampton et al., 1998; Klebanoff, 2005; Nauseef, 2007).

Ein weiterer Mechanismus sind antimikrobielle Proteine, die in verschiedenen Granula gespeichert werden. Sie können ebenfalls sowohl extrazellulär sezerniert werden, als auch intrazellulär durch die Fusion mit dem Phagosom zum Phagolysosomen wirken. Wichtige Vertreter sind das gegen gramnegative Bakterien gerichtete Bactericidal permeability increasing protein (BPI), die sowohl gegen gram-positive als auch gegen gram-negative Bakterien wirkenden β -Faltblatt-Defensine und der sekretorische Leukoproteinase Inhibitor (SLPI) (Witko-Sarsat et al., 2000).

Als drittes System können PMN verschiedene Proteasen bilden: Zum einen Serin-Proteasen und Metalloproteinasen, die beide hauptsächlich in einem neutralen pH-Milieu wirken. Sie dienen der Degradierung von extrazellulären Proteinen. Zum anderen enthalten die Granula Thiol-Proteasen und Aspartat-Proteasen, die besser bei einem sauren pH-Wert wirken. Sie sind deswegen am intrazellulären Protein-Abbau im Phagolysosom beteiligt (Witko-Sarsat et al., 2000).

Da diese verschiedenen antimikrobiellen Systeme schädlich für das körpereigene Gewebe sein können, dürfen sie nicht unkontrolliert freigesetzt werden (Henson et al., 1987; Savill et al., 1989). Der Weg der PMN über die Apoptose mit einer intakten Zellmembran und der Abräumung durch Phagozyten ist deswegen äußerst wichtig, damit die intrazelluläre Granula nicht unkontrolliert freigesetzt wird.

1.2.5. Zelltod

Beim Zelltod müssen grundsätzlich drei Formen unterschieden werden: der programmierte Zelltod – Apoptose –, der unkontrollierte Zelltod – die Nekrose – und als dritte Form zusätzlich die PMN-spezifische NET-ose.

Der programmierte Tod einer Zelle, die Apoptose, stellt einen kontrollierten, energieverbrauchenden Prozess dar. Er ist wichtiger Bestandteil der physiologischen Homöostase, dem Gleichgewicht zwischen Verbrauch und Produktion von Zellen, um eine konstante, vom Organismus benötigte Zellzahl des jeweiligen Typus bereit zu stellen (Maiani et al., 2004). Die Apoptose unterliegt mehreren Regelkreisen. Jede Zelle des Körpers hat eine festgelegte Lebensdauer, die sich von Zellart zu Zellart unterscheidet. Sie kann zusätzlich z. B. durch auf die Zelle einwirkende Botenstoffe variiert werden. Auf PMN wirken z. B. Interferon- γ (IFN- γ) und GM-CSF anti-apoptotisch, während TNF- α eine von der Konzentration abhängige Wirkung zeigt: Hohe Konzentrationen haben eine Apoptose fördernde Wirkung auf PMN, niedrige Konzentrationen hingegen haben eher eine die Apoptose vermeidende Wirkung (van den Berg et al., 2001).

Das Apoptose-Programm kann extrinsisch und intrinsisch aktiviert werden. Beim extrinsischen System binden Liganden an so genannte „Todesrezeptoren“ auf der Zellmembran und lösen so das Signal für die Apoptose aus. Beispiele hierfür sind Fas-Ligand am Fas-Rezeptor (CD95) und TNF- α in hoher Konzentration am TNF-Rezeptor (Siegel et al., 2000; van den Berg et al., 2001). Die Rolle der Apoptoseinduktion durch den Fas-Liganden an CD95 ist bei PMN noch nicht völlig geklärt. Sie exprimieren zwar CD95, doch zeigten PMN in Versuchen, in denen der Fas-Rezeptor blockiert wurde, eine normale Lebenszeit und Apoptose. Gleiches gilt für die PMN aus Fas-Rezeptor- oder Fas-Liganden-defizienten Mäusen (Simon, 2003).

Der intrinsische Weg wird durch verschiedene Einflüsse ausgelöst, z. B. der Entzug von Wachstumsfaktoren oder direkte Zellschädigung, wie durch Hypoxie oder Bestrahlung. Dabei

kommt es zur Freisetzung von *Cytochrom C* und anderen apoptosefördernden Proteinen aus dem Mitochondrium entweder durch die pro-apoptischen Vertreter der *Bcl-2* Familie (Bras et al., 2005) oder durch Kalzium²⁺ (Ca²⁺) und reaktive Sauerstoffverbindungen im Mitochondrium (Orrenius et al., 2007).

Die gemeinsame Endstrecke des extrinsischen und des intrinsischen Weges ist die Aktivierung von Cystein-Aspartat-spezifischen Proteasen (Caspasen). Hierbei handelt es sich um eine Gruppe verschiedener Enzyme, die durch Spaltung andere Proteine entweder inaktivieren oder aktivieren, die dann wiederum zu den apoptotischen morphologischen und funktionellen Veränderungen der Zelle führen.

Bereits sehr früh wird Phosphatidylserin an der Innenseite der Zellmembran oxidiert und zur Außenseite befördert (Kagan et al., 2003). An der Zellmembran kommt es zur verminderten Expression unterschiedlicher Oberflächenmoleküle, z. B. von CD87 und CD88. Dies führt zu einer verminderten Adhäsionsfähigkeit und Stimulierbarkeit der PMN (Hart et al., 2000). Es kommt zu einer Kondensation des Zellkerns und des Zytoplasmas und somit zu einem verminderten Zellvolumen, wobei die Zellorganellen intakt bleiben (Maianski et al., 2004). Die Zellkernmembran wird aufgelöst und die Desoxyribonukleinsäure (DNA) wird durch Endonukleasen in ca. 180 Basenpaare (bp) große Fragmente gespalten (Wyllie, 1980). Abschließend kommt es zu einer Blasenbildung in der Zellmembran, dem *membrane blebbing*, und zur Abschnürung von Membrankörperchen, den *apoptotic bodies*, die intrazelluläres Material enthalten. Diese werden durch Phagozyten (z.B. Makrophagen) aufgenommen und abgebaut. Da die Zellmembran der *apoptotic bodies* intakt ist, kommt es zu keiner Schädigung des Gewebes durch den Zellinhalt von PMN. Die apoptotischen Zellen lösen eher keine weitere Entzündung aus, da sie auf die Zellen, die sie phagozytieren, überwiegend anti-entzündlich wirken (siehe hierzu Kapitel 1.3).

Vom kontrollierten programmierten Zelltod abzugrenzen ist der unkontrollierte provozierte Zelltod, die Nekrose. Sie entsteht hauptsächlich durch jede Art der Zellverletzung. Im Gegensatz zur Apoptose schwillt die nekrotische Zelle an (Onkose), die Zellorganellen werden zerstört und die Integrität der Zellmembran geht frühzeitig verloren. In Folge dessen kommt es zu einem Zerfall der Zelle und zu einer Freisetzung des Zellinhaltes, wobei die Organellen nicht von Membranen umgeben sind. Dadurch wird eine Entzündungsreaktion initiiert. Im Falle von nekrotischen PMN kommt es zu einer Freisetzung der einzelnen Proteasen und reaktiven Sauerstoffverbindungen, welche neben der eigentlichen Entzündungsreaktion zu einer Schädigung des körpereigenen Gewebes führen.

Eine apoptotische Zelle kann jedoch auch nekrotisch werden, wenn sie nicht rechtzeitig abgeräumt wird, welche als so genannte „sekundäre Nekrose“ bezeichnet wird (Silva et al., 2008). Dies zeigt, dass beide Arten des Zelltods miteinander verbunden sind. In den letzten Jahren kam deswegen die Idee auf, dass die Nekrose möglicherweise ebenfalls eine Art des programmierten Zelltods ist, da sich immer mehr Verbindungen und Ähnlichkeiten zwischen der Nekrose und Apoptose zeigten. Verschiedene Stimuli, wie z. B. Zytokine, Ischämie und Hitze, können sowohl eine Apoptose, als auch eine Nekrose auslösen. Auch Signalwege wie „Todes-Rezeptoren“ (z.B. CD 95) und die Kaskaden der Kinasen und Mitochondrien spielen eine Rolle in beiden Systemen. Durch Modulationen in diesen Systemen kann entweder eine Nekrose oder eine Apoptose induziert werden. Die anti-apoptotischen Proteine, z. B. aus der Familie des *Bcl-2* Proteine, schützen die Zelle sowohl vor der Apoptose, als auch vor der Nekrose. Die „Entscheidung“ zwischen Apoptose und Nekrose stellt somit unter Umständen die Möglichkeit für den Organismus dar, gezielt zu beeinflussen, ob eine Entzündung ausgelöst, erhalten oder beendet wird (Proskuryakov et al., 2003). Bisher ist jedoch noch zu wenig über den Einfluss nekrotischer Zellen auf die Zellen, durch die sie phagozytiert werden, und damit über die Rolle der nekrotischen Zellen im Rahmen einer Entzündungsreaktion bekannt (Krysko et al., 2006).

Als eine neue Art des Zelltods bei PMN wurde in den letzten Jahren die NET-ose beschrieben. Bei schweren Entzündungen und speziell bei einer Sepsis kommt es zur Ausformung von Neutrophil extracellular traps (NETs) durch PMN. Es handelt sich um eine Art Netz, welches aus DNA-Strängen und Granulaproteinen besteht. Diese haben antimikrobielle Eigenschaften gegen grampositive und gramnegative Bakterien sowie Pilze. Bei NET-ose kommt es zuerst zu einer Auflösung der Kernmembran. Die Chromatinstränge vermischen sich intrazellulär mit den zytoplasmatischen Proteinen und bilden damit die Grundsubstanz für die NETs. Durch die Ruptur der Zellmembran wird dieses Gemisch freigesetzt und bildet dadurch NETs, welche extrazellulär Mikroorganismen binden und bekämpfen können (Brinkmann et al., 2004). Ähnlich wie bei der Nekrose regen die intrazellulären Bestandteile der PMN weitere Entzündungsreaktionen an. Die Bildung der NETs bedarf der Aktivität der NADPH-Oxidase und weiterer, noch nicht näher bestimmten Einflüssen. Dieser Weg des Zelltods unterscheidet sich von der Apoptose z.B. durch die fehlende apoptosetypischen Fragmentierung der DNA und durch die bei der Nekrose fehlenden Auflösung der Kernmembran (Fuchs et al., 2007). Als wichtiger Stimulus zur

Bildung der *NETs* konnte die Interaktion zwischen PMN und Thrombozyten während einer Sepsis identifiziert werden (Clark et al., 2007). Thrombozyten binden über TLR 4 an ihrer Zelloberfläche an im Blut zirkulierende bakterielle Liganden. Durch diesen Stimulus binden sie an adhärenente PMN der Blutbahn innerhalb von Leber und Lunge und induzieren so die Bildung von *NETs*. Dieser Vorgang könnte auch eine Erklärung für die während einer Sepsis beobachtete Thrombozytopenie bieten.

1.3. **Abräumung apoptotischer Zellen und deren immunmodulatorischen Effekte**

PMN gehen nach einer kurzen Lebensdauer in die Apoptose (Saville et al., 1995). Damit der Inhalt der apoptotischen PMN nicht doch noch freigesetzt wird, müssen sie schnell und effektiv abgeräumt werden, um eine Schädigung des körpereigenen Gewebes zu vermeiden (Henson et al., 1987). Bisher wurde diese Aufgabe hauptsächlich nur für Makrophagen (Savill et al., 1989) und Dendritische Zellen (Stuart et al., 2002; Morelli et al., 2003) beschrieben und ergänzend dazu für einige nicht-spezialisierte Phagozyten, wie z. B. Endothelzellen, Mesangiumzellen (Cortes-Hernandez et al., 2002) und glatte Muskelzellen (Fries et al., 2005).

Die Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen ist weitgehend unverstanden und Gegenstand einer breiten aktuellen Forschung. Dieser Prozess wurde bisher überwiegend für Makrophagen, Monozyten und Dendritische Zellen untersucht, ohne entgültig klären zu können, über welche Rezeptoren und Moleküle Zellen überhaupt als apoptotisch erkannt und anschließend phagozytiert werden. Die verschiedenen Rezeptoren und Moleküle dafür befinden sich sowohl auf den apoptotischen Zellen, als auch auf den Phagozyten selbst. Hinzu kommen verschiedene Serumfaktoren als Opsonine. So konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Serum die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen verstärkt (Kurosaka et al., 2002). Bei den Molekülen auf den apoptotischen Zellen wird zwischen der verstärkten Expression von so genannten *eat me*-Signalen und dem Verlust von so genannten *leave me*-Signalen unterschieden (siehe [Abbildung 1](#)).

Als ein zentrales Erkennungszeichen apoptotischer Zellen und auch als ein *eat me*-Signal wird Phosphatidylserin gesehen, welches durch Translokation auf die Zelloberfläche apoptotischer Zellen gelangt (Fadok et al., 1998). Andere *eat me*-Signale entstehen durch strukturelle Veränderungen unterschiedlicher Moleküle. Zum Beispiel kommt es während der Apoptose an der Zelloberfläche zu einer Veränderung verschiedener Kohlenhydratstrukturen mit einer Exposition von Galaktose, Mannose und N-Acetyl-Glukosamin. Als ein Beispiel dient das

Adhäsionsmolekül ICAM-3, welches über einen solchen Prozess in seiner Struktur verändert wird, wodurch es zu einer Erkennung als apoptotische Zelle durch Phagozyten kommt (Dini et al., 1995).

Die *leave me*-Signale sind Kennzeichen vitaler Zellen, welche während der Apoptose von der Zelloberfläche verschwinden oder sich in ihrer Struktur verändern. Auf vitalen Zellen verhindern sie die Aufnahme der Zelle durch Phagozyten, wohingegen apoptotische Zellen durch den Verlust oder die Veränderung dieses „Schutzschildes“ phagozytiert werden können. Ein Beispiel eines solchen Moleküls, das auf apoptotischen Zellen an der Zelloberfläche strukturell verändert exprimiert wird, ist CD31. Dadurch kommt es nicht mehr zu einer Abstoßung der apoptotischen Zelle vom Phagozyten (Brown et al., 2002). Diese strukturellen Veränderungen an der Oberfläche apoptotischer Zellen entstehen durch bakterielle Proteinase. Diese bewirken einen Verlust der *leave me*-Signale und die Erzeugung von *eat me*-Signalen (Guzik et al., 2007).

Durch *in vitro* Modelle konnten verschiedene Moleküle auf der Zelloberfläche von Phagozyten identifiziert werden, die bei der Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen involviert sind. Dazu zählen CD14 (Devitt et al, 2003), die Integrine $\alpha\beta3$ (Savill et al., 2000) und $\alpha\beta5$ (Albert et al, 2000), die Scavenger-Rezeptoren CD36 (Savill et al., 1992), CD68 (Ramprasad et al., 1995), Klasse A Makrophagen Scavenger Rezeptor (SR-A) (Platt et al., 1996) und der Lektin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) (Oka et al., 1998).

Als ein sehr zentrales Molekül auf der Zelloberfläche von Phagozyten wird ein Phosphatidylserinrezeptor vermutet. Dieser wurde auf der Oberfläche von Makrophagen beschrieben (Fadock et al., 2000), und erschien interessant, da sein Ligand – Phosphatidylserin – an der Zelloberfläche apoptotischer Zellen als ein Hauptunterscheidungsmerkmal zu nicht-apoptotischen Zellen exprimiert wird. Der Rezeptor wurde durch einen blockierenden monoklonalen Antikörper 217 (mAb 217) entdeckt. Der Antikörper ist gegen Strukturen auf Makrophagen gerichtet, die mit TGF- β und β -Glucan stimuliert wurden. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Bindung des Antikörpers an Makrophagen zu einer verminderten Phagozytose apoptotischer Zellen führte. Die Bindung des Antikörpers an die stimulierten Makrophagen wiederum konnte durch die Co-Inkubation mit Phosphatidylserin-tragenden Liposomen gehemmt werden. Durch diese beiden Beobachtungen wurde geschlossen, dass mAb 217 gegen einen Phosphatidylserin-Rezeptor auf Makrophagen gerichtet war. Diese Schlussfolgerung konnte aber 2004 widerlegt werden. Zum einen wurde gezeigt, dass mAb 217 gegen ein nukleäres Protein gerichtet war, und nicht gegen ein Molekül an der Zelloberfläche von Makrophagen (Cui et al., 2004). Zum anderen kommt es *in vivo* und *in vitro*

zu keiner verminderten Phagozytose apoptotischer Zellen durch die Makrophagen aus Phosphatidylserin-Rezeptor-defizienten Mäusen, sondern zu einer Wachstumsretardierung in utero, zu einer verzögerten Organdifferenzierung und zu einem perinatalen Versterben der Mäuse (Böse et al., 2004). Interessanterweise konnten die Makrophagen dieser Phosphatidylserin-Rezeptor-defizienten Mäuse weder durch apoptotische Zellen zu der Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen angeregt werden, noch durch LPS zur Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen. Der Phosphatidylserin-Rezeptor scheint neben einer Beteiligung an der Organdifferenzierung eine entscheidende Rolle an der Regulierung des Sekretionsmusters von Makrophagen zu haben. Somit scheint es, als wäre er nicht an der direkten Erkennung apoptotischer Zellen durch Makrophagen beteiligt, sondern an den sich daraus ergebenden Effekten.

Jüngste Studien legen nahe, dass doch ein Zusammenhang zwischen Phosphatidylserin und der Erkennung apoptotischer Zellen durch Phagozyten besteht. Auf Sertoli Zellen des Hodens konnte der Klasse B Scavenger Rezeptor Typ I (SR-BI) als ein Phosphatidylserin erkennendes Molekül identifiziert werden. Er dient der Aufnahme apoptotischer Zellen der Spermatogenese durch die Sertoli Zellen. Durch diese Bindung von Phosphatidylserin an SR-BI kommt es wiederum zu einer Wechselwirkung zwischen SR-BI und dem engulfment adapter protein (GULP) auf der Zelloberfläche von Sertolizellen. Dieses führt in der Folge zu einer Phosphorylierung der mitogen-activated protein kinase (MAPK) p38. MAPK erhöht wiederum den Gehalt an das Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC-1) in der Sertoli Zelle, was wiederum eine Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts zur Folge hat. Durch diese Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts umschließt die Sertoli Zelle die apoptotische Zelle und phagozytiert sie (Osada et al., 2009). Ob die Bindung von Phosphatidylserin an SR-BI und die anschließenden Prozesse ebenfalls eine zentrale Rolle in der Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen durch andere Phagozyten spielt, muss jedoch erst noch untersucht werden.

Ein anderer Rezeptor, der die Aufnahme apoptotischer Zellen durch Phagozyten vermittelt, ist das LDL-receptor-related protein (LRP) (Gardai et al., 2005). Dieses Protein an der Oberfläche der phagozytierenden Zelle erkennt Calretikulin an der Oberfläche der zu phagozytierenden Zelle. Calretikulin kommt jedoch an der Zelloberfläche sowohl apoptotischer als auch nicht-apoptotischer Zellen vor. Die Differenzierung zwischen apoptotisch und nicht-apoptotisch geschieht z. B. über das *leave me*-Signal CD47, welches auf der Oberfläche von nicht-apoptotischen Zellen exprimiert wird und im Rahmen der Apoptose

von der Zelloberfläche verschwindet. Auf diese Weise wird erreicht, dass nur apoptotische Zellen phagozytiert werden.

Wie komplex die Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen durch die verschiedenen Phagozyten und das Zusammenspiel mit den unterschiedlichen Rezeptoren ist, zeigt sich darin, dass immer neue Moleküle in diesem Zusammenhang entdeckt werden. Anfang des Jahres konnte nachgewiesen werden, dass es in Mäusen, welche für den intrazellulären Botenstoff Vav3 guanine nucleotide exchange factor (Vav3) defizient waren, zu einer verminderten β 2-Integrin-abhängigen Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen über ICAM-1 kommt (Sindrilaru et al., 2009). Eine andere Arbeitsgruppe fand heraus, dass der Rezeptor Trem-like 4 eine wichtige Rolle in der Abräumung apoptotischer Zellen spielt. Er wird in der Maus auf der Zelloberfläche von $CD8\alpha^+$ Dendritischen Zellen und residenten Makrophagen der Milz exprimiert. Er dient der Phagozytose sowohl spät-apoptotischer als auch nekrotischer Zellen durch diese Phagozyten in der Milz der Maus (Hemmi et al., 2009).

Verschiedene Serumbestandteile wirken ebenfalls bei der Phagozytose apoptotischer Zellen mit (Mevorach et al., 1998; Cortes-Hernandez et al., 2002). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Einfluss apoptotischer Zellen auf die Zytokin-Sekretion von Makrophagen ebenfalls abhängig ist von der Anwesenheit von Serum (Kurosaka et al., 2002). Immunglobuline, Akute-Phase-Proteine, antikoagulatorische Proteine, Kollektine und Bestandteile des Komplementsystems können apoptotische Zellen opsonieren, um sie so für die Phagozytose zu markieren. Speziell das Komplementsystem scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen. Zum einen ist der Komplementfaktor 3 (C3) beteiligt (Kohl, 2006), zum anderen das Spaltprodukt q von C1 (C1q) (Donnelly et al., 2006). C1q bindet an das bereits erwähnte Calretikulin und an CD91 auf der Zelloberfläche von apoptotischen Zellen und opsoniert sie so für Phagozyten. Für die Erkennung und Phagozytose von diesen opsonierten apoptotischen Zellen sind auf den Phagozyten Komplementrezeptoren und Fc γ -Rezeptoren essentiell (Hart et al., 2004).

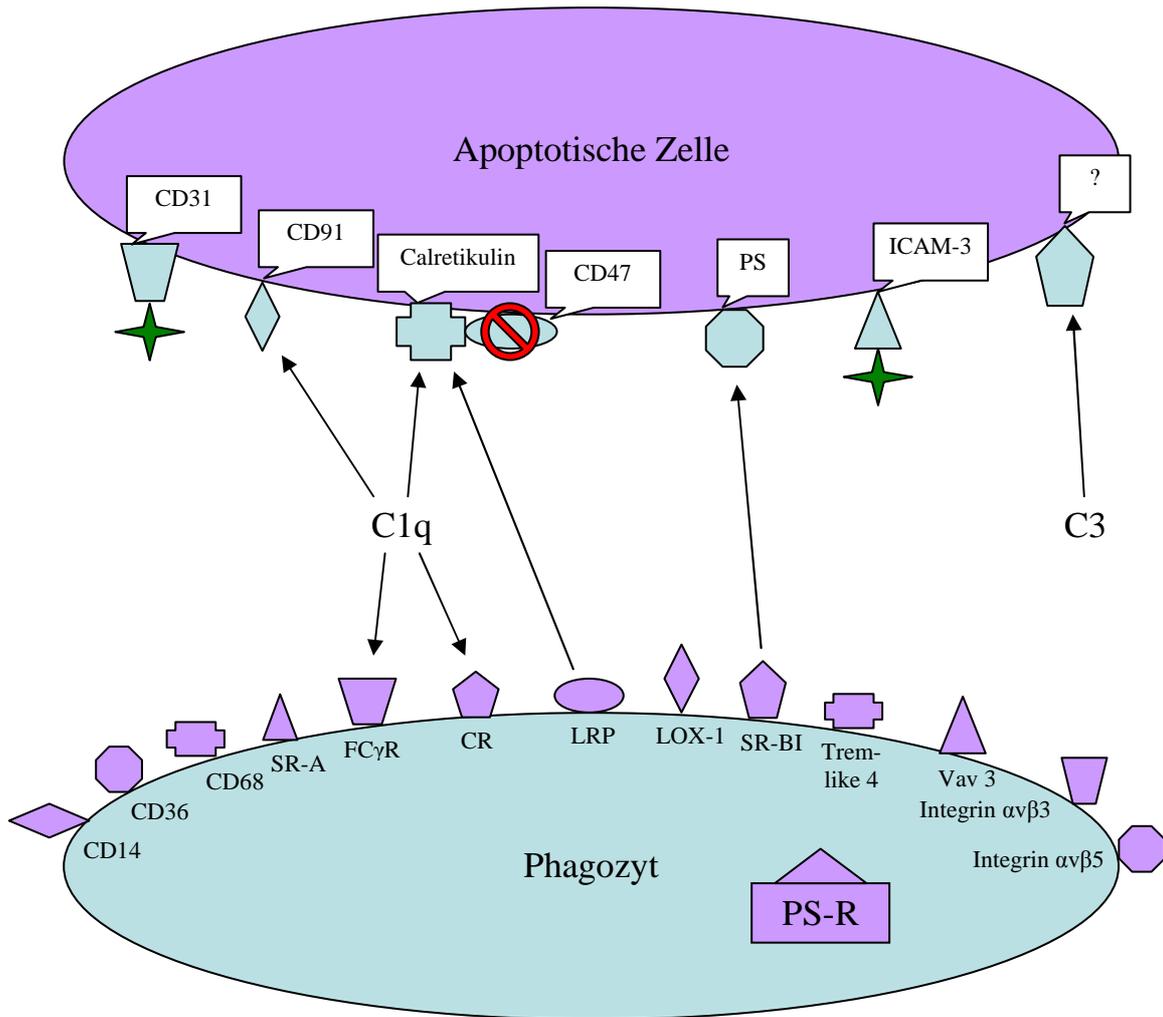


Abbildung 1: Rezeptoren und Moleküle zur Erkennung apoptotischer Zellen.

Für zahlreiche Rezeptoren wurde eine Beteiligung an der Phagozytose apoptotischer Zellen durch verschiedene Phagozyten auf beiden Zelltypen nachgewiesen. Auch mehrere Serumfaktoren sind daran beteiligt. Das grüne Kreuz an verschiedenen Rezeptoren bedeutet, dass diese in ihrer Struktur verändert werden. CD47 wird im Rahmen der Apoptose von der Zelloberfläche entfernt, wodurch es seine „schützende“ Funktion für Calretikulin verliert. Die eingezeichneten Pfeile stellen bisher nachgewiesene Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Rezeptoren und Molekülen dar, welche eine Rolle für die Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN spielen.

Die Apoptose der PMN und die daraus folgende Phagozytose stellt kein unbedeutendes Randphänomen der Entzündung dar. Dieser Vorgang nimmt vielmehr zentralen Einfluss auf die Phagozyten und ist wahrscheinlich dadurch zentral beteiligt an der Beendigung einer Entzündung (Saville et al., 1995). Wie im Folgenden aufgeführt, beeinflussen apoptotische Zellen verschiedene Funktionen von Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen.

In Monozyten wird zum einen durch apoptotische Zellen die Produktion der anti-entzündlichen Zytokine IL-10 und TGF- β gesteigert. Zum anderen wird weniger von den pro-entzündlichen Zytokinen TNF- α und IL-1 β produziert (Byrne et al., 2002).

In Makrophagen wird ebenfalls die TGF- β -Produktion durch den Kontakt mit apoptotischen Zellen gesteigert (Huynh et al., 2002), während die Produktion von TNF- α (Barker et al., 2002) und Makrophagen-Inflammatorisches Protein 2 (MIP-2) absinkt (Zhang et al., 2003).

Die Datenlage zur Veränderung der Sekretion von IL-8 aus Makrophagen in der Folge der Phagozytose apoptotischer Zellen ist sehr uneinheitlich. Zwar wurde von einigen Gruppen eine verminderte IL-8-Freisetzung beobachtet (Fadok et al., 2001), in anderen Versuchen zeigte sich aber eine erhöhte IL-8-Sekretion durch den Kontakt mit apoptotischen Zellen (Kurosaka et al., 1998).

Auch auf der Ebene der Gen-Transkription konnte ein Einfluss apoptotischer Zellen auf Makrophagen nachgewiesen werden. Bereits der Kontakt zu apoptotischen Zellen führte in Makrophagen zu einer verminderten Transkription der Gene für pro-inflammatorische Zytokine (Cvetanovic et al., 2004).

Wie bereits erwähnt, konnte gezeigt werden, dass Makrophagen durch den Kontakt mit apoptotischen Zellen vermehrt IL-10 sezernieren. IL-10 ist dafür bekannt, dass es die Aktivität von Phagozyten, Erreger aufzunehmen und Sauerstoffradikale zu bilden, reduziert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der Kontakt mit apoptotischen Zellen zwar zu einer vermehrten IL-10 Freisetzung aus Makrophagen führt, diese aber trotzdem unverändert *Staphylococcus aureus* phagozytieren und abtöten können (Zuba et al., 2004). Andererseits konnte demonstriert werden, dass apoptotische Zellen die Synthese von Stickstoff-Oxid (NO) in Makrophagen reduziert und dies zu einer verminderten Abtötung von *Coxiella burnetii* führt (Zamboni et al., 2004). Bei *Coxiella burnetii* handelt es sich jedoch um einen obligat intrazellulären Erreger und vielleicht gibt es deswegen Unterschiede zu den Ergebnissen mit *Staphylococcus aureus*. Letztendlich handelt es sich hierbei jedoch um *in vitro* Untersuchungen, die unter Umständen wichtige Begleitfaktoren im Gesamtorganismus ausblenden. Als Beispiel hierfür sei erwähnt, dass für eine effektive Abtötung von *Staphylococcus epidermidis* eine bestimmte Konzentration von PMN notwendig ist, wobei die Anzahl der Bakterien eine untergeordnete Rolle spielt (Li et al., 2002).

Bei murinen Dendritischen Zellen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Produktion von pro-entzündlichen Zytokinen wie IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12p70 und TNF- α durch die Phagozytose apoptotischer Zellen sinkt (Morelli et al., 2003). In der Ratte wurde zusätzlich gezeigt, dass auch nicht-professionelle Phagozyten, wie z. B. glatte Muskelzellen, apoptotische Zellen aufnehmen können und dadurch in Ihrer Funktion beeinflusst werden. Sie sezernieren danach vermehrt TGF- β , Monocyte-Chemoattractant protein-1 (MCP-1) und

Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant (CINC, entspricht funktionell IL-8 im Menschen) (Fries et al., 2005).

Diese Beobachtungen zeigen klar, dass die Apoptose von PMN neben dem Schutz des Gewebes vor aggressiven Zellbestandteilen einen wichtigen Schritt darstellt, um die Entzündungsreaktion zu beenden (Serhan et al., 2005).

Auch der Zeitpunkt im Apoptoseprozess scheint Einfluss zu nehmen auf die Regulierung der Entzündung. Früh-apoptotische Zellen verändern die Zytokin-Ausschüttung der phagozytierenden Makrophagen nicht; es werden weder pro-entzündliche noch anti-entzündliche Zytokine verstärkt ausgeschüttet (Kurosaka et al., 2003).

Zusätzlich ist auch die auslösende Ursache für die Apoptose von PMN entscheidend dafür, wie die anschließend phagozytierende Zelle in ihrer Funktion beeinflusst wird. Apoptotische PMN, die Bakterien wie *Staphylococcus aureus* oder *Escherichia coli* phagozytiert hatten, führten bei Makrophagen, die diese apoptotischen Zellen aufnahmen, zu einer vermehrten Ausschüttung von TNF- α . Wurde die Apoptose aber durch das Altern von PMN ausgelöst, so treten die bekannten anti-entzündlichen Effekte bei Makrophagen auf: Die Sezernierung von TNF- α wird vermindert, und die von TGF- β wird erhöht (Zheng et al. 2004).

Im Rahmen der Sepsis scheint der Zelltod von Immunzellen und somit auch von PMN ebenfalls eine wichtige Stellung zu haben. Bisher wurde die Meinung vertreten, dass Sepsispatienten an einem sogenannten „Zytokin-Sturm“ versterben, bei dem es zu einer extremen Freisetzung von Zytokinen und in Folge dessen zu einem Kreislaufversagen kommt. Doch dieses Modell wird heute zunehmend in Frage gestellt, da Therapieversuche in diese Richtung in vielen Studien keine Verbesserung der Überlebensrate erbracht haben. Es gibt zunehmende Hinweise darauf, dass ein übermäßiger Verbrauch von Immunzellen der Grund für die hohe Letalität ist, da es während der Sepsis zu einem überschießenden Untergang der verschiedenen Immunzellen kommt (Hotchkiss et al., 2006). Durch ein besseres Verständnis der genauen Apoptoseabläufe der Zellen und der daraus resultierenden Wirkungen auf andere Zellen erhofft man sich für die Zukunft therapeutische Ansätze, um auf die Entzündungsreaktion einen steuernden Einfluss nehmen zu können (Rossi et al., 2007).

1.4. Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN

Bei Patienten, die im Rahmen eines Nierenzellkarzinoms mit IFN- γ und GM-CSF behandelt wurden, konnte zum ersten Mal apoptotisches Material in PMN nachgewiesen werden (Galati et al., 2000). Durch eine andere Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass bei fulminanten Lungenentzündungen ebenfalls apoptotisches Material von PMN phagozytiert wird. Die Idee dahinter war, dass es bei einer schweren Lungenentzündung zu einer so massiven Anhäufung von apoptotischen Zellen kommt, dass die Abräumung durch das Makrophagen-System nicht mehr ausreicht. In diesen Fällen sollen ebenfalls die PMN als eine Art Rettungssystem apoptotische Zellen phagozytieren können, um das Entstehen sekundär nekrotischer Zellen zu vermeiden, welche eine Gewebe-schädigende Wirkung hätten (Rydell-Törmänen et al., 2006).

In unserer Arbeitsgruppe konnte in einer elektronenmikroskopischen Untersuchung von PMN in einer Zellkultur nebenbefundlich gezeigt werden, wie sich Zellausläufer eines PMN um eine apoptotische Zelle legten (siehe Abbildung 2).

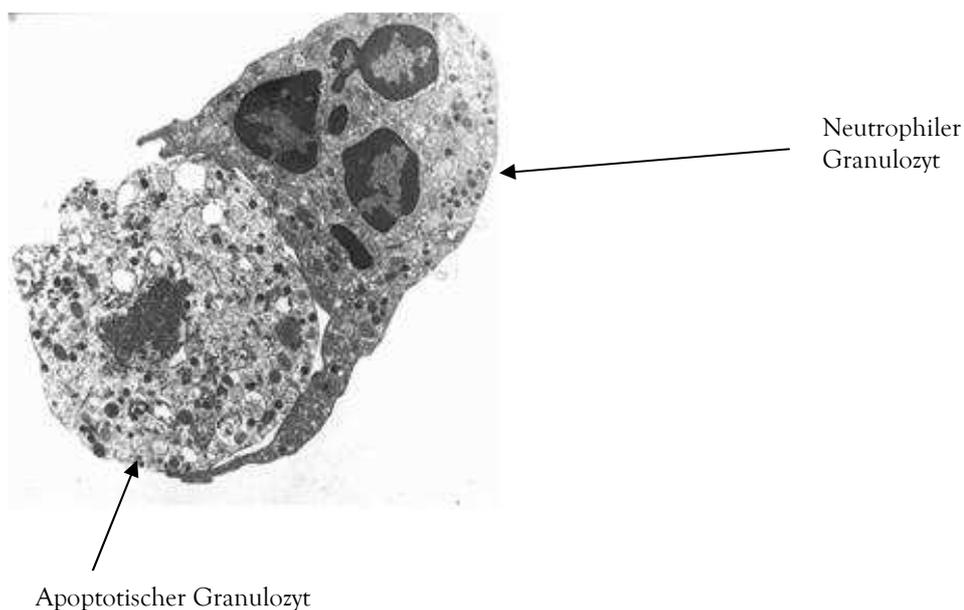


Abbildung 2: Phagozytose eines apoptotischen Granulozyten durch einen PMN.
(Essmann/Idel et al., Manuskript eingereicht)

Aus dieser Beobachtung und den von Galetti beschriebenen Ergebnissen entstand die Theorie, dass PMN apoptotische Zellen phagozytieren können.

Um diese Theorie weiter zu untersuchen, wurden in Vorarbeiten PMN aus dem peripheren, humanen Vollblut isoliert (siehe Kapitel 3.2.1) und ein *in vitro* Modell zur Darstellung der Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN entwickelt (Esmann, 2008). Durch die unterschiedliche Färbung von apoptotischen Zellen und PMN konnte nach einer gemeinsamen Inkubation in der Fluoreszenzmikroskopie und in der Durchflusszytometrie gezeigt werden, dass apoptotisches Material in die PMN aufgenommen wurde. Es konnte gezeigt werden, dass es sich dabei um wirkliche Phagozytose handelt und nicht um einen bloßen Austausch des Membranfarbstoffs, indem die Co-Inkubation der PMN mit den apoptotischen Zellen in der Anwesenheit des Phagozytose-Hemmstoffs Cytochalasin D wiederholt wurde. Bei der anschließenden Analyse der Zellen konnten weniger Zellbestandteile mit dem Membranfarbstoff der apoptotischen Zellen in den PMN nachgewiesen werden. In der Konfokal-Mikroskopie konnte dann sogar gezeigt werden, dass sich apoptotisches Material in den PMN befindet (Esmann et al., 2010).

2. Fragestellung

Die vorliegende Arbeit widmet sich der Frage, welchen Einfluss der Kontakt mit und die Phagozytose von apoptotischen Zellen auf die Funktionen von PMN hat. Als proentzündliche Funktionen wurden die Sekretion der Zytokine IP-10 und IL-8, sowie die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen untersucht.

Ferner wurde die Abhängigkeit der Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN von der Anwesenheit humanen Serums untersucht. Wichtige Serumbestandteile, speziell im Rahmen der akuten Entzündung, sind die Komponenten des Komplementsystems. In der vorliegenden Arbeit wurde C1q als einer der wichtigsten Komplementfaktoren gewählt und untersucht, welchen Einfluss dessen Fehlen im Serum auf die Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN hat.

3. Materialien und Methoden

3.1. Materiallisten

3.1.1. Laborverbrauchsmaterialien

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, Spitzboden	Greiner bio-one, Frickenhausen
Glasobjektträger Superfrost®	Menzel, Braunschweig
Mikrotiterplatte MaxiSorb 96-Loch, Flachboden	Nunc, Wiesbaden
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
Reaktionsgefäße 2 ml, Polypropylen	Eppendorf, Hamburg
Transferpipette 3.5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
U-Röhrchen für die Durchfluss- zytometrie	Micronic, Lelystad, Niederlande

3.1.2. Chemikalien

Annexin-V- FITC	Roche Diagnostics, Mannheim
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
C1q-depleted Serum (human)	Quidel, San Diego, USA
Dihydrorhodamin 123 (DHR)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Karlsruhe
fMLP	Sigma, Deisenhofen
Giemsa Färbelösung	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Rekombinantes humanes GM-CSF	PepruTech, Offenbach
HEPES	Biochrom, Berlin
Histopaque [®] 1119	Sigma, Deisenhofen
Rekombinantes humanes IFN- γ	PepruTech, Offenbach
IMAGEN [®] Mounting Fluid	Dako, Hamburg
Immersionsöl	Carl Zeiss, Jena
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Sigma, Deisenhofen
Lipopolysaccharide <i>E. coli</i> 0111:B4	Sigma, Deisenhofen
Lymphozytenseparationsmedium 1077	PAA, Pasching, Österreich
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Methanol	J.T. Baker, Deventer, The Netherlands
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Phosphate buffered saline (PBS) (1 \times) sterile Lösung	Apotheke des UKSH, Campus Lübeck, Lübeck
PBS (10 \times) sterile solution	Gibco, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Percoll [®]	Pharmacia, Uppsala, Schweden
PKH 26 Red Fluorescent Cell Linker Kit	Sigma, Deisenhofen

PKH 67 Green Fluorescent

Cell Linker Kit	Sigma, Deisenhofen
Propidiumiodid-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Roswell Park Memorial Institute (RPMI)	
1640 Medium	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau-Färbelösung 0.4 %	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Serva, Heidelberg

3.1.3. ELISA-Sets

human IL-8 ELISA CytoSet™	Biosource, Camarillo, CA, USA
human IP-10 ELISA CytoSet™	Biosource, Camarillo, CA, USA
OptEIA™ human TNF- α Set	BDBiosciences, Heidelberg
OptEIA™ human IL-10 Set	BD Biosciences, Heidelberg

3.1.4. Geräte

Analysenwaage BP61S	Sartorius, Göttingen
CO ₂ - Inkubator IG 150	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
Photometer Tecan Sunrise	Tecan, Crailsheim
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Rüttler Vibrofix VF1 Electronic	Janke & Kunkel IKA® Labortechnik, Staufen
Sterile Werkbank	Biohit, Köln
Stratalinker® 2400	Stratagene, La Jolla, USA
Wasserbad	Köttermann, Uetze (Hänigsen)
Zählkammern	Neubauer, Marienfeld

Zentrifugen

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

3.1.5. Kulturmedien und Puffer

Annexin-V-Puffer	10 mM HEPES + 140 mM NaCl + 5 mM CaCl ₂ pH 7,4 (eingestellt mit NaOH)
Kulturmedium	RPMI 1640 Medium + 50 µM 2-Mercaptoethanol + 2 mM L-Glutamin + 10 mM HEPES + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + 10 % FCS
ELISA Wasch-Puffer	PBS + 0,05% Tween 20

3.1.6. Software

CellQuest® (Durchflusszytometrie)	Becton Dickinson, Heidelberg
Magellan® (ELISA)	Tecan, Crailsheim

3.2. Methodik

3.2.1. Gewinnung von neutrophilen Granulozyten aus peripherenösem humanen Vollblut

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

Die für die Versuche benötigten neutrophilen Granulozyten wurden aus humanem Vollblut isoliert, welches gesunden Probanden aus einer oberflächlichen Armvene in Heparinröhrchen abgenommen wurde.

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 × g zentrifugiert. Hierdurch wurde das Blut in vier Fraktionen aufgetrennt, von unten nach oben waren dies: ein Bodensatz aus Erythrozyten (1),

eine granulozytenreiche Phase Histopaque® 1119 (2), eine vorwiegend aus Lymphozyten und Monozyten bestehende Zellschicht (3) und Plasma (4) (siehe [Abbildung 3](#)).

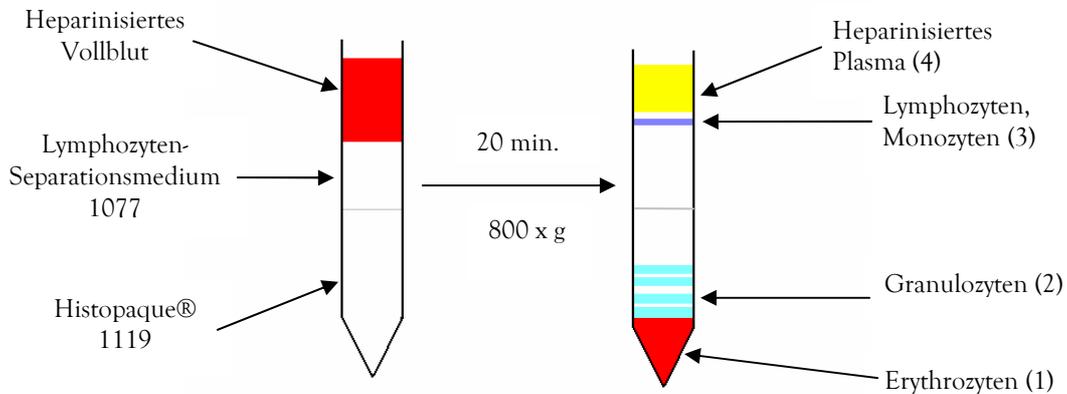


Abbildung 3: Isolierung von Granulozyten aus Vollblut.

Auf 5 ml Histopaque® 1119 und 2 ml Lymphozytenseparationsmedium 1077 wurden 4 ml heparinisiertes Vollblut geschichtet (linkes Bild). Nach der Zentrifugation ergab sich das dargestellte Zellschichtungsprofil mit den von 1 bis 4 bezeichneten Fraktionen (rechtes Bild).

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 Percollstammlösung 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 (Laufs et al., 2002).

Für die Versuche wurden an dem Tag des Experiments zweimal PMN vom gleichen Spender isoliert. Die erste Isolierung am Vormittag diente der Gewinnung von PMN für die Apoptoseinduktion (siehe Kapitel 3.2.5). Bei der Isolation am Nachmittag wurden frische PMN gewonnen, um eine klare Trennung der nicht-apoptotischen Zellen von den apoptotischen Zellen zu erreichen. PMN haben eine kurze und damit für diese Versuche kritische Lebensdauer. Da die Apoptose-Induktion durch Bestrahlung mit Ultraviolett-Licht (UV) eine anschließende vierstündige Inkubation benötigte, könnte bei nur einer Isolation in der nicht bestrahlten Population ein nicht näher bezifferter Prozentsatz bereits in die natürlich

bedingte Apoptose gegangen sein. Die zweifache Isolation diente somit der Eliminierung dieser Störgröße.

3.2.2. Gewinnung von humanem Serum

Bei einigen Versuchen wurde dem Medium, welches kein FCS enthielt, humanes Serum zugesetzt. Um Serum zu gewinnen, wurde in einem Serumröhrchen humanes Blut aus einer oberflächlichen Armvene desselben Spenders abgenommen, dessen PMN für das jeweilige Experiment verwendet wurden, so dass syngene Bedingungen gewährleistet waren. Nach abgelaufener Gerinnung wurde das Röhrchen bei 2600 g zentrifugiert und der Serum-Überstand zellfrei abgenommen.

3.2.3. Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer

Die Zählung der isolierten PMN erfolgte nach Färbung mit Kristallviolett in einer Zählkammer nach Neubauer mit einer Tiefe von 0,1 mm und einer Grundfläche von 0,0625 mm² pro Kleinquadrat. Mindestens 100 Zellen wurden viermal in jeweils 16 Kleinquadraten ausgezählt. Aus dem sich daraus ergebenden Durchschnittswert wurde die Konzentration der Zellsuspension berechnet.

3.2.4. Herstellung von Zytospin-Präparaten und Färbung nach Giemsa

Zellsuspensionen von jeweils 10⁵ Zellen in 100 µl Medium wurden durch Zentrifugation mit einer Zytocentrifuge bei 400 × g auf Objektträger gebracht. Diese so genannten Zytospinpräparate wurden anschließend für 5 Minuten in einem Methanolbad (99 %) fixiert, luftgetrocknet und anschließend in einem Bad aus Giemsa-Färbelösung (Giemsa-Stammlösung 1:20 mit deionisiertem Wasser verdünnt) für 30 Minuten gefärbt. Zum Schluss wurde die überschüssige Färbelösung mit Leitungswasser abgespült und die Zytospin-Präparate konnten mikroskopisch untersucht werden.

3.2.5. Apoptose-Induktion in neutrophilen Granulozyten durch UV-Bestrahlung

Die PMN gehen natürlicherweise nach ca. 10-24 Stunden in die Spontanapoptose. Um diesen Prozess zu beschleunigen, wurde die Apoptose der PMN deswegen durch die Bestrahlung mit ultraviolettem (UV) Licht induziert (Essmann, 2008). Das UV-Licht induziert die Apoptose durch direkte Schädigung der DNA. Dies führt zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien (Kulms et al., 2002).

Zur Apoptose-Induktion der PMN wurden diese in einer Konzentration von 20×10^6 Zellen pro ml in Medium aufgenommen. Jeweils 333 μ l dieser Zellsuspension wurden in ein Feld einer 12-Loch-Gewebekulturplatte mit einem Flachboden gegeben. Diese Platte mit den PMN wurde ohne Abdeckung in das UV-Bestrahlungsgerät Stratalinker® gestellt und mit UV-Licht der Wellenlänge 256 nm in einer Dosis von 200 mJ/cm² bestrahlt. Die PMN wurden danach mit Medium auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen pro ml verdünnt.

3.2.6. Apoptose-Nachweismethoden

In Zytospinpräparaten von PMN zeigen sich zwischen nicht-apoptotischen und apoptotischen Zellen in der Färbung nach Giemsa lichtmikroskopisch charakteristische morphologische Unterschiede. Apoptotische PMN stellen sich durch einen Verlust der gelappten Zellkernform und Verdichtung des Kernchromatins dar (Payne et al., 1994; Squier et al., 1995).

Als weitere Möglichkeit des Apoptose-Nachweises wurde eine Färbung mit Fluoresceinisothiocyanate(FITC)-konjugiertem Annexin-V durchgeführt. Das auf der Zellmembran von apoptotischen Zellen exprimierte Phosphatidylserin stellt hierbei das Substrat für Annexin-V dar, an welches es kalziumabhängig bindet (Homburg et al., 1995; Vermes et al., 1995). Die Färbung mit Annexin-V wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers in kalziumhaltiger Annexinpufferlösung auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden unmittelbar im Anschluss an die Färbung mit dem Durchfluszytometer analysiert. Mit dieser Methode war eine Differenzierung von vitalen (Annexin- negativen) und apoptotischen (Annexin-positiven) Zellen möglich. Bei der Auswertung wurden die Zellen berücksichtigt, die nach Größe und Granularität im FSC/SSC-Diagramm PMN entsprachen.

3.2.7. Zellfärbung mit PKH-Farbstoffen

Bei den PKH-Farbstoffen PKH-26 (rot) und PKH-67 (grün) handelt es sich um aliphatische Fluoreszenzfarbstoffe, die sich in die Lipidmembran von Zellen einlagern (Horan PK et al., 1989).

Für einen Färbeansatz wurden 15 Millionen PMN zum Waschen zunächst in einem 15-ml-Polystyrolröhrchen in 5 ml Medium, welches weder FCS noch humanes Serum enthielt, zentrifugiert. Das Zellsediment wurde anschließend je nach gewünschter Färbung in 0,5 ml entweder einer $2,3 \times 10^{-6}$ M PKH26-Farbstofflösung (PKH-Stammlösung in „Diluent-C“-Verdünnungsflüssigkeit) oder einer 5×10^{-7} M PKH67-Farbstofflösung resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Zur Abstopfung der Färbung wurden 0,5 ml FCS hinzugegeben und dieses für zwei weitere Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden die Zellen dreimal mit Medium gewaschen. Die Färbung wurde fluoreszenzmikroskopisch und mittels Durchflusszytometrie untersucht.

3.2.8. Phagozytose apoptotischer PMN durch nicht-apoptotische PMN

4×10^5 PKH26 (rot) gefärbte apoptotische PMN wurden mit 1×10^5 PKH67 (grün) gefärbten vitalen PMN in einem Volumen von 100 μ l Medium ohne FCS in einer 96-Loch-Zellkulturplatte zusammengeführt. Wenn nicht anders angegeben, war diese Zellsuspension zu 33 % mit autologen humanen Serum versetzt. Zusätzlich wurde eine Co-Kultur zur Kontrolle angelegt, die jedoch anstatt mit autologem humanem Serum zu 33% mit allogenen humanem Serum versetzt wurde.

Die Zellen wurden für 90 Minuten bei einer Temperatur von 37°C und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre mit einem Kohlendioxid (CO₂) Gehalt von 5 % co-inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch. Bei der durchflusszytometrischen Analyse wurden aus jeder Probe 10^4 Zellen analysiert (siehe Abbildung 6). Außerdem wurden Giemsa-gefärbte Zytospinpräparate angefertigt.

3.2.9. *In vitro* Kultur von isolierten humanen PMN

Die Zellen wurden in RPMI 1640 Kulturmedium (siehe Kapitel 3.1.5) bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

In einigen Experimenten wurde untersucht, welchen Einfluss die Zugabe verschiedener Stimulanzen auf die verschiedenen Funktionen der nicht-apoptotischen PMN hat, sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von apoptotischen PMN. Dazu wurden die Effektorzellen einer 96-Loch-Zellkulturplatte mit verschiedenen Substanzen inkubiert:

- 1) GM-CSF (100 ng/ml)
- 2) Lipopolysaccharid (LPS) (100 ng/ml)
- 3) IFN- γ (100 U/ml)
- 4) GM-CSF (100 ng/ml) + IFN- γ (100 U/ml)
- 5) LPS (100 ng/ml) + IFN- γ (100 U/ml)

3.2.10. Messung reaktiver Sauerstoff-Radikale

Reaktive Sauerstoffradikale in PMN wurden durch Verwendung von Dihydrorhodamin (DHR) gemessen. DHR gelangt in die PMN und wird fluoreszierend, indem es durch reaktive Sauerstoffradikale (HO, H₂O₂) oxidiert wird.

In den Versuchen wurden zunächst die apoptotischen PMN mit PKH-26 (rot) gefärbt, wohingegen die nicht-apoptotischen ungefärbt blieben.

Für die Versuche ohne die Anwesenheit von humanem Serum wurden die einzelnen Ansätze jeweils als 100- μ l-Ansätze in Medium mit 1% FCS erstellt. Um den Einfluss apoptotischer Zellen auf die Produktion reaktiver Sauerstoffradikale von PMN zu untersuchen, wurde ein Co-Kultur-Ansatz aus 2,5 x 10⁵ apoptotischen PMN und 2,5 x 10⁵ nicht-apoptotischen PMN verwendet. Als Vergleichskontrollen wurden diese beiden Zellpopulationen als Mono-Kultur-Ansätze betrachtet. Dabei bestand der eine Mono-Kultur-Ansatz aus 5 x 10⁵ apoptotischen PMN und der andere aus 5 x 10⁵ nicht-apoptotischen PMN. Dieses Ansatz-Triplet bestehend aus einem Co-Kultur-Ansatz und zwei Mono-Kultur-Ansätzen wurde für jeden Versuch doppelt angelegt., da ein Triplet im gesamten Versuch keinen zusätzlichen Stimulus erhielt und ein Triplet im weiteren Versuchsverlauf einen zusätzlichen Stimulus aus Formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin (fMLP) erhielt. Alle Ansätze wurden aber zunächst bei 37° C und 5 % CO₂ für eine Stunde inkubiert.

Für den Nachweis der reaktiven Sauerstoffradikale wurde in jeden Ansatz der beiden Ansatz-Triplets 1 μM DHR gegeben und für 5 Minuten bei 37° C und 5 % CO_2 inkubiert. Anschließend wurden in die Ansätze des einen Ansatz-Triplets für die oben genannte Stimulation jeweils 1 μM fMLP pipettiert und in die Ansätze des unstimulierten Ansatz-Triplets die entsprechende Menge Medium mit 1% FCS. Das Medium mit 1% FCS diente dabei dem Ausschluss einer mechanischen Stimulationskomponente durch das Pipettieren. Außerdem sollte das Gesamtvolumen aller Ansätze stets gleich bleiben. Damit wurden die Ansätze erneut 5 Minuten bei 37° C und 5 % CO_2 inkubiert. Danach wurden alle Ansätze auf Eis gestellt und die Zellen mit der Durchflusszytometrie analysiert. Dafür lag dann ein unstimuliertes Ansatz-Triplet vor, welches nur DHR und Medium mit 1 % FCS erhalten hatte, und ein stimuliertes Ansatz-Triplet, welches DHR und fMLP erhalten hatte.

Der gesamte Versuch wurde noch einmal etwas verändert wiederholt, wobei die Zellinkubation bis zur DHR-Zugabe in Medium ohne FCS durchgeführt wurde, welches mit 33% humanem Serum versetzt war. Vor der DHR-Zugabe wurden die Ansätze abzentrifugiert und jeweils in 100 μl Medium mit 1% FCS aufgenommen. Danach wurde weiter nach dem oben beschriebenen Prozedere vorgegangen.

3.2.11. Zytokin-Nachweis in Zellkultur-Überständen

Für die Bestimmung der Menge der Zytokinproduktion durch PMN und den Einfluss des Kontaktes mit apoptotischen Zellen auf diese, wurden zellfreie Überstände aus Zellkulturen mit bestimmten kommerziell verfügbaren „ELISA-Sets“ untersucht. Zur Gewinnung der Überstände wurden die verschiedenen Zellkulturen in 48-Loch-Gewebekulturplatten mit einem Flachboden als jeweils 1-ml-Ansätze angelegt. Die Zellkulturen wurden in verschiedenen Kombinationen der Zelltypen und Stimulationen erstellt. Um den Einfluss apoptotischer Zellen auf die Zytokinsekretion durch PMN zu untersuchen, wurde eine Co-Kultur aus 1×10^6 nicht-apoptotischen PMN und 4×10^6 apoptotischen PMN erstellt. Als Vergleichskontrollen wurden diese beiden Zellpopulationen als Mono-Kultur betrachtet. Dabei bestand der eine Mono-Kultur-Ansatz aus 1×10^6 nicht-apoptotischen PMN und der andere aus 4×10^6 apoptotische PMN. Da sich in dem Co-Kultur-Ansatz aus 1×10^6 nicht-apoptotischen PMN und 4×10^6 apoptotischen PMN eine deutlich höhere Gesamt-Zellkonzentration befand als in dem Mono-Kultur-Ansatz aus 1×10^6 nicht-apoptotischen PMN, wurde als zusätzliche Kontrolle ein Monokultur-Ansatz mit 5×10^6 nicht-apoptotischen PMN angelegt, um die unterschiedliche Zellkonzentration als Störgröße einschätzen zu

können. Alle Kultur-Ansätze wurden für 12 Stunden in einem Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze in 1,5-ml-Eppendorfgläser überführt und bei $425 \times g$ abzentrifugiert. Die zellfreien Überstände wurden abgenommen, für die einzelnen ELISA in die dafür benötigten Mengen aliquotiert und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Alle Versuche wurden sowohl in Medium, als auch in Medium ohne FCS mit 33% humanem Serum durchgeführt.

IL-8 wurde mit „human IL-8 ELISA CytoSet™“ gemessen, IP-10 mit dem „human IP-10 ELISA CytoSet™“, TNF- α mit dem „OptEIA™ human TNF- α Set“ und IL-10 mit „OptEIA™ human IL-10 Set“. Bei allen ELISA-Versuchen wurde nach den jeweiligen Protokollen der Hersteller vorgegangen.

3.2.12. Inkubation apoptotischer und nicht-apoptotischer PMN in C1q-defizientem Serum

Die apoptotischen PMN wurden in diesen Versuchen mit PKH-67 (grün) gefärbt und die nicht-apoptotischen PMN mit PKH-26 (rot). Diese wurden als 100- μl -Ansätze mit jeweils 1×10^6 nicht-apoptotischen PMN und 4×10^6 apoptotischen PMN in Medium ohne FCS erstellt, wobei ein Ansatz mit 33% C1q-defizientem, allogenen, humanem Serum versetzt wurde und mit einem Ansatz, der mit 33% autologem, humanem Serum versetzt war, verglichen wurde. Als weitere Kontrolle diente ein Ansatz, in dem sich die Zellen in Medium ohne FCS befanden.

Alle Ansätze wurden mit GM-CSF und IFN- γ stimuliert und für 2 Stunden inkubiert (für die jeweiligen Konzentrationen der Stimulationen in den Ansätzen siehe Kapitel 3.2.9). Anschließend wurden die Zellen mit dem Durchflusszytometer analysiert.

3.2.13. Fluoreszenzmikroskopie

Auf luftgetrocknete, paraformaldehydfixierte Zytospinpräparate fluoreszenzgefärbter Zellen wurde ein Tropfen „Mounting Fluid“ gegeben und darauf ein Deckglas gesetzt, das mit handelsüblichem Nagellack fixiert wurde. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Präparate bei 630-facher Vergrößerung im Rot-Grün-Filter beurteilt.

3.2.14. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (oder auch FACS-Analyse) 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 Fluoreszenzlicht der Wellenlänge 530nm (FITC, PKH67) detektiert, im FL-2-Kanal Licht der Wellenlänge 585 nm (Phycoerythrin (PE), PI, PKH26). Zellen können mit verschiedenen Fluochromen gefärbt werden, um sie in der Durchflusszytometrie voneinander getrennt darstellen zu können.

Die Darstellung der aufgenommenen Zelleigenschaften erfolgt in Form von Dotplots 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 (siehe als Beispiel für „Gates“ [Abbildung 6](#)).

Da die Fluoreszenzspektren der Emission im FL-1- und FL-2-Kanal zu einem Teil überlappend sind, muss vor einer Analyse in der Durchflusszytometrie eine Kompensation in beiden Kanälen durchgeführt werden, um die Trennschärfe zu erhöhen. Dafür wurden in jedem Experiment zunächst ungefärbte PMN und ungefärbte apoptotische Zellen als Einzelansätze verwendet, um eine Eigenfluoreszenz auszuschließen. Danach wurden die Ansätze mit gefärbten Zellen als Einzelansätze verwendet, um die Kompensation für jeweils den Kanal durchzuführen, der einen bestimmten Teil des Fluoreszenzspektrums abbildet. Erst nach dieser Grundeinstellung wurde mit der eigentlichen Analyse der Ansätze des entsprechenden Experimentes im Durchflusszytometer begonnen. Dabei wurden alle Ansätze eines Experimentes mit den gleichen Grundeinstellungen analysiert, um eine Vergleichbarkeit zwischen den Ansätzen zu gewährleisten.

3.2.15. Statistische Bearbeitung

Durch die Messungen verschiedener Zytokine wurde untersucht, ob es durch den Kontakt mit apoptotischen Zellen zu einer Veränderung der Zytokinsekretion in PMN kommt. Es handelte sich dabei jeweils innerhalb eines Experiments um die Zellen eines Spenders. Der einzige Unterschied zwischen den PMN bestand in einer Variablen, den Kontakt mit apoptotischen Zellen. Das bedeutet, dass die eine Gruppe mit apoptotischen Zellen inkubiert wurde und die anderen nicht. Aus diesem Versuchsaufbau konnten die Hypothese „Es kommt zu einer veränderten Zytokinsekretion durch den Kontakt zu apoptotischen Zellen“ und die Null-Hypothese „Es kommt zu keiner veränderten Zytokinsekretion durch den Kontakt zu apoptotischen Zellen“ abgeleitet werden. Um zu entscheiden, ob die Hypothese oder die Null-Hypothese angenommen werden muss, dient die statistische Aufarbeitung der Ergebnisse. Es soll damit unterschieden werden, ob die Unterschiede zwischen den Vergleichsansätzen zufällig aufgetreten sind, oder ob der Unterschied wirklich existiert, also signifikant ist. Da anzunehmen ist, dass es sich bei den Zytokindaten um normalverteilte Daten handelt, wurde bei dem oben beschriebenen Versuchsaufbau der gepaarte T-Test verwendet. Die Hypothese „Es kommt zu einer veränderten Zytokinsekretion durch den Kontakt zu apoptotischen Zellen“ gilt dabei als angenommen, wenn sich ein p-Wert < 0.05 ergibt. Bei einem p-Wert > 0.05 muss die Null-Hypothese „Es kommt zu keiner veränderten Zytokinsekretion durch den Kontakt zu apoptotischen Zellen“. Dies würde bedeuten, dass gemessene Unterschiede zufällig aufgetreten sind und die Werte um den gleichen Mittelwert verteilt sind.

In dem Vergleich der Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN, die entweder mit humanem Serum oder mit humanem C1q-defizienten Serum inkubiert wurden, handelt es sich für die statistische Bearbeitung um einen ähnlichen Versuchrahmen, wie bei den Versuchen zu der Zytokinsekretion. Die Zellen stammten auch hier innerhalb eines Experiments vom selben Spender, und der Unterschied bestand in nur einer Variablen, dem Fehlen von C1q im Serum. Deswegen wurde auch auf diese Daten der gepaarte T-Test angewendet. Die Hypothese lautet in diesem Fall „Durch das Fehlen von C1q kommt es zu einer verminderten Phagozytose“ und die Nullhypothese „Durch das Fehlen von C1q kommt es zu keiner verminderten Phagozytose“.

4. Ergebnisse

4.1. Vorversuche

Um die einzelnen Bestandteile der Fragestellung dieser Dissertation bearbeiten zu können, wurden zunächst einige Vorversuche durchgeführt. Diese dienten der Prüfung der Reinheit der Zellen, des Gehalts an apoptotischen Zellen und dem Funktionieren des Phagozytosemodells apoptotischer Zellen durch PMN. Dazu gehörte auch die Zellfärbung mit PKH-Farbstoffen, um die Phagozytose überhaupt in der Fluoreszenz-Mikroskopie und der Durchflusszytometrie darstellen zu können. Nur durch diese fundierte Grundlage wurde es überhaupt möglich, den Einfluss apoptotischer Zellen auf die Funktionen neutrophiler Granulozyten untersuchen zu können.

4.1.1. Reinheit der neutrophilen Granulozyten

Um den Einfluss apoptotischer Zellen auf die Funktionen neutrophiler Granulozyten untersuchen zu können, musste gewährleistet sein, dass in den Versuchen auch eine ausreichend hohe Reinheit der PMN vorliegt, da durch eine zu starke Verunreinigung mit anderen Zelltypen eine unberechenbare Störgröße vorliegen würde. Nach der Isolierung wurde deswegen die Reinheit der gewonnenen PMN kontrolliert, indem auf einem nach Giemsa gefärbten Zytozentrifugenpräparat die Zellen morphologisch untersucht wurden. Demnach betrug die Reinheit der gewonnenen Granulozyten durchschnittlich über 99,9 %. Unter den Granulozyten waren neben den neutrophilen PMN spenderabhängig 0,1-5% eosinophile Granulozyten. Durch die Zytozentrifugenpräparate konnte auch die Morphologie der PMN untersucht werden, um die Vitalität der Zellen zu untersuchen. Die apoptotischen Zellen haben das typische kondensierte Kernchromatin, wodurch sich der Kern rund darstellt. Die nicht-apoptotischen Zellen weisen hingegen den typischen gelappten Kern der PMN auf (siehe Abbildung 4). Die PMN haben dabei ebenfalls durchschnittlich über 99,9 % einen typisch gelappten Kern gezeigt.

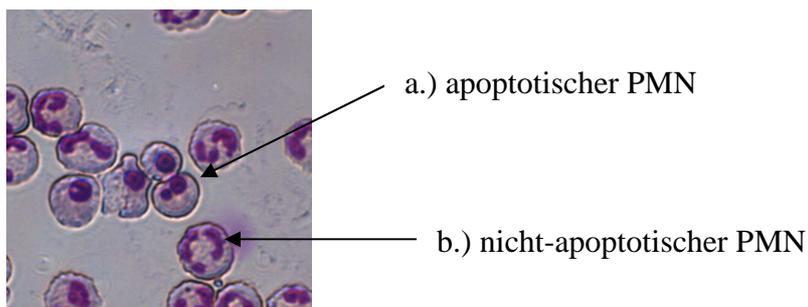


Abbildung 4: Apoptotische und nicht-apoptotische PMN gefärbt nach Giemsa.

Zellsuspensionen aus jeweils 5×10^4 apoptotischen PMN und 5×10^4 nicht-apoptotischen PMN in $100 \mu\text{l}$ Medium wurden durch Zentrifugation mit einer Zytocentrifuge bei $400 \times g$ auf Objektträger gebracht. Anschließend wurden die Zellen für 5 Minuten in einem Methanolbad fixiert, luftgetrocknet und anschließend in einem Bad aus Giemsa-Färbelösung für 30 Minuten gefärbt. Der mit a.) markierte apoptotische PMN zeigt das typische kondensierte Kernchromatin, wodurch sich der Kern rund darstellt. Der mit b.) markierte nicht-apoptotische PMN weist hingegen den typischen gelappten Kern der PMN auf.

4.1.2. Reinheit der apoptotischen Zellen

Für die in dieser Dissertation bearbeitete Fragestellung war die Gewinnung von apoptotischen Zellen notwendig. Die zur Induktion der Apoptose mit UV-Licht bestrahlten PMN wurden nach der viersündigen Inkubation durch eine Färbung mit Annexin-V in der Durchflusszytometrie untersucht. Dabei zeigten sich die bestrahlten Zellen zu über 80 % positiv für Annexin-V, was wiederum einem Anteil apoptotischer Zellen von über 80 % entspricht (siehe [Abbildung 5](#)).

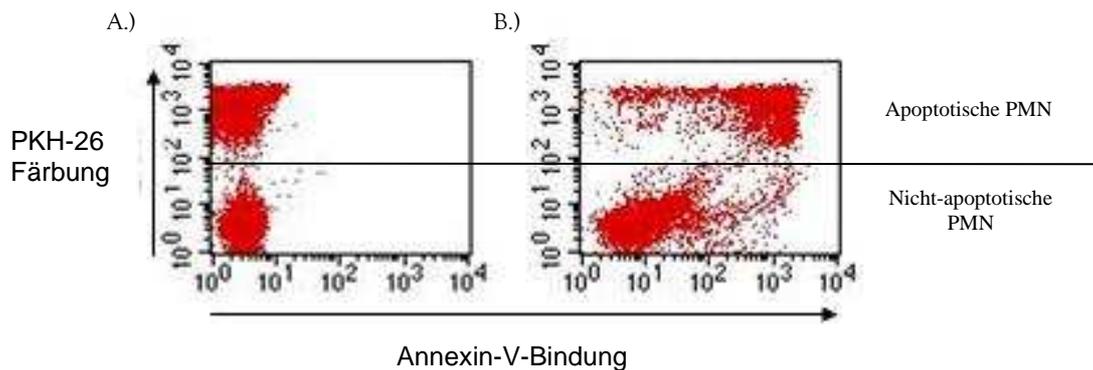


Abbildung 5: Annexin-V-Färbung zur Unterscheidung zwischen apoptotischen und nicht-apoptotischen PMN.

Bei den hier dargestellten Zellen handelt es sich um einen Vergleich der Anfärbbarkeit mit Annexin-V von UV-Licht-bestrahlten PMN mit den nicht bestrahlten PMN. Dafür wurden die bestrahlten PMN zunächst mit PKH-26 gefärbt, wohingegen die nicht bestrahlten PMN zunächst ungefärbt blieben, um die beiden Zellpopulationen in der Durchflusszytometrie klar trennen zu können. Es wurden Co-Kultur-Ansätze aus jeweils $2,5 \times 10^5$ bestrahlten und $2,5 \times 10^5$ nicht bestrahlten PMN erstellt. Ein Co-Kultur-Ansatz wurde anschließend mit Annexin-V gefärbt und ein Co-Kultur-Ansatz blieb als Negativ-Kontrolle ungefärbt. Diese Ansätze wurden in der Durchflusszytometrie miteinander verglichen.

In beiden Bildern ist im oberen Bildanteil die bestrahlte, mit PKH-26 gefärbte Zellpopulation dargestellt und im unteren Bildanteil die nicht-bestrahlte Zellpopulation.

A.) Die Negativ-Kontrolle ohne die zusätzliche Färbung mit Annexin-V.

B.) Die beide Populationen sind nach einer zusätzlichen Färbung mit Annexin-V dargestellt, welches mit einem grün-fluoreszierenden Farbstoff konjugiert wurde. Dabei kommt es zu einer deutlichen Anfärbung apoptotischer Zellen, da diese stark Phosphatidylserin-positiv sind, welches als Bindungsstelle für Annexin dient. Dies zeigt sich in einer Verschiebung der bestrahlten Zellpopulation nach rechts auf der Annexin-V-Achse. Die nicht-bestrahlten Zellen weisen diese Verschiebung nicht auf, da sie nicht-apoptotisch und somit Phosphatidylserin-negativ sind. Der geringe Anteil der Zellen aus der nicht-apoptotischen Zellpopulation, die trotzdem eine leichte Verschiebung zeigen, sind einige früh-apoptotische Zellen, da ein 100%-Anteil nicht-apoptotischer Zellen nicht gewährleistet werden kann.

4.1.3. Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN

Als Grundlage für den Einfluss apoptotischer Zellen auf die Funktionen von neutrophilen Granulozyten dient ein entsprechendes experimentelles Phagozytosemodell, also der Nachweis der Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN. In der Durchflusszytometrie konnte nach einer Färbung mit unterschiedlichen PKH-Farbstoffen deutlich gezeigt werden, dass in einer Co-Kultur aus apoptotischen und nicht-apoptotischen PMN apoptotisches Material von den nicht-apoptotischen PMN aufgenommen wird, sofern autologes oder allogenes humanes Serum anwesend ist (siehe [Abbildung 6](#)). Der gleiche Effekt konnte ebenfalls in der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden (siehe [Abbildung 7](#)).

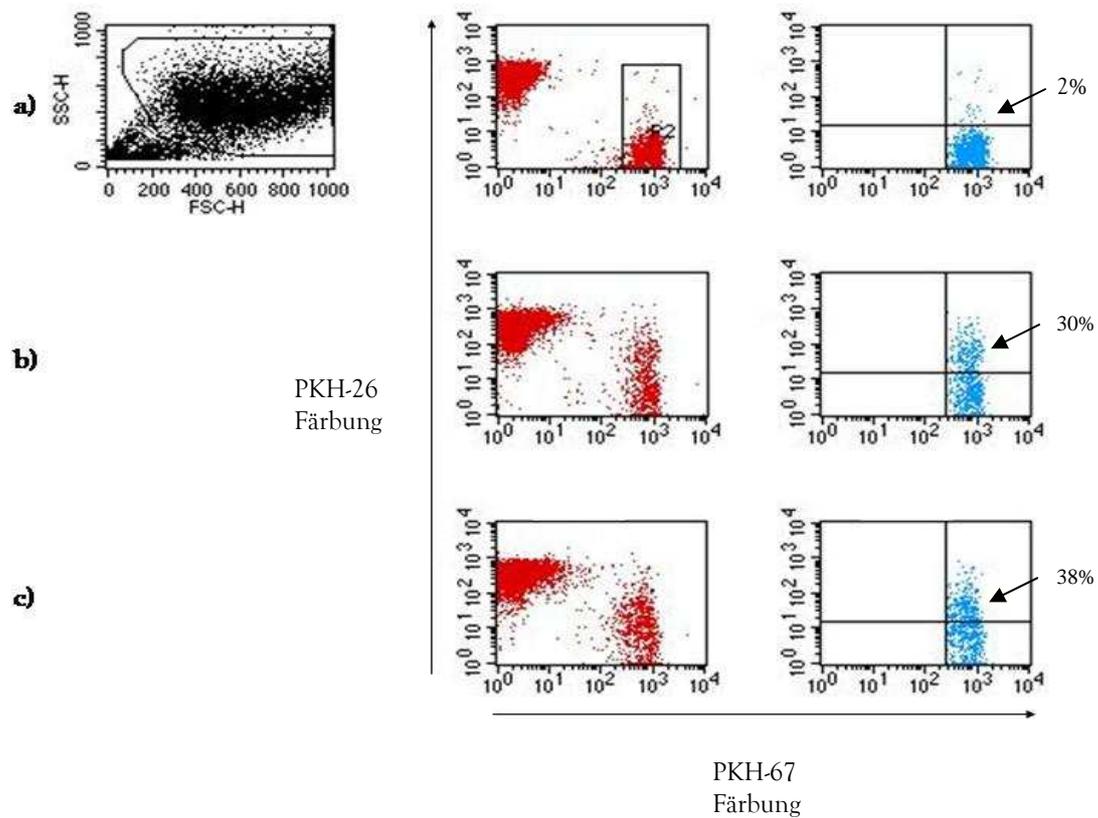


Abbildung 6: FACS-Analyse der Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN.

Die PMN wurden zunächst mit PKH-67 gefärbt und die apoptotischen Zellen mit PKH-26. Es wurden anschließend Co-Kultur-Ansätze mit 4×10^5 PKH26 (rot) gefärbten apoptotischen PMN mit 1×10^5 PKH67 (grün) gefärbten vitalen PMN in einem Volumen von 100 μ l erstellt. Die Zellen befanden sich dabei in Medium ohne FCS, welches mit 33 % mit autologen humanen Serum versetzt war (b). Als Negativ-Kontrolle diente ein Co-Kultur-Ansatz, welcher kein Serum enthielt (a). Als weitere Kontrolle diente ein Co-Kultur-Ansatz, welcher anstatt mit autologen humanen Serum mit einem allogenen humanem Serum versetzt war (c).

Die Zellen wurden für 90 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ co-inkubiert und anschließend auf Eis gestellt, um sie in der Durchflusszytometrie analysieren zu können.

In allen Abbildungen, in denen die Zellen nach den Färbungen mit PKH-26 und PKH-67 aufgetrennt sind, entsprechen die PMN durch eine Färbung mit PKH-67 der Population unten rechts und die apoptotischen Zellen durch eine Färbung mit PKH-26 der Population oben links. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente

a.) Beide Zellpopulationen sind ohne Serum co-inkubiert worden. Das linke Bild stellt die Zellen nach Größe (FSC) und Granularität (SSC) dar. Es wird dabei ein „Gate“ auf den Bereich gelegt, indem die intakten Zellen liegen, um die genauere Analyse ohne Zell-Debris zu machen. Diese Zellen aus dem „Gate“ wurden dann im mittleren Bild getrennt nach ihren Färbungen mit PKH-26 und PKH-67 dargestellt. Um nur die nicht-apoptotischen PMN zu untersuchen, wurde auf diese ein weiteres „Gate“ gesetzt. Indem das erste und das zweite „Gate“ kombiniert wurden, stellt das rechte Bild nur die nicht-apoptotischen PMN dar. Es kommt nur zu einer geringfügigen Phagozytose der apoptotischen Zellen durch die nicht-apoptotischen PMN und somit zu keiner doppelten Positivität von Zellen.

b.) Beide Populationen sind mit autologem humanem Serum co-inkubiert worden. Es kommt zu einer Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN weswegen mit PKH-26 gefärbtes Zellmaterial in die mit PKH-67 gefärbten nicht-apoptotischen PMN gelangt und diese somit positiv für beide Farbstoffe werden.

c.) Beide Populationen sind mit allogenem humanem Serum co-inkubiert worden. Es kommt ebenfalls zu einer Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN weswegen mit PKH-26 gefärbtes Zellmaterial in die mit PKH-67 gefärbten nicht-apoptotischen PMN gelangt und diese somit positiv für beide Farbstoffe werden.

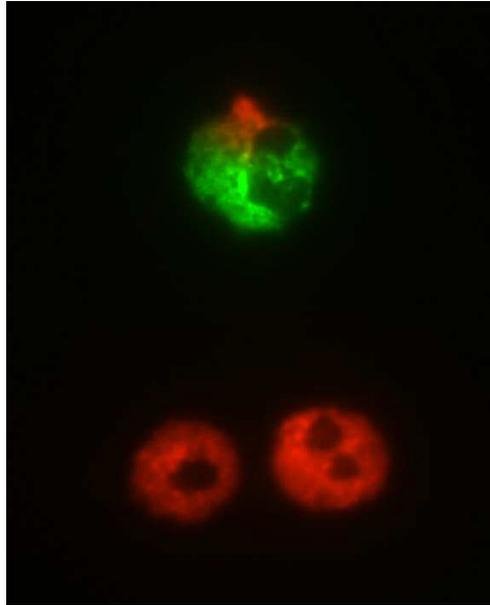


Abbildung 7: Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN.

Die PMN wurden zunächst mit PKH-67 (grün) und die apoptotischen Zellen mit PKH-26 (rot) gefärbt. Es wurden anschließend Co-Kultur-Ansätze mit 4×10^5 roten apoptotischen PMN und 1×10^5 grünen vitalen PMN in einem Volumen von 100 μ l erstellt. Die Zellen befanden sich dabei in Medium ohne FCS, welches mit 33 % mit autologen humanen Serum versetzt war. Die Zellen wurden für 90 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ co-inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Von dieser Co-Kultur wurde ein Zytospinpräparat erstellt, welches jedoch nicht nach Giemsa gefärbt wurde, sondern unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht wurde (siehe 3.2.4 und 3.2.13.)

Im untern Bildanteil zeigen sich zwei apoptotische Zellen, die mit dem rot-fluoreszierenden Membranfarbstoff PKH-26 gefärbt wurden. Sie zeigen das für apoptotische Zellen typische kondensierte Kernchromatin. Im oberen Bildanteil zeigt sich ein PMN, der mit dem grün-fluoreszierenden Membranfarbstoff PKH-67 gefärbt wurde und die für PMN typische gelappte Kernform hat. Am oberen Pol zeigt sich ein roter Anteil im PMN, da dieser in der Serum-Inkubation apoptotisches Zellmaterial phagozytiert hat, welches mit PKH-26 gefärbt worden war.

4.2. Apoptotische Zellen senken die Produktion von Sauerstoffradikalen in PMN

Eine wichtige Funktion der PMN stellt die Phagozytose und das Abtöten von Mikroorganismen dar. Diese Abtötung geschieht unter anderem durch reaktive Sauerstoffradikale, welche durch verschiedene Stimuli, wie z. B. fMLP oder bakterielles LPS, von PMN gebildet werden. Die Messung dieser Produktion in PMN geschah durch DHR, welches durch die intrazellulären Sauerstoffradikale oxidiert wird und damit fluoreszierend in der FACS-Analyse messbar wird (siehe hierzu 3.2.10). Um die apoptotischen Zellen von den nicht-poptotischen PMN in der FACS-Analyse getrennt analysieren zu können, wurden die

apoptotischen Zellen vorher mit PKH-26 gefärbt, wohingegen die nicht-apoptotischen PMN ungefärbt blieben. Um einen Einfluss des Verhältnisses der Konzentration der Zellen zur Konzentration des DHR zu vermeiden, enthielten die Einzelansätze (entweder apoptotische oder nicht-apoptotische PMN) 5×10^5 Zellen in 100 μ l und die Co-Kultur $2,5 \times 10^5$ apoptotische PMN und $2,5 \times 10^5$ nicht-apoptotische PMN in 100 μ l.

In der Co-Kultur mit apoptotischen Zellen produzieren die PMN deutlich weniger Sauerstoffradikale als die PMN der Monokultur (siehe [Abbildung 8](#)). Es zeigt sich, dass der Gehalt an Sauerstoffradikalen in den PMN ohne zusätzlichen Stimulus sowohl ohne als auch mit der Anwesenheit apoptotischer Zellen zunächst annähernd identisch ist (graue und grüne Kurve des Histogramms rechts). Bei der zusätzlichen Stimulation mit fMLP fällt jedoch auf, dass die PMN aus den Ansätzen ohne apoptotische Zellen (blaue Kurve) mehr Sauerstoffradikale enthalten als die PMN, welche gleichzeitig mit apoptotischen Zellen inkubiert wurden (rote Kurve). Dieser Effekt trat sowohl ohne als auch mit der Anwesenheit von humanem Serum in den Ansätzen während der Inkubation auf.

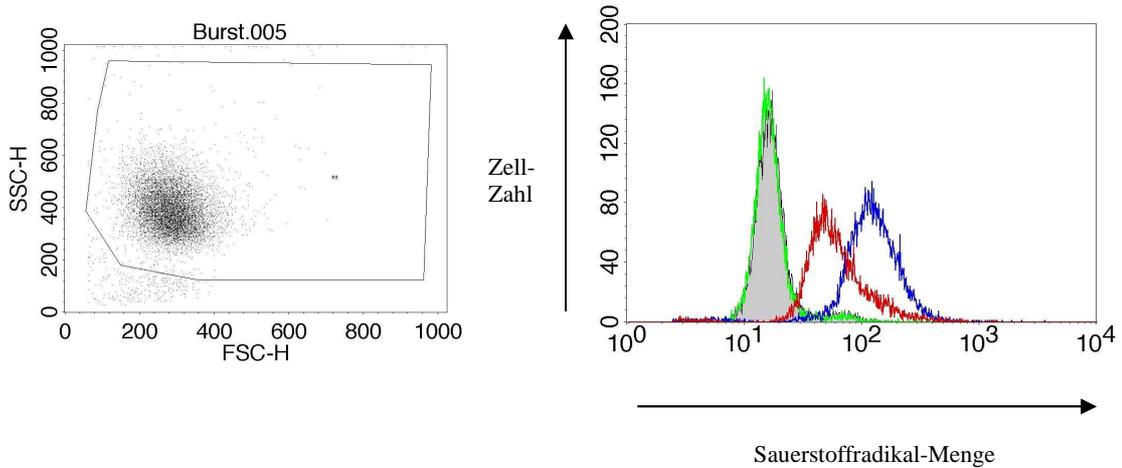


Abbildung 8: FACS-Analyse zur Sauerstoffradikal-Produktion in PMN.

Die in dieser Abbildung dargestellten Ergebnisse stehen stellvertretend für jeweils drei Versuche sowohl ohne als auch mit der Anwesenheit humanen Serums mit dem gleichen zu beobachtenden Effekt. In der linken Abbildung ist ein Dotplot dargestellt, in welchem die Zellen nach Größe (FSC) und Granularität (SSC) dargestellt werden. Durch den darin eingezeichneten Rahmen werden nur die Zellen in die Untersuchung mit eingeschlossen, die die Größe und Granularität von Granulozyten besitzen. Da die apoptotischen Zellen zunächst mit dem PKH-26-Farbstoff gefärbt wurden und die PMN ungefärbt blieben, konnten die PMN isoliert in der Durchflusszytometrie analysiert werden, auch wenn sie sich in der Co-Kultur befanden. Im rechten Bild sind diese PMN in einem Histogramm dargestellt, um die verschiedenen Ansätze miteinander zu vergleichen. In diesem Histogramm bedeutet eine Verschiebung der Populationen nach rechts eine verstärkte Produktion von Sauerstoffradikalen. Die Sauerstoffradikale bewirken die Oxidierung und dadurch Fluoreszenz von DHR, welche durch die FACS-Analyse detektierbar ist. Je mehr Sauerstoffradikale produziert werden, desto mehr DHR wird in den Zellen durch Oxidation fluoreszierend und desto stärker ist die Verschiebung im Bild nach rechts. Die ausgefüllte graue Kurve stellt die unstimulierten PMN der Monokultur dar und die grüne Kurve die unstimulierten PMN der Co-Kultur mit apoptotischen Zellen. Die blaue Kurve stellt die mit fMLP stimulierten PMN der Monokultur dar und die rote Kurve die mit fMLP stimulierten PMN aus der Co-Kultur mit apoptotischen Zellen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die PMN aus der Co-Kultur mit apoptotischen Zellen trotz der gleichen Stimulation mit fMLP deutlich weniger Sauerstoffradikale produzieren, als die entsprechenden PMN der Monokultur.

4.3. Wirkung von apoptotischen Zellen auf die Zytokin-Freisetzung durch PMN

Als eine wesentliche Funktion der PMN muss die Sekretion von Zytokinen erachtet werden. Um einen Einfluss apoptotischer Zellen darauf zu bestimmen, wurden Co-Kulturen aus PMN mit apoptotischen Zellen im Verhältnis 1:4 angelegt und mit entsprechenden Mono-Kulturen verglichen. Diese enthielten entweder nur apoptotische Zellen oder nur nicht-apoptotische PMN. Es wurden folgende Ansätze angelegt:

- 1.) 4×10^6 apoptotische Zellen
- 2.) 1×10^6 nicht-apoptotische PMN
- 3.) 4×10^6 apoptotische Zellen + 1×10^6 nicht-apoptotische PMN
- 4.) 5×10^6 nicht-apoptotische PMN

Diese Ansätze befanden sich jeweils in 1 Milliliter Volumen. Dieses Volumen bestand in einer Ansatz-Reihe aus Medium ohne FCS, welches jedoch mit 33% humanem Serum versetzt wurde. Eine weitere Ansatz-Reihe enthielt zum Vergleich Medium. In den jeweiligen Ansatzreihen wurden diese Ansätze repetitiv angelegt, um sie zum einen unstimuliert zu lassen und zum anderen mit verschiedenen Stimulations-Kombinationen zu versehen. Der Ansatz 4 mit den 5×10^6 nicht-apoptotische PMN diente jeweils als Kontrolle, um einen Effekt durch die erhöhte Zell-Konzentration der Co-Kultur aus apoptotischen Zellen und nicht-apoptotischen PMN des Ansatz 3 im Vergleich zur Mono-Kultur aus nicht-apoptotischen PMN des Ansatz 2 einschätzen zu können.

Diese Ansätze wurden über Nacht in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und die zellfreien Überstände am kommenden morgen abgenommen. In diesen Überständen wurden dann die jeweiligen Zytokine mit den verschiedenen industriellen ELISA-Sets bestimmt.

Die Wirkung apoptotischer Zellen auf die Sekretion von Zytokinen aus PMN ist in **Tabelle 1** zusammengefasst.

4.3.1. Verminderte IP-10-Sekretion durch Co-Kultur mit apoptotischen PMN

Als proentzündliches Zytokin wurde die Sekretion von IP-10 durch PMN untersucht. Es dient der Rekrutierung von Th-1- und NK-Zellen, auf welche es chemotaktisch wirkt. Es wird von PMN besonders nach einer Stimulation mit LPS und IFN- γ ausgeschüttet (Tamassia et al., 2007).

Deswegen waren die Ansätze mit genau dieser Stimulation für die Untersuchung der IP-10-Sekretion durch PMN von besonderem Interesse. Die Stimulation mit LPS und IFN- γ bewirkt eine hohe Sekretion von IP-10 durch die PMN der Monokultur (siehe [Abbildung 9](#)). Apoptotische PMN hingegen produzieren unter dieser Stimulation kaum IP-10. In der Co-Kultur aus nicht-apoptotischen und apoptotischen PMN im Verhältnis 1:4 kommt es in der Anwesenheit von humanm Serum zu einer deutlich verminderten Freisetzung von IP-10 im Vergleich zur Einzelkultur der nicht-apoptotischen PMN. Auch in dem Ansatz mit der fünffachen Konzentration mit nicht-apoptotischen PMN ist die Konzentration an IP-10 deutlich höher als in der Co-Kultur, so dass eine Erklärung dieser Ergebnisse durch unterschiedliche Zellkonzentrationen eher unwahrscheinlich ist.

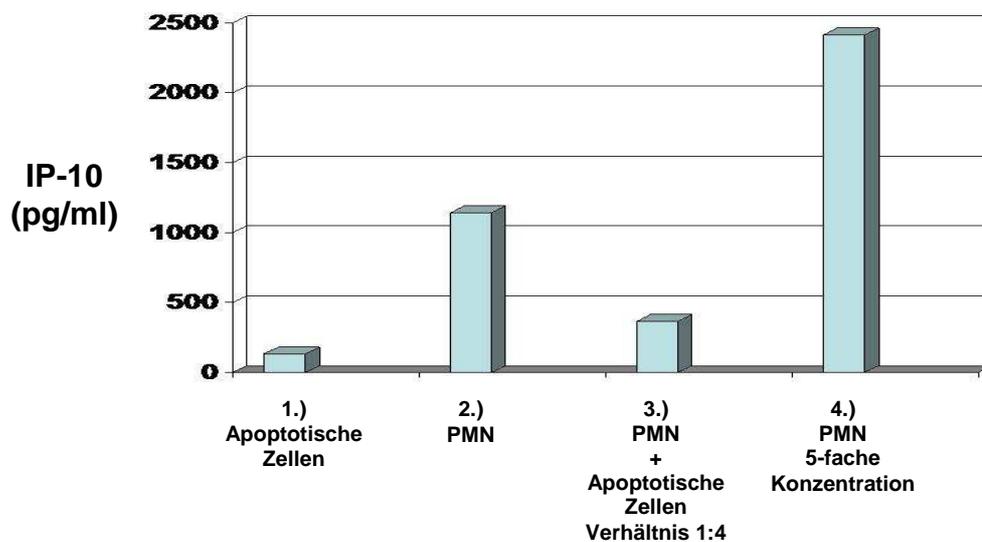


Abbildung 9: IP-10-Freisetzung durch PMN in der An- und Abwesenheit von apoptotischen Zellen in der Serum-Kultur.

Der erste Ansatz enthielt in der 12-Stunden-Inkubation 4×10^6 apoptotische Zellen. Der zweite Ansatz enthielt 1×10^6 PMN. Der dritte Ansatz enthielt 1×10^6 PMN und 4×10^6 apoptotische Zellen und der vierte Ansatz enthielt 5×10^6 PMN. Der vierte Ansatz diente als Kontrolle, um einen Effekt des Gesamt-Zellkonzentrations-Unterschiedes zwischen Ansatz 2 und 3 einschätzen zu können. Die Ansätze haben als zusätzlichen Stimulus LPS und IFN- γ erhalten. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Bei der statistischen Aufarbeitung der Ergebnisse in einem gepaarten *student's t-test* ergibt sich ein Signifikanzniveau von 0.046 (siehe [Abbildung 10](#)).

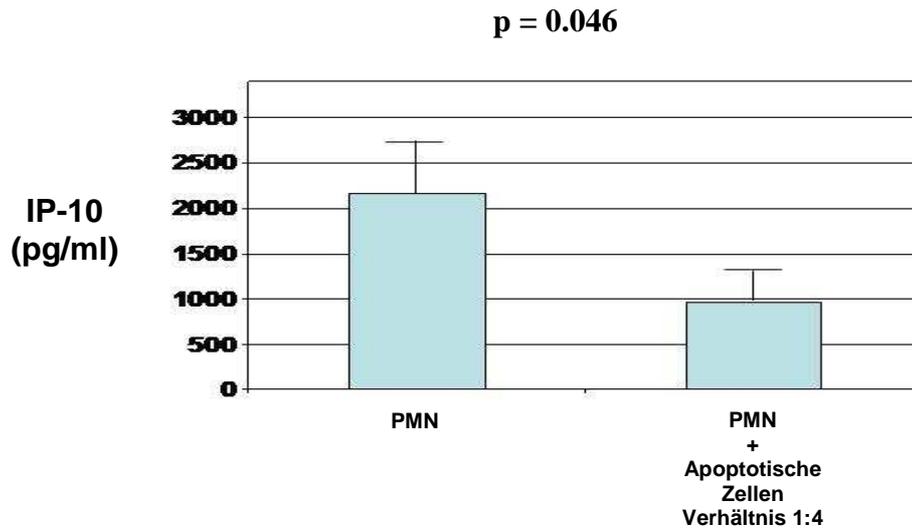


Abbildung 10: Statistische Darstellung der Ergebnisse der IP-10-Elisa-Versuche mit humanem Serum.

Die linke Säule zeigt den Mittelwert aus dem IP-10-Gehalt der Monokulturen der PMN mit der zugehörigen Standardabweichung. Die rechte Säule zeigt den Mittelwert aus dem IP-10-Gehalt der entsprechenden Co-Kulturen aus PMN und apoptotischen Zellen mit der zugehörigen Standardabweichung (n=3).

Interessanterweise konnte dieser Effekt, dass es in der Co-Kultur aus apoptotischen Zellen und PMN zu einem verminderten Gehalt von IP-10 kommt, nicht gezeigt werden, wenn humanes Serum in den Ansätzen fehlte (siehe [Abbildung 11](#)).

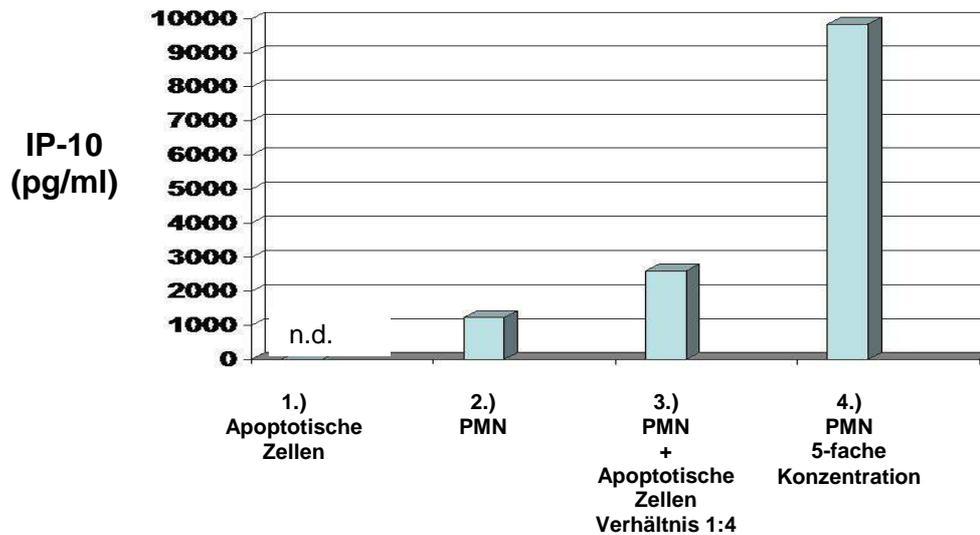


Abbildung 11: IP-10-Freisetzung durch PMN in der An- und Abwesenheit von apoptotischen Zellen ohne Serum.

Der erste Ansatz enthielt in der 12-Stunden-Inkubation 4×10^6 apoptotische Zellen. Der zweite Ansatz enthielt 1×10^6 PMN. Der dritte Ansatz enthielt 1×10^6 PMN und 4×10^6 apoptotische Zellen und der vierte Ansatz enthielt 5×10^6 PMN. Der vierte Ansatz diente als Kontrolle, um einen Effekt des Gesamt-Zellkonzentrations-Unterschiedes zwischen Ansatz 2 und 3 einschätzen zu können. Die Ansätze haben als zusätzlichen Stimulus LPS und IFN- γ erhalten. Im ersten Ansatz war IP-10 nicht detektierbar (n.d.), da es unterhalb der Nachweisgrenze lag. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

4.3.2. Gesteigerte IL-8-Sekretion durch Co-Kultur mit apoptotischen PMN

Das Zytokin IL-8 wurde untersucht, da es in der Literatur als ein typisches von PMN sezerniertes Zytokin ausführlich beschrieben ist. Es wirkt auf PMN selber chemotaktisch und dient dazu, dass PMN in bestimmte Gewebe mit einer erhöhten IL-8-Konzentration einwandern (siehe 1.2.2).

In den Einzelansätzen aus PMN kommt es ohne einen zusätzlichen Stimulus nur zu einer äußerst geringen Freisetzung von IL-8 (siehe [Abbildung 12](#)). Sie ist sogar auf einem vergleichbaren Niveau wie die der Einzelansätze aus apoptotischen Zellen. Interessanterweise kommt es in der Co-Kultur aus nicht-apoptotischer mit apoptotischen PMN in einer Konzentration von 1:4 in der Anwesenheit von 33% humanen Serums zu einer deutlich gesteigerten IL-8-Sekretion. Es wurde zu der Co-Kultur kein weiterer Stimulus hinzu gegeben. Der IL-8-Gehalt ist in den Einzelansätzen apoptotischer und nicht apoptotischer PMN deutlich niedriger und kann nicht durch eine Addition beider Mengen erklärt werden. Auch in

dem Ansatz mit der fünffachen Konzentration der nicht-apoptotischen PMN, der somit die gleiche Gesamtzellkonzentration wie in der Co-Kultur hatte, war die IL-8-Konzentration niedriger, was eine Erklärung dieser Ergebnisse durch eine erhöhte Zell-Konzentration ausschließt.

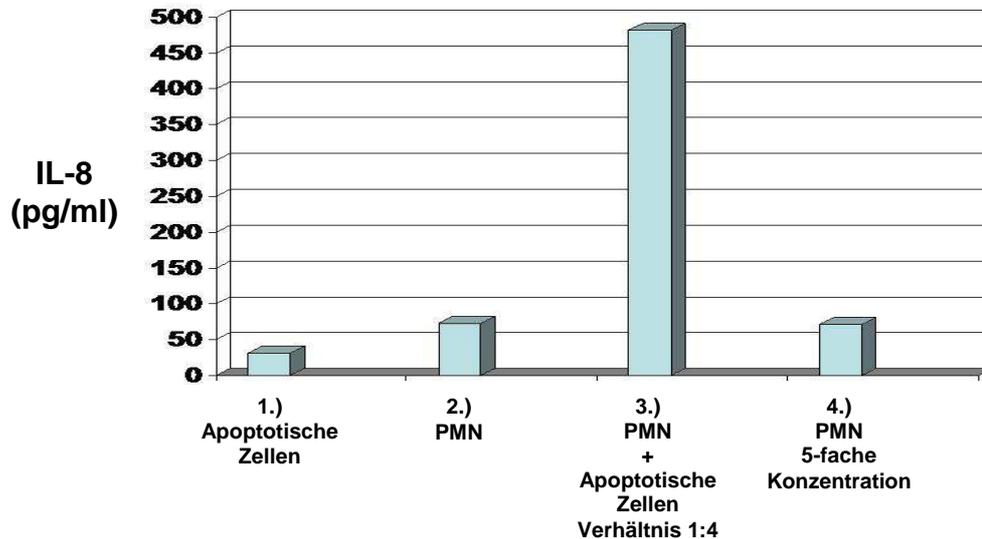


Abbildung 12: IL-8-Freisetzung durch PMN in der An- und Abwesenheit von apoptotischen Zellen in der Serum-Kultur.

Der erste Ansatz enthielt in der 12-Stunden-Inkubation 4×10^6 apoptotische Zellen. Der zweite Ansatz enthielt 1×10^6 PMN. Der dritte Ansatz enthielt 1×10^6 PMN und 4×10^6 apoptotische Zellen und der vierte Ansatz enthielt 5×10^6 PMN. Der vierte Ansatz diente als Kontrolle, um einen Effekt des Gesamt-Zellkonzentrations-Unterschiedes zwischen Ansatz 2 und 3 einschätzen zu können.

Bei der statistischen Aufarbeitung der Ergebnisse in einem gepaarten *student's t-test* ergibt sich ein Signifikanzniveau von 0.0313 (siehe [Abbildung 13](#)). Für diese Berechnung wurden zu den eigenen drei Versuchen zusätzlich die Daten eines Experimentes verwendet, welches von einem anderen Mitglied der Arbeitsgruppe (Herr Dr. rer. nat. Arup Sakar) durchgeführt wurde, welches unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurde, wie die anderen drei.

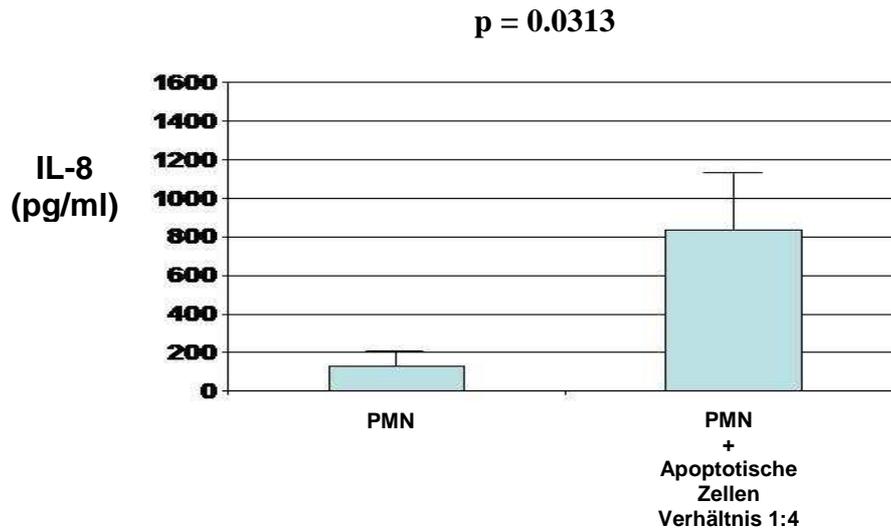


Abbildung 13: Statistische Darstellung der Ergebnisse der IL-8-Elisa-Versuche mit humanem Serum.

Die linke Säule zeigt den Mittelwert aus dem IL-8-Gehalt der Monokulturen der PMN mit der zugehörigen Standardabweichung. Die rechte Säule zeigt den Mittelwert aus dem IL-8-Gehalt der entsprechenden Co-Kulturen aus PMN und apoptotischen Zellen mit der zugehörigen Standardabweichung (n=4).

Wenn in den Ansätzen jedoch kein humanes Serum vorhanden war, so konnte der Anstieg der IL-8-Konzentration der Co-Kultur aus apoptotischen und nicht-apoptotischen PMN im Vergleich zur Monokultur aus PMN nicht beobachtet werden (siehe [Abbildung 14](#)).

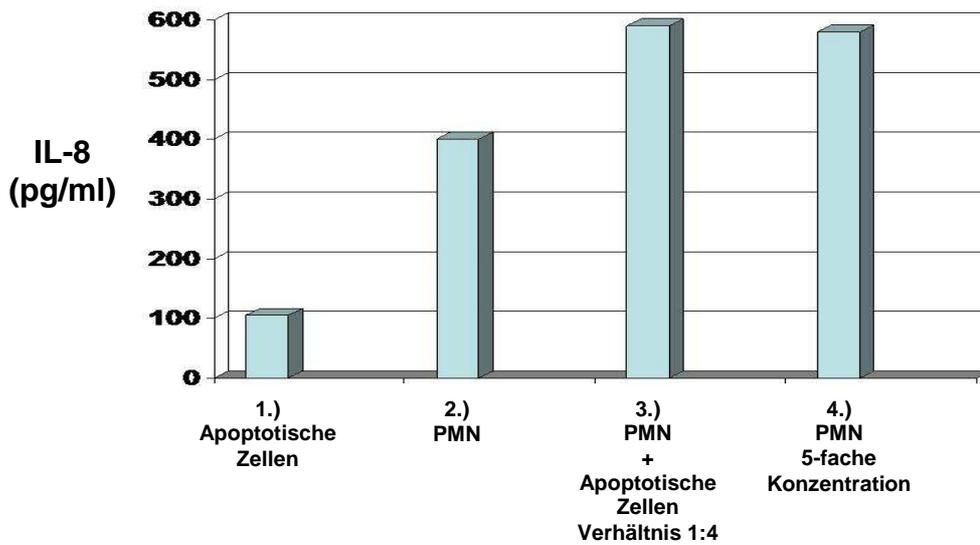


Abbildung 14: IL-8-Freisetzung durch PMN in der An- und Abwesenheit von apoptotischen Zellen ohne Serum.

Der erste Ansatz enthielt in der 12-Stunden-Inkubation 4×10^6 apoptotische Zellen. Der zweite Ansatz enthielt 1×10^6 PMN. Der dritte Ansatz enthielt 1×10^6 PMN und 4×10^6 apoptotische Zellen und der vierte Ansatz enthielt 5×10^6 PMN. Der vierte Ansatz diente als Kontrolle, um einen Effekt des Gesamt-Zellkonzentrations-Unterschiedes zwischen Ansatz 2 und 3 einschätzen zu können. Die Ansätze haben keinen zusätzlichen Stimulus erhalten. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

	IP-10	IL-8
Mit Serum	↓	↑
Ohne Serum	→	→

Tabelle 1 Einfluss auf die apoptotischer Zellen auf die Sekretion von Zytokinen durch PMN

↓ = Senkung, ↑ = Erhöhung, → = gleich bleibend

4.4. Verminderte Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN in C1q-defizientem Serum

Wie bereits im Kapitel 1.4 beschrieben, tritt die Phagozytose apoptotischer PMN durch nicht-apoptotische PMN abhängig von der Anwesenheit von humanem Serum auf. Bisher ist es noch nicht geklärt, welcher Serumbestandteil diese Phagozytose vermittelt. Ein Molekül, welches für diese Vermittlung in Frage kommt, ist C1q des Komplementsystems. Es kommt

besonders im entzündlichen Gewebe vor, wo auch viele apoptotische Zellen anfallen, die durch PMN und andere Phagozyten entfernt werden müssen.

Deswegen wurden Versuche durchgeführt, in denen die Inkubation der Co-Kultur apoptotischer Zellen mit nicht-apoptotischen PMN in humanem Serum mit denen in einem C1q-defizienten Serum verglichen wurden. Als weitere Kontrolle diente ein Ansatz in Medium ohne FCS (siehe [Abbildung 15](#)). Es zeigte sich, dass die Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN am besten in der Anwesenheit von humanem Serum funktioniert und am schlechtesten in Medium ohne FCS. In den Ansätzen, in denen das C1q-defiziente Serum anstatt des humanen Serums verwendet wurde, kam es zu einer ähnlich verminderten Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN wie in den Ansätzen in Medium ohne FCS (siehe [Tabelle 2](#)).

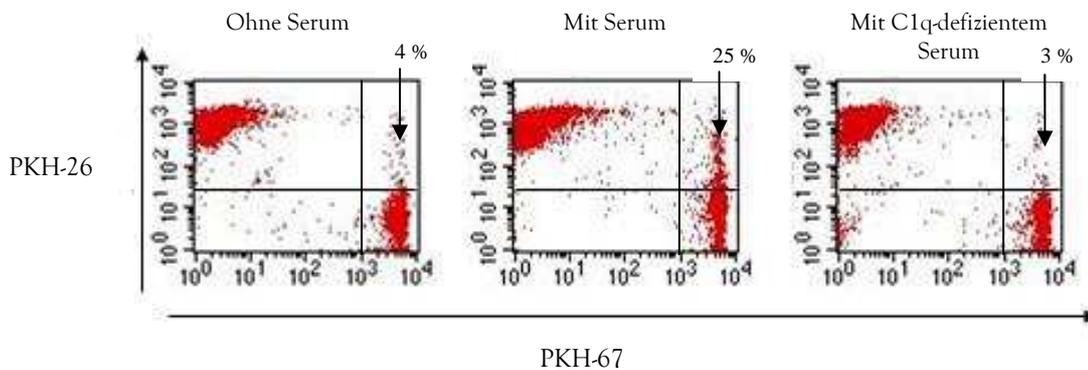


Abbildung 15: FACS-Analyse zum Einfluss von C1q auf die Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN.

Die in dieser Abbildung dargestellten Ergebnisse stehen stellvertretend für drei Versuche mit dem gleichen zu beobachtenden Effekt. Dafür wurden die apoptotischen Zellen und PMN im Verhältnis 4:1 miteinander inkubiert. Die zuvor mit PKH-67 gefärbten PMN stellen sich in der FACS-Analyse unten rechts dar und die mit PKH-26 gefärbten apoptotischen Zellen oben links. Das linke Bild stellt den Ansatz dar, in dem die PMN mit den apoptotischen Zellen nur in Medium ohne FCS inkubiert wurden, das mittlere Bild den Ansatz, in dem sie in einem mit 33 % humanem Serum versetzten Medium ohne FCS inkubiert wurden, und das rechte Bild den Ansatz, in dem Sie in Medium ohne FCS inkubiert wurden, welches zu 33 % mit einem C1q-defizienten Serum versetzt war. Die Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN in der Anwesenheit von humanem Serum ist daran zu erkennen, dass die Population der PMN nach oben ausgestreckt wird, wenn sie mit den Ansätzen ohne humanes Serum verglichen wird. Die Streckung der Population nach oben entsteht dadurch, dass die PMN durch die Phagozytose für beide Farbstoffe positiv werden, für den der PMN und den der apoptotischen Zellen.

4. Ergebnisse

	Inkubation mit humanem Serum	Inkubation mit C1q-defizientem humanem Serum
Versuch 1	23.29 %	2.55 %
Versuch 2	33.68 %	6.14 %
Versuch 3	18 %	6.2 %

p-Wert: 0.0101

Tabelle 2: Phagozytoseraten in humanem Serum und in C1q-defizientem Serum.

Es wurde die Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN in humanem Serum mit der in C1q-defizientem Serum verglichen. Innerhalb eines Experiments handelte es sich dabei um die Zellen desselben Spenders.

5. Diskussion

Die Phagozytose apoptotischer Zellen durch professionelle Phagozyten wurde bisher im Wesentlichen für Makrophagen, Monozyten und Dendritische Zellen beschrieben (siehe Kapitel 1.3). Dementsprechend wurden bisher auch vorwiegend die Auswirkungen der Phagozytose auf die Funktionen eben dieser Phagozyten beschrieben. Bei allen diesen Phagozyten kam es zu einer Verminderung der pro-entzündlichen Funktionen und zu einer Steigerung der anti-entzündlichen Funktionen. Dies passte zu der Grundannahme, dass durch die Abräumung apoptotischer Zellen keine zusätzliche Entzündungsreaktion entsteht. In zahlreichen Publikationen wurde dies anhand von unterschiedlichen Zytokinen beschrieben. Auf der Seite der anti-entzündlichen wird vermehrt IL-10 (Monozyten) und TGF- β (Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen) freigesetzt, während auf der proentzündlichen Seite weniger TNF- α , IL-1 β (beides für Monozyten und Dendritische Zellen) und MIP-2 (Makrophagen) gebildet wird (Byrne et al., 2002; Huynh et al., 2002; Barker et al., 2002; Zhang et al., 2003; Morelli et al., 2003). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass in murinen Makrophagen durch den Kontakt mit apoptotischen Zellen eine vermehrte TGF- β -Sekretion stattfindet, welche wiederum eine verminderte Produktion von Sauerstoffradikalen bewirkt (Freire-de-Lima et al., 2006). In der Literatur sind die Daten zur Sekretion von IL-8 uneinheitlich. Zwar wurde von einigen Gruppen eine verminderte IL-8-Freisetzung beobachtet (Fadok et al., 2001), in anderen Studien zeigte sich jedoch eine erhöhte IL-8-Sekretion durch den Kontakt mit apoptotischen Zellen (Kurosaka et al., 1998). Durch Zellen der Ratte wurde zusätzlich gezeigt, dass auch nicht-spezialisierte Phagozyten, wie z. B. glatte Muskelzellen, apoptotische Zellen aufnehmen können und dadurch in Ihren Funktionen beeinflusst werden. Sie sezernieren danach vermehrt TGF- β , MCP-1 und CINC-1 (entspricht funktionell IL-8 im Menschen) (Fries et al., 2005). Durch die Feststellung, dass auch PMN apoptotische Zellen phagozytieren können, ergab sich die Frage, wie dadurch die Funktionen von PMN beeinflusst werden.

5.1. Verminderte Bildung reaktiver Sauerstoffradikale in PMN durch den Kontakt mit apoptotischen Zellen

Eine Hauptaufgabe der PMN ist die Abtötung von Mikroorganismen. Dies geschieht unter anderem durch reaktive Sauerstoffradikale, die in den PMN generiert und dort mit den phagozytierten Mikroorganismen zusammengebracht werden. Die Produktion reaktiver Sauerstoffradikale kann somit als eine pro-entzündliche Funktion der PMN gewertet werden.

In den vorliegenden Ergebnissen ist ersichtlich, dass PMN in der Anwesenheit apoptotischer Zellen unter zusätzlicher Stimulation mit fMLP weniger Sauerstoffradikale produzieren als PMN, die ohne apoptotische Zellen inkubiert wurden (siehe Abbildung 8). Die geringere Produktion von Sauerstoffradikalen in PMN durch den Kontakt mit apoptotischen Zellen würde in dem bisher aufgezeigten Bild eines hemmenden Effektes der apoptotischen Zellen auf die pro-entzündlichen Funktionen der Phagozyten durchaus Sinn ergeben. Aber die verminderte Stimulierbarkeit der Produktion reaktiver Sauerstoffradikale mit pro-entzündlichen Signalstoffen birgt zusätzlich Gefahren für den Organismus. Eine verminderte Stimulierbarkeit der PMN könnte dazu führen, dass phagozytierte Erreger nicht abgetötet werden.

Die Gefahr durch den anti-entzündlichen Effekt apoptotischen Materials auf PMN und wiederum apoptotischer PMN auf Makrophagen konnte auch in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden. Der intrazelluläre Parasit *Leishmania major* wird im Organismus von PMN aufgenommen. Dies geschieht vermutlich, indem lebende Parasiten und Phosphatidylserin-positive, apoptotische Parasiten gleichzeitig phagozytiert werden. Der apoptotische Parasit führt dabei zu einer Aktivierung der anti-entzündlichen Funktionen des PMN und zu einer Verminderung der pro-entzündlichen Funktionen. Dadurch wird das Überleben der nicht-apoptotischen *Leishmania* ermöglicht. Geht der PMN dann selbst in die Apoptose, wird er von Makrophagen phagozytiert. Dies wiederum führt zu einer Förderung der anti-entzündlichen Funktionen des Makrophagen und die nicht-apoptotische *Leishmania* aus dem PMN überlebt ebenfalls im Makrophagen. Sowohl die apoptotischen Parasiten als auch apoptotische PMN wirken in diesem Zusammenhang durch die anti-entzündlichen Effekte wie ein „Trojanisches Pferd“ (van Zandbergen et al., 2007).

Interessanterweise ist die verminderte Produktion reaktiver Sauerstoffradikale in PMN durch den Kontakt zu apoptotischen Zellen nicht abhängig von der Anwesenheit von humanem Serum (siehe Kapitel 4.2). Dies ist deswegen so besonders, da die bisher beobachteten Effekte

apoptotischer Zellen auf PMN, Makrophagen und Dendritischen Zellen eine Serum-Abhängigkeit zeigten. Sicherlich ist es verständlich, ein Artefakt hinter dieser Beobachtung zu vermuten. Eine Fehlermöglichkeit hätte eine unterschiedliche Zellzahl zwischen der Co-Kultur und der Monokultur sein können, so dass zuwenig DHR in der Co-Kultur für die nicht-apoptotischen PMN zur Verfügung stehen würde. Um diese Fehlerquelle auszuschließen, enthielt die Monokultur nicht-apoptotischer PMN 5×10^5 Zellen. Dies entspricht der Gesamtzellzahl der Co-Kultur, die aus $2,5 \times 10^5$ PMN und $2,5 \times 10^5$ apoptotischen Zellen bestand. In der Mono-Kultur aus PMN war die Sauerstoffradikal-Produktion deutlich höher, als in die der nicht-apoptotischen PMN der Co-Kultur (siehe [Abbildung 8](#)). Dadurch wird ausgeschlossen, dass diese Beobachtung wegen einer geringeren DHR-Menge entsteht, die dem einzelnen PMN durch eine unterschiedliche Zellzahl zur Verfügung stand. Stattdessen treten die beobachteten Effkte durch den Kontakt zu apoptotischen Zellen auf.

Eine zweite mögliche Fehlerquelle stellt die unterschiedliche Kontaktdauer der einzelnen Reagenzien mit den Zellen dar, die auf der Zeit für das Pipettieren aller Ansätze beruht. Die Inkubationszeit mit dem fMLP und dem DHR ist in diesem Protokoll sehr kurz, so dass diese geringen Unterschiede durch die Reihenfolge des Pipettierens durchaus einen Einfluss haben könnten. Um diese Fehler-Möglichkeit auszuschließen, wurde die Reihenfolge der Ansätze zwischen den Experimenten verändert. In einem Versuch wurden die Reagenzien zuerst in den ersten Ansatz pipettiert und diese Reihe aufsteigend fortgesetzt. In dem nächsten Experiment wurde jeweils beim letzten Ansatz begonnen und das Pipettieren dann in einer absteigend Reihe fortgesetzt. Da sich dadurch kein Unterschied zwischen den Ergebnissen der Experimente ergab, können diese geringen Unterschiede der Inkubationszeiten durch die Dauer des Pipettierens das beobachtete Phänomen nicht erklären.

Eine in diesem Zusammenhang wichtige Frage bleibt aber in der vorliegenden Arbeit unbeantwortet. In den Versuchen konnte bisher noch nicht dargestellt werden, ob es durch den Kontakt mit apoptotischen Zellen zu einer verminderten Phagozytose und Abtötung von Bakterien durch PMN kommt. In ersten Versuchen wurde die Phagozytose von Bakterien durch PMN untersucht. Aufgrund technischer Schwierigkeiten bei der Analyse in der Durchflusszytometrie werden diese Ergebnisse in dieser Arbeit nicht gezeigt, da eine sichere Differenzierung der Populationen noch nicht möglich war. Untersuchungen der Phagozytose und Abtötung von Bakterien sind für die Zukunft aber sehr wichtig, um eine abschließende Gesamtbeurteilung vornehmen zu können.

Eine weitere wichtige Frage stellt in diesem Zusammenhang der Einfluss apoptotischer Zellen auf PMN dar, bei denen durch verschiedene Verfahren die Apoptose induziert wurde. In Versuchen mit Makrophagen konnte gezeigt werden, dass apoptotische PMN, bei denen die Apoptose durch unterschiedliche Verfahren induziert wurde, einen unterschiedlichen Effekt auf die Makrophagen haben, die die apoptotischen PMN phagozytiert hatten. Apoptotische PMN, bei denen die Apoptose durch die normale Alterung induziert wurde, hatten einen anti-entzündlichen Effekt auf die Makrophagen. Wurde hingegen die Apoptose in PMN durch die Phagozytose von Bakterien induziert, so kam es zu einem eher pro-entzündlichen Effekt in den Makrophagen, die diese apoptotischen PMN phagozytierten (Zheng et al. 2004). Es bleibt in der vorliegenden Arbeit unbeantwortet, ob die dargestellte reduzierte Produktion von Sauerstoffradikalen in PMN durch den Kontakt zu apoptotischen Zellen bestehen bleibt, wenn die Apoptose durch verschiedene Verfahren induziert wird. Die UV-Bestrahlung stellt in diesem Zusammenhang zwar eine unphysiologische, jedoch gut etablierte Induktionsart der Apoptose dar (Kulms et al., 2002). Möglicherweise haben apoptotische Zellen immer die gleichen immunsuppressiven Effekte. Diese können durch zusätzliche Signale, wie sie z. B. bei bakteriellen Infektionen entstehen, verändert werden. Intrazellulär lebende Erreger induzieren nicht direkt eine Apoptose ihrer Phagozyten, da sie zum eigenen Überleben auf sie angewiesen sind. Die nicht intrazellulär lebenden Erreger werden jedoch durch die Phagozyten aufgenommen und unschädlich gemacht. Durch die erregerbedingte Induktion der Apoptose des Phagozyten kann die Aufnahme und Abtötung weiterer Erreger durch die Phagozyten zunächst verhindert werden. Die dabei zusätzlich entstehenden so genannten *danger signals* der bakteriellen Infektion unterdrücken jedoch wahrscheinlich die anti-entzündlichen Einflüsse der apoptotischen Zellen, da ansonsten eine effektive Erregerabwehr nicht in dem Rahmen möglich wäre, wie sie permanent im Körper stattfindet. Die genaue Funktionsweise dieser Mechanismen ist jedoch bislang ungeklärt.

Zusätzlich ist die Frage der Einflüsse einer *in vivo* Situation sehr wichtig, um ein abschließendes Bild erhalten zu können. Der Unterschied zwischen *in vivo* und *in vitro* Bedingungen ist zum Beispiel ersichtlich in der Menge von bestimmten Stimuli, die man benötigt, um einen entsprechenden Effekt zu bewirken. TNF- α hat in einer niedrigen Konzentration 0,1-1 ng/ml anti-apoptotische Eigenschaften auf PMN, wohingegen eine hohe Konzentration von mehr als 10 ng/ml pro-apoptotische Eigenschaften hat. Diese hohe Konzentration ist gleichzeitig die Schwelle, ab der TNF- α in PMN die massive Generierung von reaktiven Sauerstoffradikalen auslösen kann, den so genannten *respiratory burst* (van den Berg et al., 2001). In der *in vivo* Situation sind die regulatorischen Einflüsse dementsprechend

vielfältig. Daran ist ersichtlich, dass die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse aus einem *in vitro* Modelle nur als Orientierung dienen können und künftig in einem *in vivo* Modell auf ihre Validität hin überprüft werden müssen. Nur so lässt sich mit Sicherheit beschreiben, ob die verminderte Sauerstoffradikalbildung in PMN durch den Kontakt zu apoptotischen Zellen ein wirkliches Risiko für den Organismus darstellt.

Besonders interessant an den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen hinsichtlich der Produktion von Sauerstoffradikalen ist die fehlende Abhängigkeit dieses Effektes von der Anwesenheit humanen Serums. In der Literatur wird beschrieben, dass der anti-entzündliche Effekt apoptotischer Zellen auf Makrophagen durch Serum potenziert wird (Kurosaka et al., 2002). Diese Beobachtung stellte sich ebenfalls in den eigenen Versuchen dar. Es kam nur in der Anwesenheit von humanem Serum zu einer deutlichen Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN (Essmann, 2008). Auch die Einflüsse auf das Sekretionsverhalten von Zytokinen der PMN durch apoptotische Zellen traten nur auf, wenn in den Ansätzen humanes Serum vorhanden war. (siehe 4.3.1 und 4.3.2). Es ist denkbar, dass es verschiedene Erkennungsmöglichkeiten für apoptotische Zellen gibt und ein Erkennungssystem nur bestimmte Funktionen des PMN beeinflusst. Einige wären demnach abhängig von der Anwesenheit bestimmter Serumbestandteile und andere nicht. Zum Beispiel wäre es möglich, dass bestimmte Rezeptoren für die Erkennung apoptotischer Zellen zuständig sind und andere wiederum für die eigentliche Phagozytose. Die Einflüsse auf bestimmte Funktionen der phagozytierenden Zelle wären dabei von dem einen Rezeptorsystem abhängig und Einflüsse auf andere Funktionen von dem zweiten System. Diese Theorie stützt sich auf die Vielzahl von Rezeptoren, für die bereits ein Einfluss auf die Phagozytose nachgewiesen wurde. Außerdem wird diese Theorie durch die bereits erwähnte Beobachtung gestützt, dass verschiedene Induktionsarten von Apoptosen zu unterschiedlichen Einflüssen in den phagozytierenden Zellen führen. Unter Umständen kommt es aber auch zu einer Ausschüttung eines noch unbekanntes Botenstoffs aus apoptotischen Zellen, der wiederum einen Einfluss auf bestimmte Funktionen der Phagozyten hat und unabhängig von der Anwesenheit von Serum ist. Für die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Versuche würde das bedeuten, dass der Botenstoff aus den apoptotischen Zellen zu einer verminderten Produktion von Sauerstoffradikalen führt, aber keinen Einfluss auf deren Zytokin-Sekretionsmuster hat.

5.2. **Veränderungen der Zytokinsekretion durch Co-Kultur apoptotischer und nicht-apoptotischer PMN**

Apoptotische Zellen entstehen permanent unter physiologischen Bedingungen im Körper. Es wäre schädlich, wenn diese Zellen andauernd zu Entzündungsreaktionen führen würden. Apoptotische Zellen führen deswegen nach den bisher in der Literatur genannten Studien in den erwähnten Phagozyten zu einer verminderten Sekretion von pro-entzündlichen Zytokinen und zu einer verstärkten Sekretion von anti-entzündlichen Zytokinen (Byrne et al., 2002 ; Huynh et al., 2002; Barker et al., 2002 ; Zhang et al., 2003). Deswegen wurde in dieser Arbeit der Einfluss der apoptotischen Zellen auf die Zytokin-Sekretion der PMN untersucht. Es wurde nach der Inkubation von PMN mit apoptotischen Zellen der Gehalt dieser Zytokine in den zellfreien Überständen gemessen und mit dem Gehalt der zellfreien Überständen der entsprechenden Monokulturen aus PMN und aus apoptotischen Zellen verglichen. Diese Inkubationen wurden sowohl mit als auch ohne humanes Serum durchgeführt, da die Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN abhängig von der Anwesenheit humanen Serums ist. Als pro-entzündliche Zytokine wurde dabei die Sekretion von TNF- α , IP-10 und IL-8 von PMN untersucht und als anti-entzündliche Zytokine IL-10 und TGF- β .

5.2.1. **Verminderte IP-10-Sekretion von PMN durch Co-Kultur mit apoptotischen Zellen**

Bei den Messungen des IP-10-Gehalts in den zellfreien Überständen zeigte sich, dass auch dieses pro-entzündliche Zytokin vermindert durch PMN ausgeschüttet wurde, wenn diese mit apoptotischen Zellen inkubiert wurden. Dieser Effekt stellte sich jedoch nur dar, wenn die Co-Inkubation in der Anwesenheit von humanem Serum stattfand. Diese verminderte Sekretion des IP-10 durch PMN fand unter einer Stimulation mit IFN- γ und LPS in der Co-Kultur statt, was normalerweise einen idealen Stimulus für die Sekretion von IP-10 darstellt (Tamassia et al., 2007).

Diese Ergebnisse einer verminderten Sekretion von IP-10 aus PMN durch apoptotische Zellen zeigen somit Parallelen zu den bisherigen Beobachtungen bei Makrophagen, Monozyten und Dendritischen Zellen: Die Sekretion pro-entzündlicher Zytokine wird vermindert (für die entsprechende Literatur über die Effekte apoptotischer Zellen auf die Funktionen anderer Phagozyten sei auf die Einleitung unter Kapitel 1.3 verwiesen). Es bleibt jedoch die Frage ungeklärt, ob tatsächlich weniger IP-10 sezerniert wird oder ob das

ausgeschüttete Zytokin schneller entfernt wird, wenn apoptotische Zellen im Ansatz vorhanden sind. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass apoptotische PMN während einer Immunreaktion Chemokine aufnehmen und anschließend entsorgen können (Ariel et al., 2006). Sie könnten auch in diesem Falle als eine Art „Mülleimer“ für pro-entzündliche Zytokine dienen, um eine überschießende Immunreaktion zu unterbinden. Deswegen wäre es sinnvoll, in weiteren Versuchen die Veränderungen in PMN durch apoptotische Zellen auf der Ebene der Gen-Expression anzuschauen. Dadurch wäre ersichtlich, ob sich die Produktion von IP-10 in PMN nach einer Stimulation ohne Kontakt zu apoptotischen Zellen unterscheidet zu denen, die mit apoptotischen Zellen inkubiert wurden. Ein Hinweis darauf, dass tatsächlich weniger IP-10 sezerniert wird, ist die Abhängigkeit dieses Effektes von der Anwesenheit von Serum. Es wurde nur dann vermindert IP-10 in der Co-Kultur aus PMN und apoptotischen Zellen detektiert, wenn Serum in diesen Ansätzen vorhanden war (siehe [Abbildung 9](#)). Fehlte Serum in den Ansätzen, so zeigten sich diese Effekte nicht (siehe [Abbildung 11](#)). Es ist bekannt, dass die effektive Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen nur dann möglich ist, wenn Serum vorhanden ist (Kurosaka et al., 2002; Essmann, 2008). Da auch die Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN abhängig von der Anwesenheit von Serum ist, kann daraus geschlossen werden, dass die Effekte der veränderten Zytokinkonzentrationen eher auf der Erkennung apoptotischer Zellen durch PMN beruht, als auf einer erhöhten Aufnahme von IP-10 durch die apoptotischen Zellen. Die leicht erhöhte IP-10 Sekretion der Co-Kultur ohne Anwesenheit von Serum im Vergleich zur Monokultur aus PMN lässt sich auf einen Zellzahl-Effekt zurückführen. Schließlich kommt es in dem Kontrollansatz mit der fünffachen Konzentration von PMN zu einem zehnfach höheren Gehalt an IP-10 als in der Monokultur der PMN. Ohne einen Einfluss der erhöhten Zellzahl wäre ansonsten in diesem Kontrollansatz lediglich ein fünfmal höherer IP-10-Gehalt zu erwarten gewesen (siehe [Abbildung 11](#)).

5.2.2. Gesteigerte IL-8-Sekretion von PMN durch Co-Kultur mit apoptotischen Zellen

IL-8 wird als klassisches pro-entzündliches Zytokin betrachtet (Gillitzer et al., 2001). Deswegen sind die Ergebnisse aus Versuchen mit Makrophagen und apoptotischen Zellen und die daraus resultierende verminderete IL-8-Sekretion gut verständlich, da eine anti-entzündliche Wirkung der apoptotischen Zellen als allgemein akzeptiert gilt (Fadok et al., 2001). Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse scheinen in dieses Bild nicht wirklich zu passen. Die Anwesenheit apoptotischer Zellen führt in der Co-Kultur mit

nicht-apoptotischen PMN in der Anwesenheit von Serum zu einer gesteigerten IL-8-Freisetzung (siehe Abbildung 12). Dieses könnte bedeuten, dass apoptotische Zellen sehr wohl eine pro-entzündliche Wirkung auf PMN haben. Da es aber in den gleichen Ansätzen zu einer verminderten IP-10-Sekretion unter Stimulation mit IFN- γ und LPS kommt, ist diese Schlussfolgerung nicht passend. Wahrscheinlich ist die Unterteilung in pro-entzündliche und anti-entzündliche Zytokine zu eng gefasst. Anstatt einer klaren Unterteilung in „Schwarz und Weiß“ existieren wohl mehrere Zwischenstufen. Es wäre besser, die einzelnen Botenstoffe in diesem Zusammenhang in „eher pro-entzündlich“ und „eher anti-entzündlich“ zu unterteilen. Die Auswirkung der apoptotischen Zellen auf die Zytokinsekretion der PMN kann dann daran bestimmt werden, ob die Botenstoffe mit „eher pro-entzündlicher“ oder „eher anti-entzündlicher“ Komponente überwiegen.

Doch warum ist die Freisetzung von IL-8 aus PMN durch apoptotische Zellen sinnvoll? IL-8 wird zum einen von PMN sezerniert und wirkt zum anderen chemotaktisch auf PMN (Kobayashi, 2008). In verschiedenen Studien konnte *in vitro* gezeigt werden, dass eine Erhöhung der IL-8 Konzentration auf einer Seite einer Endothel-Zellschicht zur Adhäsion und Transmigration von PMN durch diese Endothel-Zellschicht hin zur erhöhten IL-8-Konzentration führt (Smith et al., 1993). Ein wichtiger Stimulus für die Freisetzung von IL-8 aus PMN ist bakterielle DNA, welche durch TLR-9 an der Oberfläche von PMN erkannt wird. Dadurch sollen weitere PMN an den Ort der Infektion rekrutiert werden, um eine suffiziente Immunreaktion und damit Entzündung zu initiieren (József et al., 2006). Dies ist jedoch mit zusätzlichen pro-entzündlichen Effekten verbunden, wie vermehrte Sekretion weiterer „eher pro-entzündlicher“ Zytokine, Erhöhung der Dichte von Adhäsionsmolekülen an der Zelloberfläche, verstärkte Phagozytose-Aktivität und einer verlängerten Lebenszeit (El Kebir et al., 2008). Es konnte in anderen Versuchen gezeigt werden, dass apoptotische Zellen *in vivo* im Gewebe zu einer Immigration von PMN aus der Blutbahn in dieses Gewebe führen. Bei der Injektion apoptotischer Zellen in das Peritoneum von Mäusen kam es kurze Zeit später zu einer erhöhten Einwanderung von PMN (Shiratsuchi et al., 2007). Dieser Effekt wurde von den Autoren als Reaktion auf die erhöhte Ausschüttung von MCP-1 aus Makrophagen im Peritoneum gewertet. Es wurde jedoch kein IL-8-Äquivalent der Maus (z. B. KC oder MIP-2) bestimmt. Es ist durchaus denkbar, dass es zu einer erhöhten Freisetzung von einem IL-8-Äquivalent aus PMN gekommen ist und dieses chemotaktisch zu einer PMN-Infiltration geführt hat. Es könnte sein, dass PMN in Anwesenheit von apoptotischen Zellen IL-8 als chemotaktischen Botenstoff ausschütten, um weitere PMN aus der Blutbahn an den gleichen Ort im Gewebe zu locken, die dann die apoptotischen Zellen phagozytieren.

Es wird dadurch keine Entzündung initiiert, da z. B. weniger IP-10 freigesetzt wird. Auch wenn IL-8 als ein „eher pro-entzündliches“ Zytokin betrachtet wird, so existieren für PMN wahrscheinlich keine weiteren Möglichkeiten, um chemotaktisch auf andere PMN zu wirken. Bei einem erhöhten Anfall von apoptotischen Zellen werden Phagozyten benötigt, um die apoptotischen Zellen zu entfernen, bevor es durch die sekundäre Nekrose zu einer Freisetzung ihres gewebeschädigenden Inhalts kommt. Dass PMN für diese Phagozytose geeignet sind, wurde bereits beschrieben, doch wurde es als ein „Notfall-System“ gewertet, falls die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen insuffizient ist (Rydell-Törmänen et al., 2006).

Vor dem Hintergrund der in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse einer erhöhten IL-8 Sekretion von PMN in Anwesenheit apoptotischer Zellen kann in der Phagozytose der apoptotischen Zellen durch PMN mehr als nur ein „Notfall-System“ gesehen werden. Kommt es zu einem erhöhten Anfall apoptotischer Zellen, so schütten die PMN IL-8 aus, um mehr PMN zur Entfernung der apoptotischen Zellen zu rekrutieren. Sie gehen dann im Verlauf der Entzündungsreaktion selbst in die Apoptose und werden ebenfalls von noch-nicht-apoptotischen PMN phagozytiert. Makrophagen und Dendritische Zellen wandern erst verzögert in das entzündete Gewebe ein und können deswegen auch erst verspätet diese Aufgabe übernehmen. Auch weitere Publikationen können so unter einem ganz anderen Gesichtspunkt betrachtet werden. Es wurde gezeigt, dass das Abräumen apoptotischer Zellen im Thymus stark vermindert war, wenn die Einwanderung von PMN verhindert wurde. Es wurde daraus geschlossen, dass die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen anscheinend PMN-abhängig ist (Iyoda et al., 2005). Diese Beobachtung könnte aber auch so interpretiert werden, dass die apoptotischen Zellen nicht phagozytiert werden, da die PMN als Phagozyten fehlen. Ein wichtiger Botenstoff, der die Einwanderung von PMN durch seine chemotaktischen Eigenschaften bewirkt, ist IL-8.

IL-8 verlängert zusätzlich die Lebenszeit der PMN (Acorci et al., 2009). Eine verlängerte Lebenszeit von PMN wäre ebenfalls in der Abräumung apoptotischer Zellen durchaus sinnvoll. Fallen apoptotische Zellen in einer großen Zahl im Gewebe an, so werden ausreichend Phagozyten zur Abräumung der apoptotischen Zellen benötigt, damit die Zellinhalte der apoptotischen Zellen nicht durch eine sekundäre Nekrose freigesetzt werden. IL-8 würde zum einen chemotaktisch wirken, um weitere PMN zur Phagozytose der apoptotischen Zellen in das Gewebe zu leiten. Zum anderen verhindert es, dass die PMN, die sich bereits im Gewebe befinden, ebenfalls in Apoptose gehen. Stattdessen können sie die apoptotischen Zellen weiter abräumen. Ob die PMN in der Co-Inkubation mit apoptotischen

Zellen in der Anwesenheit von humanem Serum jedoch wirklich durch IL-8 eine verlängerte Lebenszeit haben, muss erst noch gezeigt werden.

Auch im Falle der erhöhten Sekretion von IL-8 wäre die Gen-Expression der PMN interessant. In den Ansätzen der Co-Kultur aus apoptotischen und nicht-apoptotischen PMN kann durch die Detektion mit einem ELISA nicht darauf geschlossen werden, welcher Zelltyp tatsächlich IL-8 sezerniert hat. Es ist sehr wahrscheinlich, dass IL-8 durch die nicht-apoptotischen PMN sezerniert wird. Aus der Literatur ist bekannt, dass apoptotische Zellen ihre physiologischen Funktionen verlieren, wozu auch die Sekretion von Zytokinen gehört (Maianski et al., 2004). Außerdem kommt es im Einzelansatz aus apoptotischen PMN zu keiner erhöhten IL-8 Freisetzung durch die Stimulation mit IFN- γ und LPS, wobei dies auch an einer verminderten Stimulierbarkeit apoptotischer Zellen liegen könnte (Daten nicht gezeigt). Deswegen kann diese Frage nur durch eine Analyse auf der Ebene der Gen-Expression oder auf der Einzelzell-Ebene geklärt werden.

5.2.3. Verminderte TNF- α - Sekretion von PMN durch Co-Kultur mit apoptotischen Zellen, keine Sekretion von IL-10 und TGF- β

Bei den Messungen des TNF- α konnte dieses in den Ansätzen nicht nachgewiesen werden, da der Gehalt jedes Mal unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten ELISA-Kits lag. Inzwischen wurden die Versuche jedoch mit einem abgewandelten Protokoll des TNF- α -ELISA durch Arup Sakar – einen Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe – wiederholt. Es konnte dabei gezeigt werden, dass es im Vergleich zur Monokultur aus PMN durch den Kontakt mit apoptotischen Zellen auch unter zusätzlicher Stimulation zu einer verminderten Sekretion von TNF- α durch PMN kommt, wenn diese mit apoptotischen Zellen inkubiert wurden (Daten nicht gezeigt).

Als „eher anti-entzündliche“ Zytokine wurden IL-10 und TGF- β untersucht. In den Untersuchungen waren diese beiden Zytokine in den zellfreien Überständen, die durch die Inkubation der Mono- und Co-Kulturen aus PMN und apoptotischen Zellen gewonnen wurden, nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Dabei ist jedoch zu beachten, dass das verwendete industrielle ELISA-Kit für den Nachweis von TGF- β eine untere Nachweisgrenze von 1 ng/ml hatte, welche eine sehr hohe Konzentration darstellt. Diese Ergebnisse können auf verschiedene Weise gedeutet werden. Einerseits besteht die Möglichkeit, dass beide Zytokine in den verwendeten Bedingungen gar nicht produziert werden. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, dass die Zytokine durch Serumbestandteile gebunden oder durch die

Zellen wieder aufgenommen werden und sie deswegen nicht messbar sind. Deswegen ist es wichtig, hierfür ebenfalls die Gen-Expression der PMN zu untersuchen, um die Umstände näher zu beleuchten.

5.3. Verminderte Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN bei Fehlen von C1q

Bei Fehlen von C1q im allogenen, humanen Serum kommt es zu einer stark verminderten Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN im Vergleich zur Verwendung von normalem, autologem, humanem Serum (siehe [Abbildung 15](#)). Dieser Vergleich zwischen allogenen und autologem Serum wurde gewählt, da für diese Versuche noch keine Methode vorhanden war, um aus dem autologem Serum das C1q zu entfernen oder zu inaktivieren. Außerdem wurde in den Vorversuchen gezeigt, dass es bei der Verwendung von normalem, allogenen humanem Serum zu einer unverändert starken Phagozytose apoptotischen Materials durch PMN kommt, wie bei der Verwendung von normalem, autologem, humanem Serum (siehe [Abbildung 6](#)). Das Komplementsystem spielt eine entscheidende Rolle im Immunsystem. Seine einzelnen Faktoren und deren Spaltprodukte erfüllen während einer Abwehrreaktion mehrere Aufgaben, z. B. Chemotaxis, Opsonisierung oder als Botenstoff (Nielsen et al., 2002). Dementsprechend befinden sie sich in einer erhöhten Konzentration im entzündlichen Gewebe, wo auch eine erhöhte Zahl von apoptotischen Zellen anfällt. Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen C1q, der Phagozytose apoptotischer Zellen und der Entwicklung eines systemischen Lupus erythematoses aufgezeigt werden. Ein Mangel an C1q führt zu einem erhöhten Risiko, eine solche Autoimmunerkrankung zu entwickeln. Es kommt durch den Mangel an C1q zu einer verminderten Erkennung apoptotischer Zellen durch Phagozyten, wie z. B. Makrophagen (Donnelly et al., 2006).

Strukturanalysen zeigten, dass es verschiedene Oberflächenrezeptoren für C1q gibt, wodurch die unterschiedlichen Wirkungen von C1q vermittelt werden, z. B. ein Rezeptor für die Kollagen-Domäne von C1q (cC1qR). Dieser Rezeptor ist identisch mit Calreticulin (CRT), welches ursprünglich als Ca^{2+} -bindendes Protein im sarkoplasmatischem Retikulum von quergestreifter Muskulatur beschrieben wurde. An der Zelloberfläche konkurriert cC1qR/CRT mit Immunglobulin G (IgG) um die Bindung an C1q. C1q wiederum konnte an der Zelloberfläche von apoptotischen Zellen gefunden werden. cC1qR/CRT ist an der Zelloberfläche von Monozyten an CD91 angebunden und kann über das C1q auf der Zelloberfläche von apoptotischen Zellen die Phagozytose durch Monozyten vermitteln

(McGreal et al., 2002). Da CD91 jedoch nicht auf der Zelloberfläche von PMN zu finden ist, existieren unter Umständen noch andere Moleküle, die die Erkennung apoptotischer Zellen durch PMN mittels C1q vermitteln.

Doch die vielen in Kapitel 1.3 beschriebenen Faktoren, für die eine Beteiligung an der Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen durch andere Phagozyten gezeigt wurde, lassen die Vermutung zu, dass C1q nicht die einzige entscheidende Komponente für PMN ist. Andere Komplementfaktoren beziehungsweise deren Spaltprodukte, wie z. B. C5a, sind in diesem Zusammenhang von Interesse. Für C5a wurde beschrieben, dass es durch die Bindung an den C5a-Rezeptor auf Dendritischen Zellen dazu führt, dass diese wiederum nicht CD4 positive T-Zellen aktivieren, also eine Immunreaktion unterbinden kann (Köhl, 2006). Frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass eine Blockierung von CD32 zu einer verminderten Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN führt (Essmann, 2008). CD32 gehört zu den Fc-Rezeptoren. Auf PMN kommt es zu einer Bindung an das Fc-Fragment der Antikörper mit CD32. Dadurch können PMN in den Immunreaktionen z. B. Bakterien phagozytieren, an die die Antikörper mit ihren spezifischen Antigen-Bindungsstellen gebunden haben (Selvaraj et al, 2004). Zusammen mit den bereits beschriebenen Molekülen und Rezeptoren für die Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen durch verschiedene Phagozyten stärkt dieser bereits sehr gut erforschte Teil des Immunsystems die Hypothese, dass mehrere Mechanismen existieren, durch welche PMN zum einen apoptotische Zellen erkennen und zum anderen phagozytieren können (Kapitel 5.1). Schließlich sollen sowohl die Phagozytose eines Bakteriums durch die Bindung eines Antikörpers an PMN über CD32, als auch das Komplementsystem in der Bekämpfung von Mikroorganismen zu einer pro-entzündlichen Reaktion führen, während die Phagozytose einer apoptotischen Zelle über die gleichen Wege zu einer eher anti-entzündlichen Reaktion im PMN führen soll. Die vorliegende Arbeit liefert diesbezüglich erste Hinweise, die Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN zu verstehen.

6. Schlussfolgerung und Ausblick

PMN stellen die größte Subpopulation der weißen Blutkörperchen im Organismus dar. Die PMN sind als diejenigen Zellen charakterisiert, die zu Beginn einer akuten Entzündung am stärksten in das entsprechende Gewebe einwandern und durch die klassischen Funktionen – Phagozytose und Abtötung von Mikroorganismen durch die Bildung verschiedener reaktiver Sauerstoffradikale – die erste Linie der zellulären Verteidigung im Immunsystem darstellen. Andere Zellen des Immunsystems, wie z. B. Makrophagen, wandern erst verzögert in größerer Zahl in das entzündete Gewebe ein. Die PMN gehen nach Erfüllung ihrer Aufgaben in die Apoptose und müssen dann entsorgt werden, damit ihr Zelleninhalt das umliegende Gewebe nicht zusätzlich schädigt. Für diese Entsorgung waren bisher nur Makrophagen, Dendritische Zellen und einige unprofessionelle Phagozyten in der Literatur beschrieben. In den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte jedoch gezeigt werden, dass es unter den PMN zu einer Art „Kannibalismus“ kommt, indem PMN ihre apoptotischen Artgenossen phagozytieren.

In den bisher gängigen immunologischen Modellen hatten die PMN eine rein ausführende Rolle. Sie reagieren auf die Stimuli der Entzündung, wandern dort ein, töten Mikroorganismen ab und gehen in den programmierten Zelltod. Die regulatorischen Funktionen in der Entzündungsreaktion wurden bisher den sekundär einwandernden Zellen, wie z. B. Makrophagen und Dendritischen Zellen, zugesprochen. Dadurch, dass sie die apoptotischen Zellen phagozytieren, kommt es zu einer eher anti-entzündlichen Reaktion. Die daraufhin sezernierten Zytokine führen zu der Beendigung der Entzündungsreaktion.

Durch den Nachweis, dass PMN ebenfalls ihre apoptotischen Artgenossen phagozytieren können, entstand die Frage, welchen Einfluss der Kontakt und die Phagozytose apoptotischer Zellen auf die PMN hat. Diesem Thema ist die vorliegende Dissertation gewidmet. Es zeigte sich bei der Zytokinsekretion, dass durch die Co-Kultur mit apoptotischen Zellen die Sekretion von IP-10 aus PMN sinkt, was, ähnlich wie bei den zuvor genannten Immunzellen, als anti-entzündliche Reaktion bezeichnet werden kann. Jedoch steigt die Sekretion von IL-8 durch die PMN an, was dem klassischen Bild des anti-entzündlichen Effekts apoptotischer Zellen widerspricht. IL-8 wird in der Literatur als ein pro-entzündliches Zytokin betrachtet und wirkt stark chemotaktisch auf PMN. Es dient wahrscheinlich dazu, dass genügend PMN in das entzündliche Gewebe einwandern, um die anfallenden Mengen an apoptotischen Zellen zu entsorgen und somit die Gewebeschädigung zu vermeiden.

Eine andere Beobachtung dieser Arbeit war die veränderte Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen in PMN durch die Anwesenheit apoptotischer Zellen. Dies spricht für einen eher anti-entzündlichen Einfluss der apoptotischen Zellen auf PMN. Interessant an dieser Beobachtung war jedoch, dass dieser Einfluss auf PMN unabhängig war von der Anwesenheit humanen Serums. Die Einflüsse auf die Zytokin-Sekretion traten hingegen nur auf, wenn Serum in der Co-Kultur aus apoptotischen und nicht-apoptotischen PMN vorhanden war. Ebenso kam es nur dann zur Phagozytose der apoptotischen Zellen durch PMN, wenn Serum in der Co-Kultur vorhanden war.

Dieses führt zum nächsten Punkt dieser Dissertation: die Frage, über welche Moleküle die apoptotischen Zellen von PMN erkannt und phagozytiert werden. Die Beobachtung, dass nur bestimmte Veränderungen der PMN-Funktionen abhängig von der Anwesenheit von Serum sind, weist darauf hin, dass es unterschiedliche Erkennungsmechanismen für unterschiedliche Wirkungen gibt. Auf der Suche nach dem vermittelnden Serumbestandteil wurde C1q in dieser Arbeit untersucht, da dieser Bestandteil des Komplementsystems im entzündlichen Gewebe verstärkt vorkommt. In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass es in einem C1q-depletierten Serum zu keiner Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN kam. Es blieb jedoch der Nachweis schuldig, dass das Serum durch die Depletion nicht noch weiter verändert wurde. Außerdem konnte bisher noch nicht die erneute Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN durch die Zugabe von C1q nachgewiesen werden, da noch kein biologisch aktives C1q für *in vitro* Versuche verfügbar ist, wie es unter *in vivo* Bedingungen entsteht.

Bisher konnte nur ein grober Einblick in die Einflüsse apoptotischer Zellen auf PMN durch die hier präsentierten Untersuchungen gewonnen werden. Es müssen zukünftig weitere Zytokine der PMN und deren Veränderungen im Sekretionsmuster durch apoptotische Zellen untersucht werden. Besonders interessant sind in diesem Zusammenhang auch die Veränderungen auf der Ebene der Gen-Expression. Durch den verminderten Gehalt an reaktiven Sauerstoffradikalen in PMN durch apoptotische Zellen leitet sich zusätzlich die Frage ab, ob es auch zu einer verminderten Abtötung von Krankheitserregern kommt. Außerdem wurde bisher nur eine Art der Apoptose-Induktion untersucht, denn unter Umständen hat die Apoptose-Induktion, z. B. durch bestimmte Mikroorganismen, einen ganz anderen Einfluss auf die PMN, als die Induktion durch UV-Bestrahlung. Auch die Frage nach einer veränderten Zusammensetzung der Oberflächenmoleküle auf PMN durch den Kontakt zu apoptotischen Zellen konnte bisher aufgrund technischer Schwierigkeiten bei der Stabilität der Färbungen noch nicht geklärt werden.

Besonders wichtig wird für die Zukunft die Frage bleiben, welche Moleküle auf der Zelloberfläche und welche Serumbestandteile die Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen durch PMN vermitteln. Bei den bisherigen Erkenntnissen und diesen offenen Fragen darf man zusätzlich nicht vergessen, dass es sich bisher nur um *in vitro* Erkenntnisse handelt. Die Komplexität des menschlichen Organismus und die sich daraus ergebenden Wechselwirkungen der verschiedensten Zellen über Oberflächenmoleküle und Botenstoffe stellen für zukünftige Untersuchungen eine besondere Herausforderung dar. Ein wichtiger Schritt in diese Richtung ist dabei sicherlich das Wechselspiel zwischen apoptotischen Zellen, PMN und weiteren Zellen des Immunsystems. Besonders interessant ist dabei die Rolle von T-Helferzellen. Sie könnten schließlich eine wichtige Quelle für die Botenstoffe sein, die zu einer erhöhten Phagozytose der apoptotischen Zellen durch die PMN führt.

Wir stehen erst am Anfang, die Apoptose im Rahmen der Entzündung zu verstehen. Es ist erkennbar, wie wichtig die Apoptose und die anderen Zelltod-Arten von PMN und deren Auswirkungen im Rahmen der Entzündung sind. Es ist bekannt, dass lysierte PMN im Gegensatz zu intakten apoptotischen PMN in Makrophagen zu einer Ausschüttung der pro-entzündlichen Zytokine TNF- α , IL-8 und MIP-2 führen (Fadok et al., 2001). Unter Umständen entscheidet sich durch das Verhältnis apoptotischer, intakter Zellen zu lysierten Zellen, ob die Entzündung aufrechterhalten wird oder nicht. Die Relevanz der Apoptose zeigt sich speziell in den Situationen, in denen dieser Zelltod-Weg oder die Abräumung der apoptotischen PMN gestört sind. *Apoptotic bodies* beinhalten Zellbestandteile, die beim systemischen Lupus erythematodes (SLE) als Autoantigen wirken, wie z. B. Kern-Histone. Da vermutet wird, dass die Entfernung apoptotischen Materials bei dieser Erkrankung gestört ist, könnte es so zur Präsentation der Autoantigene kommen, z. B. durch die sekundäre Nekrose (Schiller et al., 2008). Generell scheint die gestörte Phagozytose apoptotischer Zellen durch die unterschiedlichen Phagozyten ein zentraler Grundstein für verschiedene Autoimmun-Erkrankungen zu sein, so dass ein besseres Verständniss der Phagozytose apoptotischer Zellen eine wichtige Grundlage für zukünftige Therapien darstellt (Lleo et al., 2008; Erwig et al., 2008).

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss apoptotischer Zellen auf die Funktionen neutrophiler Granulozyten (PMN) untersucht. Dazu wurde als eine wichtige pro-entzündliche Funktion die Produktion reaktiver Sauerstoffradikale durch apoptotische Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass die PMN, die mit apoptotischen Zellen inkubiert wurden, deutlich weniger stimulierbar waren, um reaktive Sauerstoffradikale zu produzieren, als die PMN, welche ohne apoptotische Zellen inkubiert wurden.

Eine weitere wichtige Funktion der PMN stellt die Sekretion von Zytokinen dar. Es zeigte sich, dass durch die Ko-Inkubation der PMN mit apoptotischen Zellen die IFN- γ /LPS-induzierte Freisetzung des Zytokins IP-10 deutlich vermindert war. In weiteren Experimenten kam es durch die Ko-Inkubation mit apoptotischen Zellen zu einer IL-8-Freisetzung aus den PMN. Diese Effekte auf die Zytokin-Sekretion waren nur bei Anwesenheit von humanem Serum zu finden. Die Daten machen damit deutlich, dass die Erkennung apoptotischer Zellen, ihre Aufnahme und die Aktivierung pro-inflammatorischer Prozesse zwingend Serum-abhängig sind. Die Serum-Abhängigkeit wurde weiter untersucht. Beim Vergleich der Phagozytose-Kapazität der PMN unter verschiedenen Bedingungen stellte sich heraus, dass die Komplementkomponente C1q einer der entscheidenden Serumfaktoren ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass apoptotische Zellen die Physiologie und wichtige Funktionalitäten polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten modulieren und damit zur Ausprägung des entzündlichen Geschehens mit den daran beteiligten weiteren zellulären und humoralen Komponenten einen wesentlichen Beitrag leisten.

8. Literaturverzeichnis

- Acorci MJ, Dias-Melicio LA, Golim MA, Bordon-Graciani AP, Peracoli MTS, Soares AMVC: Inhibition of Human Neutrophil Apoptosis by *Paracoccidoides brasiliensis*: Role of Interleukin-8. *Scand J Immunol* 69, 73-9 (2008)
- Albert ML, Kim JI, Birge RB: $\alpha v\beta 5$ integrin recruits the CrkII-Dock180-Rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells. *Cell Biol* 2, 899-905 (2000)
- 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)
- Ariel A, Fredman G, Sun Y-P, Kantarci A, Van Dyke TE, Luster AD, Serhan CN: Apoptotic neutrophils and T-Cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression. *Nat Immunol* 7, 1209-1216 (2006)
- Athens JW, Haab OP, Raab SO, Mauer AM, Ashenbrucker H, Cartwright GE, Wintrobe MM: Leucokinetic 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)
- Baggiolini M, Dewald B, Moser B: Interleukin-8 and related chemotactic cytokines – CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 55, 97-179 (1994)
- Bainton DF, Ulliyot JL, Farquhar MG: The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med* 134, 907-934 (1971)
- Barker RN, Erwig LP, Hill KSK, Devine A, Pearce WP, Rees AJ: Antigen presentation by macrophages is enhanced by the uptake of necrotic, but not apoptotic, cells. *Clin Exp Immunol* 127, 220-225 (2002)
- Böse J, Gruber AD, Helming L, Schiebe S, Wegener I, Hafner M, Beales M, Köntgen F, Lengeling A: The phosphatidylserine receptor has an essential functions during embryogenesis but not in apoptotic cell removal. *J Biol* 3, 15.1-15.18 (2004)
- Bras M, Queenan B, Susin SA: Programmed Cell Death via Mitochondria: Different Modes of Dying. *Biochem (Moscow)* 70, 231-239 (2005)

- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A: Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* 303, 1532-5 (2004)
- Brown S, Heinisch I, Ross E, Shaw K, Buckley CD, Savill J: Apoptosis disables CD-31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature* 418, 200-203 (2002)
- Byrne A, Reen DJ: Lipopolysaccharide Induces Rapid Production of IL-10 by Monocytes in the Presence of Apoptotic Neutrophils. *J Immunol* 168, 1968-1977 (2002)
- Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, DeVinney R, Doig CJ, Green FHY, Kubes P: Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature Med* 13, 463-469 (2007)
- Cortes-Hernandez J, Fossati-Jimack L, Carugati A, Potter PK, Walport MJ, Cook HT, Botto M: Murine glomerular mesangial cell uptake of apoptotic cells is inefficient and involves serum-mediated but complement-independent mechanisms. *Clin Exp Immunol* 130, 459-466 (2002)
- Cortes-Hernandez J: Murine glomerular mesangial cells phagocytose apoptotic cells in a serum dependent manner but apparently in a complement-independent manner. *Clin Exp Immunol* 130, 459 (2002)
- 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, 154-63 (2004)
- Cvetanovic M, Ucker DS: Innate Immune Discrimination of apoptotic Cells: Repression of Proinflammatory Macrophage Transcription Is Coupled Directly to Specific Recognition. *J Immunol* 179, 880-889 (2004)
- 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)
- Dini L, Lentini A, Diez GD, Rocha M, Falasca L, Vidal-Vanaclocha F: Phagocytosis of apoptotic cells by liver endothelial cells. *J Cell Sci* 108, 967-973 (1995)

- Donnelly S, Roake W, Brown S, Young P, Naik H, Wordsworth P, Isenberg DA, Reid KBM, Eggleton P: Impaired Recognition of Apoptotic Neutrophils by the C1q/Calreticulin and CD91 Pathway in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthr Rheumat* 54, 1543-1556 (2006)
- El Kebir D, József L, Filep JG: Neutrophil recognition of bacterial DNA and Toll-like receptor 9-dependent and -independent regulation of neutrophil function. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 56, 41-53 (2008)
- Erwig L-P, Henson PM: Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 15, 243-250 (2008)
- Esmann L: Phagozytose apoptotischer Zellen durch neutrophile Granulozyten. Dissertation aus der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck, (2008)
- 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(1), 391-400 (2010)
- Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM: The role of Phosphatidylserine in the recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 5, 551-562 (1998)
- Fadok VA, Bratton DL, Guthrie L, Henson PM: Differential Effects of Apoptotic Versus Lysed Cells on Macrophage Production of Cytokines: Role of Proteases. *J Immunol* 166, 6847-6854 (2001)
- Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RAB, Henson PM: A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405, 85-90 (2000)
- Fries DM, Lightfoot R, Koval M, Ischiropoulos H: Autologous Apoptotic Cell Ingestion Stimulates Chemokine Secretion by Vascular Smooth Muscle Cells. *Am J Pathol* 167, 145-353 (2005)
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A: Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 176, 231-241 (2007)
- Furze RC, Rankin SM: The role of the bone marrow in the neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse. *FASEB J* 22, 3111-9 (2008)

- Gainet J, Chollet-Martin S, Brion M, Hakim J, Gougerot-Pocidal MA, Elbim C: Interleukin-8 production by polymorphonuclear neutrophils in patients with rapidly progressive periodontitis: an amplifying loop of polymorphonuclear neutrophil activation. *Lab Invest* 78, 755-762 (1998)
- 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: effect on monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol* 67, 174-182 (2000)
- Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, Bratton DL, Oldenborg PA, Michalak M, Henson PM: Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123, 321-34 (2005)
- Gillitzer R, Goebler M: Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol* 69, 513-521 (2001)
- Guzik K, Bzowska M, Smagur J, Krupa O, Sieprawska M, Travis J, Potempa J: A new insight into phagocytosis of apoptotic cells: proteolytic enzymes divert the recognition and clearance of polymorphonuclear leukocytes by macrophages. *Cell Death Differ* 14, 171-182 (2007)
- Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC: Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase and Bacterial Killing. *Blood* 92, 3007-3017 (1998)
- Hart SP, Ross JA, Ross K, Haslett C, Dransfield I: Molecular characterization of the surface of apoptotic neutrophils: Implications for functional downregulation and recognition by phagocytes. *Cell Death Differ* 7, 493-503 (2000)
- 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)

- Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S.: Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 109, 625-637 (2002)
- Hemmi H, Idoyaga J, Suda K, Suda N, Kennedy K, Noda M, Aderem A, Steinman RM: A New Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells (Trem) Family Member, Trem-Like 4, Binds to Dead Cells and Is a DNAX Activation Protein 12-Linked Marker for Subsets of Mouse Macrophages and Dendritic Cells. *J Immunol* 182, 1278-1286 (2009)
- Henson PM, Johnson RB Jr: Tissue Injury in Inflammation. *J Clin Invest* 79, 669-674 (1987)
- Hofman P: Molecular regulation of neutrophil apoptosis and potential targets for therapeutic strategy against the inflammatory process. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 1-9 (2004)
- Holland SM, Gallin JI: Störung 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, Suttrop N), 15. Aufl., 411-418, McGraw-Hill/ABW Wissenschaftsverlag, Berlin (2003)
- Homburg CH, de Haas M, dem Borne AE, Verhoven AJ, Reutlingsperger 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)
- Horan PK, Slezan SE: Stable cell membran labelling. *Nature* 340, 167-168 (1989)
- Hotchkiss RS, Nicholson DW: Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Immunol* 6, 813-822 (2006)
- Huber A R Kunkel S L, Todd R. F. 3rd, Weiss S. J.: Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 254, 99-102 (1991)
- Huynh M-LN, Fadok VA, Henson PM: Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* 109, 41-50 (2002)

- Iyoda T, Nagata K, Akashi M, Kobayashi Y: Neutrophils Accelerate Macrophage-Mediated Digestion of Apoptotic Cells In Vivo as well as In Vitro. *J Immunol* 175, 3475-3483 (2005)
- József L, Khreiss T, El Kebir D, Filep JG: Activation of TLR-9 Induces IL-8 Secretion through Peroxynitrite Signaling in Human Neutrophils. *J Immunol* 176, 1195-1202 (2006)
- Kagan VE, Borisenko GG, Serinkan BF, Tyurina YY, Tyurin VA, Jiang J, Liu SX, Shvedova AA, Fabisiak JP, Uthaisang W, Fadeel B: Appetizing rancidity of apoptotic cells for macrophages: oxidation, externalization, and recognition of phosphatidylserine. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285, L1-L17 (2003)
- Kasama T, Miwa Y, Isozaki T, Odai T, Adachi M, Kunkel SL: Neutrophil-Derived Cytokines: Potential Therapeutic Targets in Inflammation. *Inflamm & Allergy* 4, 273-279 (2005)
- Klebanoff SJ: Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 77, 598-625 (2005)
- Kobayashi Y: The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci* 13, 2400-2407 (2008)
- Köhl J: Self, non-self, and danger: a complementary view. *Adv Exp Med Biol* 586, 71-94 (2006)
- Krysko DV, D'Herde K, Vandenabeele P: Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis* 11, 1709-1726 (2006)
- Kulms D, Schwarz T: Molecular mechanisms involved in UV-induced apoptotic Cell-death. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 15, 342-347 (2002)
- Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y: Silent Cleanup of Very Early Apoptotic Cells by Macrophages. *J Immunol* 171, 4672-4679 (2003)
- Kurosaka K, Watanabe N, Kobayashi Y: Potentiation by human serum of anti-inflammatory cytokine production by human macrophages in response to apoptotic cells. *J Leukoc Biol* 71, 950-956 (2002)
- Kurosaka K, Watanabe N, Kobayashi Y: Potentiation by human serum of anti-inflammatory cytokine production by human macrophages in response to apoptotic cells. *J Leukoc Biol* 71, 950-956 (2002)

- Kurosaka K, Watanabe N, Kobayashi Y: Production of Proinflammatory Cytokines by Phorbol Myristate Acetat-Treated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages After Phagocytosis of Apoptotic CTTL-2 Cells. *J Immunol* 161, 6245-6249 (1998)
- Laufs H, Müller K, Fleischer J, Reiling N, Jahnke N, Jensenius JC, Solbach W, Laskay T: Intracellular Survival of *Leishmania major* in Neutrophil Granulocytes after Uptake in the Absence of Heat-Labile Serum Factors. *Infect Immunol* 70, 826-835 (2002)
- Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA: Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 24, 99-146 (2006)
- Li Y, Karlin A, Loike JD, Silverstein SC: A critical concentration of neutrophils is required for effective bacterial killing in suspension. *PNAS* 99, 8289-8294 (2002)
- Lleo A, Selmi C, Invernizzi P, Podda M, Gershwin ME: The consequences of apoptosis in autoimmunity. *J Autoimmun* 31, 257-62 (2008)
- Maianski NA, Maianski AN, Kuijpers TW, Roos D: Apoptosis of Neutrophils. *Acta Haematol* 111, 56-66 (2004)
- McGreal E, Gasque P: Structure-function studies of the receptors for complement C1q. *Biochem Soc Transact* 30, 1010-1014 (2002)
- Mevorach D, Mascarenhas JO, Gershov D, Elkon KB: Complement-dependent Clearance of Apoptotic Cells. By Human Macrophages *J Exp Med* 188, 2313-2320 (1998)
- Mills KHG: Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur J Immunol* 38, 2636-2649 (2008)
- Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, Zahorchak AF, Logar AJ, Papworth GD, Wang Z, Watkins SC, Falo Jr. LD, Thomson AW: Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood* 101, 611-620 (2003)
- Murakami M, Kawachi H, Ogawa K, Nishino Y, Funaba M: Receptor expression modulates the specificity of transforming growth factor-beta signaling pathways. *Genes Cells* 14, 469-82 (2009)
- Nathan C: Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *NatRevImmunol* 6(3), 173-82 (2006)

- Nauseef WM: How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev* 219, 88-102 (2007)
- Nielsen CH, Graham R, Leslie Q: Complement's participants in acquired immunity. *J Leukoc Biol* 72, 249-261 (2002)
- Oka K, Sawamura T, Kikuta KI, Itokawa S, Kume N, Kita T, Masaki T: Lektin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 95, 9535-9540 (1998)
- Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K: Properties of the novel proinflammatory supergene „intercrine“ cytokine family. *Annu Rev Immunol* 9, 617-648 (1991)
- Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B: Mitochondrial Oxidative Stress: Implications for Cell Death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47, 143-83 (2007)
- Osada Y, Sunatani T, Kim I-S, Nakanishi Y, Shiratsuchi A: Signaling pathway involving GULP, MAPK, and Rac-1 for SR-BI-induced phagocytosis of apoptotic cells. *Biochem, Epub* ahead of print (2009)
- 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)
- 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)
- 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* 93, 12456-12460 (1996)
- Proost P, Vynckier A-K, Mahieu F, Put W, Grillet B, Struyf S, Wuyst A, Opdenakker G, Van Damme J: Microbial Toll-like receptor ligands differentially regulate CXCL10/IP-10 expression in fibroblasts and mononuclear leukocytes in synergy with IFN- γ and provide a mechanism for enhanced synovial chemokine levels in septic arthritis. *Eur J Immunol* 33, 3146-3153 (2003)

- Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gbai VL: Necrosis: a specific form of programmed cell death?. *Exp Cell Res* 283, 1-16 (2003)
- 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 macroliasin, the mouse homologue to CD68. *Proc Natl Acad Sci* 92, 9580-9584 (1995)
- Rossato M, Cencig S, Gasperini S, Cassatella MA, Bazzoni F: IL-10 modulates cytokine gene transcription by protein synthesis-independent mechanisms in lipopolysaccharide-treated neutrophils. *Eur J Immunol* 37, 3176-3189 (2007)
- Rossi AG, Hallett JM, Sawatzky DA, Teixeira MM, Haslett C: Modulation of granulocyte apoptosis can influence the resolution of inflammation. *biochemical Society Transactions* 35, 288-291 (2007)
- Rydell-Törmänen K, Uller L, Erjefält JS: Neutrophil cannibalism – a back up when the macrophage clearance system is insufficient. *Resp Res* 7, 143-149 (2006)
- Rydell-Törmänen K, Uller L, Erjefält JS: Neutrophil cannibalism – a back up when the macrophage clearance system is insufficient. *Resp Res* 7, 143-149 (2006)
- Sabroe I, Jones EC, Usher LR, Whyte MKB, Dower SK: Toll-Like Receptor (TLR)2 and TLR 4 in Human Peripheral Blood Granulocytes: A Critical Role for Monocytes in Leukocyte Lipopolysaccharide Responses. *J Immunol* 168, 4701-4710 (2002)
- Savill J, Dransfield I, Hogg N, Haslett C: Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 343, 170-173 (1990)
- Savill J, Haslett C: Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation. *Semin. Cell Biol.* 6, 385-393 (1995)
- Savill J, 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)
- 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)
- Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA: The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* 177, 195-203 (2000)

- Schiller M, Bekeredjian-Ding I, Heyder P, Blank N, Ho AD, Lorenz H-M: Autoantigenes are translocated into small apoptotic bodies during early stages of apoptosis. *Cell Death Differ* 15, 183-191 (2008)
- Schleimer RP, Freeland HS, Peters SP, Brown KE, Derse CP: An assesment of the effects of glucocorticoids on degranulation, chemotaxis, binding to vascular endothelium and formation of leukotrien B4 by purified human neutrophils. *J Pharmacol Exp Ther* 250, 598-605 (1989)
- Selvaraj P, Fifadara N, Nagarajan S, Cimino A, Wang G: Functional regulation of human neutrophil Fc gamma receptors. *Immunol Res* 29, 219-30 (2004)
- Semerad CL, Liu F, Gregory AD, Stumpf K, Link DC: G-CSF is an essentil regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity* 17, 413-423 (2002)
- Serhan CN, Savill J: Resolution of inflammation: The beginning programmes the end. *Nat Immunol* 6, 1191-1197 (2005)
- Shirtsuchi Y, Iyoda T, Tanimoto N, Kegai D, Nagata K, Kobayashi Y: Infiltrating neutrophils induce allospecific CTL in response to immunization with apoptotic cells via MCP-1 production. *J Leukoc Biol* 81, 412-420 (2007)
- Siegel RM, Chan FK-M, Chun HJ, Lenardo MJ: The multifaceted role of FAS signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat Immunol* 1, 469-474 (2000)
- Silva MT, do Vale A, dos Santos NM: Secondary necrosis in multicellular animals: an outcome of apoptosis with pathogenic implications. *Apoptosis* 13, 463-82 (2008)
- Simon H-U: Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunol Rev* 193, 101-110 (2003)
- Sindrilaru A, Peters T, Schymeinsky J, Oreshkova T, Wang H, Gompf A, Manella F, Wlaschek M, Sunderkotter C, Rudolph KL, Walzog B, Bustelo XR, Fischer KD, Scharfetter-Kochanek K: Wound healing defect of Vav3 ^{-/-} mice due to impaired β 2-integrin dependent macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils. *Blood*, Epub ahead of print (2009)

- Smith WB, Gamble JR, Clrk-Lewis I, Vadas MA: Chemotactic desensitization of neutrophils demonstrates Interleukin-8(IL8)-dependent and IL-8-independent mechanisms of transmigration through cytokine-activated endothelium. *Immunol* 78, 491-497 (1993)
- Spertini O, Kansas GS, Munro JM, Griffin JD, Tedder TF: Regulation of leukocyte migration by activation of the leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1) selectin. *Nature* 349, 691-694 (1991)
- Squier MK, Sehnert AJ, Cohen JJ: Apoptosis in Leukocytes. *J Leukoc Biol* 57, 2 (1995)
- Stuart LM, Lucas M, Simpson C, Lamb J, Savill J, Lacy-Hulbert A: Inhibitory Effect of Apoptotic Cell Ingestion upon Endotoxin-Driven Myeloid Dendritic Cell Maturation. *J Immunol* 168, 1627-1635 (2002)
- Tamassia N, Calzetti F, Ear T, Cloutier A, Gasperini S, Bazzoni F, McDonald PP, Cassatella MA: Molecular mechanisms underlying the synergistic induction of CXCL10 by LPS and IFN- γ in human neutrophils. *Eur J Immunol* 37, 2627-2634 (2007)
- Van den Berg JM, Weyer S, Weening JJ, Roos D, Kuijpers TW: Divergent effect of tumor necrosis factor α on apoptosis of human neutrophils. *J Leukoc Biol* 69, 467-473 (2001)
- Van Zandbergen G, Solbach W, Laskay T: Apoptosis driven infection. *Autoimmunity* 40, 349-52 (2007)
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutlingsperger C: A novel assay for poptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labbeled Annexin V. *J Immunol Methods* 184, 39 (1995)
- 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)
- Wyllie AH: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556 (1980)
- Yasui K, Kobayashi N, Yamazaki T, Agematsu K, Mtsuzaki S, Ito S, Nakata S, Baba A, Koike K: Superoxid dismutase (SOD) as a potential inhibitory mediator of inflammation via neutrophil apoptosis. *Free Radic Res* 39, 755-62 (2005)

- Zamboni DS, Rabinovitch M: Phagocytosis of Apoptotic Cells Increases the Susceptibility of Macrophages to Infection with *Coxiella burnetii* Phase II through Down Regulation of Nitric Oxid Production. *Infect Immunol* 72, 2075-2080 (2004)
- Zhang W, Zheng S: In vitro study of immunosuppressive effect of apoptotic cells. *J Zhejiang Univ SCI* 6b, 919-925 (2005)
- Zheng L, He M, Long M, Blomgran R, Stendahl O: Pathogen-Induced Apoptotic Neutrophils Express Heat Shock Proteins and Elicit Activation of Human Macrophages. *J Immunol* 173, 6319-6326 (2004)
- Zuba E, Weglarczyk K, Barczyk K, Pryjma J: Recognition of apoptotic cells by human peripheral blood monocyte does not alter their ability to phagocytize and kill *Staphylococcus aureus*. *Arch Immunol Ther Exp* 52, 50-58 (2004)

9. Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Tamás Laskay für die Überlassung des Themas und die sehr gute Betreuung. Durch Ihn habe ich sehr viel über das wissenschaftliche Denken und Handeln gelernt. Zusätzlich lehrte er mich, alles zu hinterfragen, um somit der „Wahrheit“ ein Stück näher zu kommen. Es bestand immer Zeit, um meine Ergebnisse oder Probleme zu diskutieren. Ich bekam stets konkrete Anregungen und neue Motivation, um meine Arbeit letztendlich zu einem guten Ende zu führen.

Ebenfalls möchte ich mich beim Institutsleiter des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Herrn Prof. Dr. Werner Solbach, dafür bedanken, dass er mir diese Stelle als Doktorand ermöglicht hat. Durch seine hervorragende und äußerst engagierte Lehre weckte er mein Interesse für die Mikrobiologie und Immunologie. Während meiner Promotion verfolgte er meine Arbeit stets mit großem Interesse und stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite.

Ich glaube jedoch, dass ich diese Arbeit nicht zu einem so guten Ende hätte führen können, wenn ich nicht eine so fantastische Arbeitsgruppe um mich drum herum gehabt hätte. Mein besonderer Dank gilt deswegen Dr. Uta Bußmeyer, Alexander Wenzel, Dr. Inga Wilde, Sonja Möller, Kristin Roßdeutscher, Sigrit Pätzmann, Kirsten Broszat, Ludmilla Skrum, Arup Sakar, PD Dr. Ger van Zandbergen, Dr. Thomas Bollinger und Stefanie Steinert. Ganz spezieller Dank gilt Sonja Möller, die in „ausweglosen“ Situationen bei meinen Versuchen die rettende Idee hatte. Außerdem danke ich Dr. Lars Essmann, der mich eingearbeitet hat und mit seiner Arbeit die Grundlage für mein Thema gelegt hat.

Ich danke PD Dr. Ger van Zandbergen und PD Dr. Matthias Klinger für die Bereitstellung einer Abbildung (Abbildung 2). Spezieller Dank gilt auch Dr. Antje Müller und den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Forschungslabors der Poliklinik der Klinik für Rheumatologie für die freundliche Bereitstellung des Stratalinkers® zu Beginn meiner Versuche.

Ich möchte mich bei der Medizinischen Fakultät unserer Universität für die Unterstützung mit dem großzügigen Promotionsstipendium für Experimentelle Medizin bedanken. Ebenfalls bedanke ich mich bei der Studienstiftung des Deutschen Volkes für ihre langjährige Förderung und die Bewilligung eines Forschungssemesters.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Kommilitonen und engsten Freunden, bei denen ich immer das ideale Umfeld aus engagiertem Arbeiten und der nötigen Ablenkung hatte, so dass ich sagen kann, dass meine Studienzeit eines der schönsten Erlebnisse war, die mir bisher

zuteil wurden. Diese Zeit in Lübeck ist auch deswegen etwas sehr besonderes, da ich hier meine Verlobte Julika Ribbat kennen gelernt habe. Sie unterstützte mich in allen Dingen, fing mich auf, wenn mich der „Laborfrust“ überkam, und sie hatte stets in den richtigen Momenten Geduld oder Ungeduld mit mir. Ich danke ihr einfach für Alles!

Meiner Familie gilt der letzte Abschnitt. Durch das Studium und die Arbeit in der Klinik habe ich gelernt, dass es keine Selbstverständlichkeit, sondern etwas Kostbares ist, eine solche Familie zu haben. Ich wurde durch meine Eltern Marjolein und Helmut und meinen Bruder Carl in allem unterstützt. Es gab zwar auch manchmal kritische Fragen zu meinen Ideen, aber nie aus Unverständnis, sondern um mich prüfen zu lassen, ob ich mir in meinen Entscheidungen auch sicher war. Stets bekam ich Unterstützung, Geborgenheit und eine helfende Hand. Ich musste auf nichts verzichten und bekam alle Möglichkeiten, die ich mir nur wünschen konnte. Dafür gilt mein ganz besonderer Dank!

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner verstorbenen Großmutter Hermine Idel bedanken. Sie lehrte mich viele Dinge fürs Leben. Kleine, entscheidende Dinge, wie z. B. dass Kaffee schwarz getrunken wird, und große, grundlegend Dinge, wie meine Widmung dieser Arbeit zeigt.

10. Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Vor- & Zuname **Christian Idel**
Geburtstag & -ort **24.09.1981 in Hamburg**
Adresse **Blücherstraße 21; 23564 Lübeck**

SCHULISCHE LAUFBAHN

1987 – 1991 Katholische Grundschule Maria Grün, Hamburg
1991 – 1995 Gymnasium Christianeum, Hamburg
1995 – 2000 König-Wilhelm Gymnasium, Höxter
Leistungskurse Mathematik, Biologie;
Abschluss Abitur (Note „1,6“), Latinum

ZIVILDIENTST

2000 - 2001 Rettungsdienst der Stadt Höxter, Ausbildung zum staatlich
anerkannten Rettungssanitäter, Gesamtnote „Gut“

UNIVERSITÄRE LAUFBAHN

Seit 10 / 2001 Medizinstudium an der Universität zu Lübeck;
Physikum 2003 (Note „1,66“)
2003/04 Wahlfach Pädiatrie
Seit 2004 Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes
2005 Stipendiat „Experimentelle Medizin“ der Medizinischen
Fakultät der Universität zu Lübeck
2006 Preis für herausragendes studentisches Engagement 2005
06/2008 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note „sehr gut“
(1,5)

FAMULATUREN

03 / 2004 Hand- und Plastische-Chirurgie,
Praxis Dr. med. C. van Hüllen, Höxter

08 – 09 / 2004 Anästhesie, St.-Marien-Hospital, Marsberg

02 / 2005 Kardiologie/Angiologie, Herzzentrum Duisburg

09 / 2005 Kinder- und Jugend-Psychiatrie,
The Children´s University Hospital, Dublin/Irland

PRAKTISCHES JAHR

02 – 06 / 2007 Innere Medizin, Klinikum Itzehoe

06 - 09/ 2007 Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde,
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

10 / 2007– 01 / 2008 Chirurgie, Universitätsklinikum Schleswig–Holstein,
Campus Lübeck

BERUFLICHE LAUFBAHN

Seit 08 / 2008 Assistenzarzt in der Klinik für Hals-, Nasen- und
Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Schleswig–Holstein,
Campus Lübeck

DOKTORARBEIT

03 / 2004 – 02 / 2007 **Einarbeitung und experimenteller Teil**

02 / 2007 – 09 / 2009 **Schriftliche Ausarbeitung**

Lübeck, im April 2010

Christian Idel