



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Studie über die Wechselwirkungen zwischen
Neutrophilen Granulozyten und Erythrozyten in
menschlichem Blut“

Verfasser

Herbert Jank

Angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Wien, im November 2008

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A442

Studienrichtung lt. Studienblatt: Biologie

Betreuer: Dr. phil. O. Prof. Horst Seidler

Ao Prof. Dr. Rainer Prohaska

Ass Prof. Dr. Ulrich Salzer

1	Zusammenfassung	3
2	Einleitung:	5
2.1	Neutrophile als Auslöser der Immunantwort:	5
2.2	Oxidativer Burst:	5
2.3	Antioxidative Enzyme Katalase und Superoxiddismutase (SOD):	7
2.4	ROS und Apoptose:	9
2.5	Einfluss der Erythrozyten auf die Granulozyten	9
2.6	Vesikelbildung:	10
3	Material und Methoden	12
4	Ergebnisse	21
4.1	Variationen der Zellzahlen	21
4.2	Einfluss der Enzyme Katalase und Superoxiddismutase	24
4.2.1	Einfluss der Katalase auf WBC	24
4.3	Einfluss von Wasserstoffperoxid	30
4.4	Stimulierbarkeit der Granulozyten durch PMA, fMLP	36
4.5	Verlauf der Aktivierung durch Zymosan:	37
4.6	Reaktionen der Granulozyten auf Ca-induzierte Vesikel	37
4.6.1	Einfluss des Plasmas auf die Vesikelaufnahme.	37
4.6.2	Vesikel und Zymosan	40
4.6.3	Reaktion auf Vesikel und Erythrozyten	43
4.6.4	Einfluss der Blutgruppe von Plasma und Vesikel	48
4.7	Einfluss von Begasung mit N ₂ , O ₂ , Druckluft	50
5	Diskussion	58
6	Literatur	62

1 Zusammenfassung

Blut ist ein hochkomplexes System, in dem eine Reihe von physiologischen Vorgängen parallel zu einander ablaufen und reguliert werden muss. Ziel dieser Arbeit war es die Wechselwirkung zwischen neutrophilen Granulozyten, der Hauptzellpopulation der weißen Blutkörperchen, und den Erythrozyten näher zu untersuchen.

Wir konnten zeigen, dass es eine negative Korrelation zwischen der Erythrozytenzahl und der Aktivierung der neutrophilen Granulozyten besteht. Wie ein roter Faden zieht sich dieser Zusammenhang durch all unsere Experimente. In allen Experimenten zeigte sich trotz der individuellen Unterschiede der einzelnen Blutspenden eine Zunahme der Aktivierung bei Reduktion der Anzahl der Erythrozyten und Proben, in denen keine Erythrozyten anwesend waren, wiesen die stärkste Aktivierung auf.

Unserer Auffassung nach, könnte dieser Umstand indirekt mit den Enzymen Superoxiddismutase (SOD) und Katalase (CAT) zusammenhängen, die in den Erythrozyten in großer Menge vorliegen. Eine Reduktion der Erythrozytenzahl bewirkt zwangsläufig auch eine Reduktion dieser Schutzproteine und damit einen Anstieg der von den Neutrophilen produzierten ROS (radical oxygen species, Sauerstoffradikale).

Ungeachtet ihrer autotoxischen Wirkung sind diese Radikale jedoch auch wichtige Regulatoren für die verschiedensten Prozesse. Im Falle des Wasserstoffperoxids ist beispielsweise beschrieben, dass es durch Ca-Influx die Phagozytose stimuliert. Eine Reduktion der Erythrozytenzahl könnte somit durch den Anstieg der H_2O_2 Konzentration die Aktivierung der Neutrophilen fördern. In der Tat zeigt sich bei Inhibition der Erythrozyten-Katalase oft eine gesteigerte Phagozytoseaktivität der Neutrophilen. Erst bei weiterer Reduktion der Erythrozytenzahl bzw. nach Vorinkubation der Erythrozyten mit H_2O_2 scheint die Aktivität der Neutrophilen durch die Radikale gehemmt zu werden. In der Literatur finden sich in der Tat Hinweise auf derartige negative Rückkoppelungsmechanismen.

Die Existenz einer derartigen negativen Autoregulation würde auch erklären, warum bei Erhöhung der Leukozytenzahl die Phagozytose von Zymosan abnimmt. Physiologisch könnte über derartige Autoregulationen ein Ausufer des „oxidativen Bursts“ verhindert und bereits der Grundstein für die Auflösung der Entzündung gelegt werden.

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit war die Untersuchung der Wechselwirkung von Neutrophilen mit Vesikeln, die sich bei der Inkubation von Erythrocyten mit Ca^{++} und Ionophor von der Erythrozytenmembran abschnüren. Wir konnten zeigen, dass diese Vesikel sowohl einen oxidativen Burst als auch die Phagozytose der Neutrophilen stimulieren. In

diesem Zusammenhang konnten wir zeigen, dass ohne Unterstützung durch die Bestandteile des Blutplasmas (Komplementsystem) die Aktivierung durch Vesikel nur sehr gering ist. Erst nach Opsonierung der Vesikel durch das Komplementsystem ist eine effektive Phagozytose möglich. Des Weiteren haben unsere Experimente auch gezeigt, dass die Aktivierungswege des oxidativen Bursts und jene der Phagozytose zumindest teilweise getrennt sind. Unsere Daten zeigten auch eine gewisse Aktivierung durch autologe Vesikel. Bedenkt man dass auch bei der Lagerung von Blutkonserven spontan Erythrozytenvesikel gebildet werden, zeigt sich die praktische Relevanz dieser Beobachtungen. Jede Bluttransfusion kann demnach auch eine leichte Immunreaktion auslösen und kann damit eine potentielle Gefahr für durch Krankheit geschwächte Patienten darstellen.

Unsere Daten zeigen auch den Einfluss von Stickstoff- und Sauerstoffgas auf die Aktivierung der Neutrophilen. Unabhängig von der Art der Begasung (1.5 Minuten Begasung) fanden wir in beiden Fällen eine Erhöhung der Phagozytoseaktivität. Überraschenderweise ist die Aktivierung bei Begasung mit Stickstoff stärker als mit Sauerstoff. Wir haben Grund zur Annahme, dass die Wirkung des Stickstoffs durch die Erythrozyten vermittelt wird, da die Phagozytose bei Anwesenheit von Erythrozyten sogar noch zunimmt.

Bei Begasung mit Sauerstoff fanden wir genau den entgegengesetzten Trend. Hier wirkt die Anwesenheit von Erythrozyten eher hemmend auf die Phagozytose. Zudem sind hier allgemein die Werte geringer als bei Stickstoff Begasung.

Auch diese Beobachtung untermauert unsere Annahme, dass Erythrozyten und neutrophile Granulozyten durch eine Vielzahl von Mechanismen miteinander wechselwirken. Da diese Interaktionen zum Teil aktivierend und zum Teil inhibierend sind, kann die Art und das Ausmaß der Immunantwort je nach Kontext fein reguliert werden.

2 Einleitung:

Neutrophile Granulozyten (kurz auch Neutrophile genannt) bilden mit ca. 50-65% den größten Anteil der Weißen Blutkörperchen (Leukozyten). Sie stellen so etwas wie die 1. Verteidigungslinie unseres Körpers gegen Eindringlinge dar, dennoch wird ihre Rolle in der Immunantwort oft auf ihre, zugegebenermaßen, beeindruckenden Fähigkeiten über 3 Hauptmechanismen (oxidativer Burst, Degranulation und Phagozytose) Eindringlinge zu Töten, reduziert. Neutrophile sind jedoch alles andere als primitive Killer. Sie erfüllen daneben auch wichtige Aufgaben in der Regulation der Immunantwort. Gerade die potentielle Gefährlichkeit für Wirtsgewebe macht es nötig, dass das System einer strengen Kontrolle unterworfen ist. Neutrophile haben nicht zuletzt deshalb spezifische Systeme entwickelt, die eigene Akkumulation und Aktivierung zu limitieren und sind daher wichtige Entscheidungsstellen in der Immunantwort. Obwohl die von ihnen während der Entzündung verursachten Schäden im Wirtsgewebe ein wichtiges Signal für die Aktivierung und Rekrutierung von Zellen des adaptiven Systems darstellen, sind es gerade auch neutrophile Granulozyten, die wichtige Signale zur Auflösung der Immunreaktion und Wundheilung beitragen.

2.1 Neutrophile als Auslöser der Immunantwort:

Neutrophile werden ebenso wie andere Zellen durch Signale über Infektionen und Verletzungen aktiviert und reagieren ihrerseits darauf mit Signalen an andere Zellen. So sind sie in der Lage über Zell-Zell Kontakt Dendritische Zellen (DC) und Macrophagen zu rekrutieren. Über einen TNF-verwandten Liganden sind es auch die Neutrophilen, die die B-Zellreifung und Aktivierung forcieren bzw. über IFN- γ die Differenzierung der T- Lymphozyten stimulieren. Je nach Situation können sie pro- und antiinflammatorische Cytokine sekretieren. Neutrophile produzieren zwar nicht extrem hohe Dosen, über ihre zahlenmäßige Überlegenheit am Entzündungsherd (bis zu Hundertfach) erlaubt es ihnen, große Mengen an TNF und anderen Cytokinen zu produzieren und somit das Ausmaß der Immunantwort zu steuern.

2.2 Oxidativer Burst:

Verantwortlich für die Produktion von Sauerstoffradikalen ist Multienzymkomplex namens NADPH Oxidase, in manchen Publikationen auch als Phagocyte oxidase oder Burst Oxidase bezeichnet. Diese besteht sowohl aus cytosolischen (p40phox, p47phox, p67phox sowie rac 1/2) als auch membranständigen Proteinen (p22phox, gp91phox, die Zusammen das Core Enzym der NADPH Oxidase, das sog. Cytochrome b551 bilden). Erst nach Aktivierung kommt es zur Rekrutierung der einzelnen Enzyme an die Plasmamembran und zur Formation der eigentlichen Oxidase. Gerade dieser hochkomplexe Mechanismus der Formation der NADPH Oxidase ist es, der auch eine genaue Regulation des Oxidativen Burst erlaubt.

In ruhenden Neutrophile bilden p22phox und gp91 inaktive Heterodimere. Erst nach Aktivierung der Neutrophilen kommt es getriggert durch p47phox zur Translokation der cytosolischen Bestandteile an die Plasmamembran und zur Formierung des aktiven Enzyms. In ruhenden Neutrophilen liegt p47phox in einer autoinhibierten Form vor. Erst die Phosphorylierung von p47phox führt zu aktivem p47phox, welches seinerseits das Recruitment der Einzelnen Enzymsubunits an die Plasmamembran sowie das Assembly der Oxidase triggert. Die aktive Oxidase ist in der Lage große Mengen an Sauerstoffradikalen zu produzieren (oxidativer Burst). Trotz der extrem wichtigen Funktion von p47phox, ist p47phox nicht essentiell für den oxidativen Burst. In vitro kann 100% Enzymaktivität durch p67 phox und Rac2 bzw. aus einer Chimere der beiden wiederhergestellt werden. In der Tat ist lediglich p67phox essentiell für die Bildung von Sauerstoffradikalen. P67phox interagiert direkt mit gp91 des Coreenzym. Die Affinität zwischen p67phox und gp91 wird seinerseits durch Rac verstärkt. P47phox lediglich die Aufgabe zu haben, die Translokation von p67 und p40 an die Plasmamembran zu erleichtern. Welche Rolle p40phox spielt ist nicht ganz klar. In vitro Versuche haben gezeigt, dass p40 die Affinität von p47 an das Corezyme b551 erhöht sowie die Translokation von p47-p67 an die Membran erleichtert und damit den oxidativen burst erhöht.(Werner 2004)

Gerade dieser hierarchische Aufbau der der Aktivierung und des Zusammenbaus der NADPH Oxidase erlaubt eine Reihe von Möglichkeiten der Regulation. Wie wichtig eine funktionelle NADPH Oxidase für den Wirt ist, zeigen Krankheitsbilder wie die sog. Septischen Granulomatose (Chronic Granulomatous Disease, kurz CGD). CGD ist eine primäre Autoimmunerkrankung, die etwa 1/200.000 vorkommt und auf Grund einer Mutation in einer der 4 Untereinheiten der NADPH Oxidase zu chronischen Bakterien und Pilzinfektionen führt. Bis heute sind über 400 derartige Mutationen bekannt. Der überwiegende Anteil davon führt zu einem vollständigen bzw. partiellen Verlust des entsprechenden Proteins, in nur ca. 5% der Fälle bleibt das fehlerhafte Protein erhalten, wodurch weitere Erkenntnisse über die genaue Funktionsweise der Oxidase und ihrer Untereinheiten gewonnen werden kann. (Noack, Rae et al. 2001; Heyworth, Cross et al. 2003).

Nach einer neuen Studie (Bluml, Rosc et al. 2008) wird der Oxidative Burst durch Phospholipide moduliert. Bluml et al haben gezeigt, dass oxidierte Phospholipide (OxPI) sehr potente Inhibitoren der ROS Produktion darstellen. Diese Inhibition betrifft aber nicht etwa die Map Kinase Signalwege, da auch bei Anwesenheit von OxPI weiterhin eine Stimulation durch fMLP möglich ist. Auch bleiben trotz der Inhibierung des oxidativen Bursts die Neutrophilen nach wie vor in der Lage, sind Bakterien zu phagozytieren. Auch der Zusammenbau der NADPH Oxidase ist durch diesen Mechanismus nicht beeinträchtigt, da die Untereinheiten p47 und p67 immer noch an die Membran rekrutiert und die Oxidase zusammengesetzt wird. Vielmehr greifen die OxPI's direkt in die Synthese der ROS ein.

Interessanterweise verhalten sich nicht oxidierte Phospholipide genau umgekehrt. Unoxidierte PI sind in der Lage, in neutrophilen Granulozyten Oxidativen burst zu initiieren.

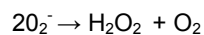
Zudem können sie den response der Granulozyten auf fMLP noch verstärken. Diese Zunahme an ROS Produktion liegt in etwa im Rahmen dessen, was auch Liganden an TLR Rezeptoren vermögen. Bluml et al konnten jedoch keinen Einfluss auf die PMA induzierte ROS Produktion ausmachen. Auch scheinen Phospholipide in einem zellfreien Assay zwar die Formation der NADPH Oxidase verhindern zu können, sie können jedoch nicht bereits existierende Komplexe inhibieren. Ferner ist nach wie vor unklar, ob es Rezeptoren für nicht oxidierte Phospholipide gibt. Zumindest von einigen der Botenstoffe nimmt man dies jedoch auf Grund von Vergleichen mit anderen Botenstoffen an.

Auch diese Beobachtungen zeigen, wie fein modulierbar die angeborene Immunantwort ist und auf Grund der möglichen schweren Schädigungen durch ROS auch sein muss. Gerade die Funktion der Phospholipide in der Immunregulation erlaubt eine Selbstlimitierung der ROS Produktion. In einem frühen Stadium stimulieren die anwesenden Phospholipide die ROS Produktion. Ab einer gewissen ROS Konzentration steigt auch die Konzentration der durch die ROS oxidierten Pls. Da diese potente Inhibitoren der ROS Produktion sind, kommt es auch auf diesem Wege kann der schädliche Einfluss der ROS limitiert werden.

2.3 Antioxidative Enzyme Katalase und Superoxiddismutase (SOD):

Auf Grund der potentiellen Gefahren durch die ROS für den Wirt, besitzt dieser wichtige antioxidative Enzyme, die quasi einen Schutzmechanismus darstellen, der eine zu starke Akkumulation der Radikale und damit Schädigung des Wirtes verhindern.

Die SOD katalysiert die Dismutation des durch die NADPH Oxidase gebildeten Superoxids nach der Formel



in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff. Da jedoch auch Wasserstoffperoxid prinzipiell gefährlich für den Organismus wird dieses durch die sog. Katalase weiter abgebaut. Dieser Abbau erfolgt in 2 Schritten:

- I. $H_2O_2 + \text{Katalase (red)} \rightarrow H_2O + \text{Katalase (ox.)}$
- II. $H_2O + \text{Katalase (ox.)} \rightarrow H_2O + O_2 + \text{Katalase (red.)}$

Chemisch gesehen zählt die Katalase damit zu den Oxireduktasen und dient dem Abbau von oxidativem Stress. Auf Grund der Gefahr von Zellschädigungen bei zu großem oxidativem Stress finden wir bei nahezu allen aeroben Organismen Katalasen die jedoch von Art zu Art unterschiedlich aufgebaut sind. Die menschliche Katalase besteht beispielsweise aus 4 identischen Untereinheiten von 60 kDa, von denen jede ein NADPH und Häm-Gruppe enthält. Kommt es zu Mutationen im CAT Gen, so führt dies zu einem chronischen Anstieg des oxidativen Stresses, was auf Grund der regulativen Funktionen von ROS zu Folgeerkrankungen wie Diabetes führen kann.

Heute geht man davon aus, dass Sauerstoffradikale neben den negativen Auswirkungen wie Zellschädigung und Diabetes auch eine Rolle in wichtigen Zellprozessen wie Apoptose, Zellmigration und Mitose spielt. (Goldschmidt-Clermont and Moldovan 1999). In der Tat hat Wasserstoffperoxid neben der Zellschädigung auch wichtige regulatorische Funktion. Bereits in Konzentrationen von 10^{-4} bis 10^{-7} mol/l lässt sich eine deutliche Steigerung der Produktion von ROCl (reactive oxygen and chlorine species intermediates während der Phagozytose nachweisen, reduziert aber auch die Fähigkeit MPO und ROCl während der Adhäsion zu sekretieren. Weiters zeigt die Studie auch die hohe Resistenz von Neutrophilen gegenüber Schädigungen durch H_2O_2 . (Kovalenko, Semenкова et al. 2007).

Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein in Neutrophilen, Macrophagen, Kupfer'schen Sternzellen und Microglia sezerniertes Enzym, dass mit Hilfe von Wasserstoffperoxid Chloridionen zu Hypochlorid katalysiert. Letztere oxidieren ihrerseits andere Biomoleküle und sorgen für die Erkennung und Phagozytierung von apoptotischen Zellen.

Eine andere Studie zeigt, dass Präinkubation der Neutrophilen mit Wasserstoffperoxid hemmend auf die Produktion von Superoxidionen wirkt. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich jedoch nicht um eine direkte Interaktion mit der NADPH Oxidase, da die Autoren darauf hinweisen, dass die Präinkubation mit Wasserstoffperoxid keinen Einfluss auf die Aktivierbarkeit durch fMLP und PMA hat, wohl jedoch auf die Aktivierbarkeit durch opsoniertes Zymosan und LPS. Vielmehr scheint es sich hierbei um eher um eine Konformationsänderung des entsprechenden Rezeptors handeln. (Dekaris, Marotti et al. 1998).

Alle diese Beobachtungen zeigen das zweiseitige Wesen der Produktion von Sauerstoffradikalen durch die Neutrophilen Granulozyten. Sauerstoffradikale stellen immer dann ein Problem dar, wenn sie in unverhältnismäßig großen Mengen, zur falschen Zeit oder in einem zu langen Zeitraum produziert werden. Gleichzeitig ermöglichen ROS aber auch einen effektiven Informationsaustausch zwischen den einzelnen Bestandteilen des Immunsystems. Die von den Neutrophilen produzierten ROS modulieren z. B die Signalwege, indem sie mit den Rezeptoren bestimmter Cytokine und Hormone (TNF- α , Insulin, Platelet derived growth factor, Angiotensin) interagieren und die Reaktionen der

Zielzellen steuern. Auf diese Weise kann eine Vielzahl von physiologischen Mechanismen beeinflusst werden.

2.4 ROS und Apoptose:

Damit die Entzündungsreaktion nicht Überhand nimmt, ist es nötig, dass die Neutrophilen nicht zu stark Akkumulieren. Bei einer zu großen Anzahl an Neutrophile würde der Oxidative Stress sehr bald zu schweren Gewebs- und Zellschädigungen führen. Auch hier dürften ROS als Marker für den Grad der Entzündung eine wichtige Rolle spielen. Es ist bekannt, dass Wasserstoffperoxid auch einen Ca Influx in Neutrophile bewirkt. (Giambelluca and Gende) Ca ist ein wichtiger Trigger für die verschiedensten physiologischen Prozesse.

2.5 Einfluss der Erythrozyten auf die Granulozyten

Die Expression bestimmter Oberflächenmarker der neutrophilen Granulozyten muss streng limitiert werden. So ist seit längerem bekannt, dass die Präsenz von Erythrozyten die Mobilisierung bestimmter Oberflächenrezeptoren hemmt. Als Beispiel wäre hier der Komplementrezeptor C3b oder CR1 zu nennen. In vitro kommt es in einem Erythrocyten-eryfreien Millieu bei 37° C spontan zu einer Mobilisierung dieses Rezeptors. Sind jedoch Erythrozyten anwesend, so wird diese unterdrückt. Diese Blockade kann durch chemotaktische Stimuli wie die Zugabe von formyl-methionyl-leucyl Phenylalanin (fMLP) wieder aufgehoben werden (10^{-9} M). Um jedoch jene Raten wie ohne Erythrozyten zu erreichen, würde eine etwa 10 fache Menge an fMLP nötig (Forslid, Hallden et al. 1991).

In der Tat ist die Aufgabe des CR1 Rezeptors auf Erythrozyten Antigen-Immunkomplexe zu binden und den Lebermakrophagen zum Abbau zur Verfügung zu stellen. Das erklärt auch die Notwendigkeit der Regulation der CR1 Mobilisierung in neutrophilen Granulozyten. Im Blutkreislauf wird die Präsentation von CR1 durch die dort anwesenden Erythrozyten inhibiert. Erst am Entzündungsherd wird durch chemotaktische Stimuli und Cytokine dieser Rezeptor mobilisiert.

Die Fähigkeit Antigene über ihren CR1 Rezeptor zu binden dürfte auch für die bis zu 15% gesteigerte Phagozytoserate von C3b opsonierten Antigenen bei Anwesenheit von Roten Blutzellen verantwortlich sein. Wird neben C3b auch mit IgG opsoniert steigt die Phagozytoserate sogar um bis zu 34%. Dieser Effekt wird einigen Publikationen zu Folge durch die radikalabbauende Funktion der Erythrozytenenzyme Katalase und Superoxiddismutase erklärt: Erythrozyten binden opsonierte Antigene über ihren CR1 Rezeptor und binden ihrerseits an Neutrophile Granulozyten. Gestärkt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass auch Erylysate bzw. diese Enzyme alleine eine Steigerung der Phagozytose bewirken können.(Forslid, Hallden et al. 1991)

2.6 Vesikelbildung:

Erythrozyten bilden sowohl in vivo als auch in vitro hämoglobinhaltige Abschnürungen der Erythrozytenmembran. Ziel dieser Arbeit war es auch die Reaktion des Immunsystems auf derartige Vesikel zu untersuchen. Wir haben uns unter anderem die Frage gestellt, ob und in welchem Ausmaß Vesikel der eigenen Blutgruppe (sowohl orthologe als auch autologe Vesikel) die Neutrophilen aktivieren. Die ist dahingehend von praktischer Relevanz, als dass Vesikel auch bei der Lagerung von Blutkonserven gebildet werden. Sollten diese, wie anzunehmen ist, vom Empfänger als fremd erkannt und eine Immunreaktion eingeleitet werden, so bedeutet dieser Umstand ein nicht unbeträchtliches Risiko für Akuttraumapatienten.

Der Prozess der Vesikelbildung findet sowohl in vivo als auch in vitro als Reaktion auf die verschiedensten Signale statt. So bewirken Prostaglandin E2 und LPA einen massiven Ca^{++} Influx. Diese Veränderung der inneren Ca Konzentration führt dann zu weitreichenden biochemischen und molekularbiologischen Veränderungen in Zelle und Zellmembran. Durch Aktivierung der sog. Phospholipid scramblase und gleichzeitige Hemmung der Amminophospholipidtranslokase kommt es Veränderungen in der Asymmetrie der Phospholipidblätter der Membran. Dieser teilweise Verlust an Assymetrie führt über Phospholipase A2 zur Bildung von weiterem LPA. Wie eingangs erwähnt ist LPA ein Signal für die Erythrozyten, dass einen vermehrten Ca Influx und damit Vesikularisierung auslöst. Auf diesem Wege genügt bereits eine kleine Menge LPA um in einem positiven Backloop eine weitere Vesikularisierung zu verursachen.

In vivo benützen Erythrozyten den Mechanismus der Vesikularisierung auch um dem eigenen Immunsystem zu entgehen. Nach Bildung eines Membran Attack Komplexes durch die Komplementfaktoren C3b bis C9 kommt es zu einem Ca^{++} Influx. Auf dieses Signal hin reagieren die Erythrozyten mit der Abschnürung von Vesikeln, über die sie den Membran Attack Komplex aus ihrer Membran entfernen und so dem eigenen Abbau durch das Komplementsystem entgegenwirken. Ähnliche Strategien sind auch von anderen Zelltypen bekannt.(Morgan, Dankert et al. 1989; Scolding, Morgan et al. 1989) Bei dieser Vesikelbildung entstehen 2 Arten von Vesikeln: Microvesikel mit einem Durchmesser von ca. 150 nm und Nanovesikel (60 nm Durchmesser). In beiden findet man keine Bestandteile des ZCytoskelettons. Zwar sind alle Bestandteile der Erythrozytenmembran in den Vesikeln vorhanden, nicht jedoch in der selben Konzentration. In Vesikeln finden sich neben den Membranproteinen aber auch zwei ursprüngliche cytosolische Proteine: Synexin und Sorcin, die erst durch den geänderten Ca Spiegel an die Membran rekrutiert werden. In Nanovesikeln stellen diese Proteine sogar nach Hämoglobin den größten Anteil an Membranproteinen.

ir haben in unseren Experimenten Ca^{++} induzierte Vesikel verwendet. Wie neuere Studien (Salzer, Zhu et al. 2008) gezeigt haben, sind derartige Vesikel im Wesentlichen mit den Vesikeln, die bei der Lagerung von Blutkonserven entstehen, vergleichbar und somit ein adäquater Ersatz in Experimenten. So besitzen beide in etwa dieselbe Größe und thrombogene Wirkung und werden von denselben Proteinen aufgebaut. Allerdings unterscheiden sie sich durch die relativen Mengen der die Membran aufbauenden Proteine. In den in Blutkonserven spontan gebildeten findet man etwa doppelt soviel Stomatin, Flottilin 2 hingegen deutlich reduziert.

Während der Vesikelbildung kommt es in der Membran zu einer Segregation der Membranproteine und zur Bildung von Arealen mit unterschiedlichen Proteinzusammensetzungen. Über die unterschiedlich Zusammengesetzten Lipiddomänen (Lipid RAFTSrafts) erklärt sich auch die unterschiedliche Verteilung der Proteine bei der Vesikelbildung.

Es fällt zum Beispiel auf, dass sich in lagerungsbedingten Vesikeln kaum Flottilin 1 und 2 finden lassen, die nach Stomatin die häufigsten integralen Membranproteine in Lipid Rafts der Erythrozytenmembran darstellen. Andererseits finden sich auf den Vesikeln über 90% der testbaren Blutgruppenantigene sowie die Transmembranproteine Bande 3 und Glycophorin.

3 Material und Methoden

Zellzahlvariationen

Lösungen und Reagentien:

- ACD Lösung: 2.80 g Tri-Sodium Citrat Dihydrat (95 mM)
 1.37 g Citric Acid Monohydrat (65 mM)
 2.00 g Glucose (101 mM) auf 100 ml
 Frisch gemischt aus 5xAC Lösung und 10xGlucose
- Dextran: 6% Dextran in 150 mM NaCl
- DPBSE: Dulbecco's PBS (ohne Ca und Mg) + 5 mM EDTA

Zellen:

Für die Experimente wurden Blutspenden von gesunden Spendern beiderlei Geschlechts zwischen 18 und 65 (AKH Wien, Abteilung f. Transfusionsmedizin) verwendet. Die Proben wurden während des Transports vor großen Temperaturschwankungen geschützt um

Präparation von Plasma (PLA):

4 ml Vollblut wurden in einem 15 ml FALCON 15 min. bei RT und 200xg (=900 rpm Heraeus Varifuge 3.0) abzentrifugiert. Der gelbliche Überstand (Platelet-rich Plasma, PRP) nochmals 10 min in der Tischzentrifuge bei höchster Drehzahl abgespinnert um Zellen zu entfernen. Das Plasma wurde entweder sofort verwendet oder über Nacht bei 4 ° C im Kühlschrank gelagert. Für die Vesikelversuche wurden sowohl Vesikel als auch Plasma in größerem Umfang präpariert und bis zur Verwendung bei -70° C eingefroren.

Präparation von Erythrocyten:

Je 200 µl Erythrocyten (1. Pellet der Plasmapräparation bzw. dextranhaltiges Erypellet aus WBC Präparation, siehe unten) wurden in 1 ml TBS resuspendiert und 20 sec abzentrifugiert (Tischzentrifuge) und 6-mal in TBS gewaschen.

Wenn größere Mengen an Erythrozyten benötigt wurden erfolgte die Präparation in 15 ml Falcon Röhrchen (2ml Erythrozyten der Plasmapräparation + 10 ml TBS) in der Heraeus Zentrifuge durchgeführt (Zentrifugation bei 4000 rpm 1 Minute, 5-mal waschen in TBS)

Präparation der Weißen Blutkörperchen (WBC):

Zur Präparation der weißen Blutzellen wurden 0.4 ml ACD Lösung in ein 15 ml vorgelegt und mit 4 ml Vollblut versetzt. Nach Zugabe von 2 ml Dextranlösung wurde gut durchmischt und die Probe 1 h bei RT zum Absetzen der Erythrozyten stehengelassen.

- Der gelbliche Überstand wurde in ein frisches 15 ml FALCON transferiert und bei 4° C 700 rpm 12 min abzentrifugiert
- Das Pellet wurde in 50 µl DBSE resuspendiert, zur Lyse der mitpelletierten Erythrozyten mit 1.5 ml deionisiertem Wasser versetzt und nach 30 sec mit 0.5 ml 0.6M KCl isotonisch gemacht und 4 min bei 4° C 900 rpm abzentrifugiert (bei Bedarf wurde dieser Schritt noch einmal wiederholt wenn sich noch Erythrozyten im Pellet befanden).
- Das nun weiße Pellet wurde in 5 ml DPBSE resuspendiert und 12 min bei 4° C und 700 rpm pelletiert und in

$$4 \cdot (1 - \text{Hämatokrit})^2 / 2 \text{ ml DPBS}$$

resuspendiert um eine doppelt konzentrierte Lösung zu erhalten (2mal bezogen auf Zellkonzentration laut Blutbefund).

Präparation von Granulozyten/Lymphocyten:

- Präparation von WBC aus 10 ml Vollblut
- Nach dem 2. Lyse-/Pelletierungsschritt wurde das Pellet in 3.750 ml DPBSE resuspendiert und über 2.5 ml Ficoll Paque aufgetrennt (Heraeus 2 x 30 min bei 2000 rpm). Nach den ersten 30 min. wurde der DPBSE Überstand verworfen und die an der Grenze zum Ficoll befindlichen Lymphocytenbande aufbewahrt und ebenso wie das Pellet der 2. Zentrifugation (Neutrophile Granulocyten) in 1000 µl PBS resuspendiert und 5 min bei 4° und 2000 rpm abzentrifugiert, in 200 µl PBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (CASY).

Präparation von Zymosan (Protokoll nach Nuutila et al. (Cytometry Part A 65 A: 93 - 102)

- 46 mg Zymosan von *S. cerevisiae* wurde in 2.3 ml HBSS gelöst (20 min im kochenden Wasserbad (20 mg/ml).
- Die kurz abgekühlte Suspension wurde 30 sec (50 cycles) soniziert, 10 min bei RT und 500 rpm pelletiert und das Zymosanpellet zweimal in der selben

Menge HBSS gewaschen und resuspendiert (= NOZ, non opsonized Zymosan)

- Für die Phagozytoseassays wurde das Zymosan entweder mit Fluorescein-isothiocyanat (FITC) bzw. AF 633 markiert (NOZ-F bzw. NOZ-AF).

Markierung des Zymosans mit FITC (NOZ-F):

- 1,5 mg Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) wurde in 500 µl Ethanol gelöst (3 mg/ml)
- 1,2 ml NOZ wurde pelletiert und im gleichen Volumen Carbonatpuffer (0.1 M , pH 9.5 gemischt aus 0.1 M Na₂CO₃ und 0.1 M NaHCO₃) und 30 Minuten bei 37 ° C mit 2 µl FITC Lösung (3 mg/ml) inkubiert.
- Anschließend wurde das Zymosan noch je 2 mal mit Carbonat- und HBSS gewaschen und in HBSS resuspendiert

Markierung des Zymosans mit AF 633 (NOZ AF):

- 46 mg pelletiertes NOZ wurde in 2,3 ml Carbonatpuffer (pH 8.3 aus 0.1 M Na₂CO₃ und 0.1 M NaHCO₃)
- Das Labelling erfolgte durch Inkubation mit 5 µl AF 633 Fluoreszenzlabel in DMF und ca. 1 h bei RT im Dunkeln durch Rotieren inkubiert
- Nach 2 mal Waschen in Carbonatpuffer und HBSS wurde das Zymosan bis zur weiteren Verwendung auf – 70 eingefroren.

Zellzahlvariationen:

Um den Einfluss der Zellzahlen auf die Phagozytose zu untersuchen wurden (ausgehend von den Zellzahlen laut Blutbefund) mittels Excelfile Proben mit unterschiedlichen Zellzahlen gemischt

WZ („Wiederzusammengesetztes Blut) : Zellzahl wie Vollblut

ER (Eryreiches Blut): erhöhte Erythrozytenzahl (+ 25%)

EA (Eryarmes Blut): erniedrigte Erythrozytenzahl (-25 %)

LR (Leukozytenreich): Neutrophile bzw. WBC +25%

LA (Leukozytenarmes Blut): Neutrophile bzw. WBC -25 %

WBC: nur WBC laut Blutbild in DPBS

Neu: Neutrophile in DPBS

WBC R: WBC + 25% in DPBS

WBC A WBC – 25 % in DPBS

Die Proben wurden in einem Phagozytoseassay (Stimulation mit 0.5 Zymosan, 15-30 min bei 37 ° C). Die Menge an Zymosan wurde auf die Neutrophilenzahl von 2306 Neutrophile standardisiert (25 µg Zymosan pro 2306 Neutrophile Granulozyten).

Um individuelle Unterschiede durch das Plasma zu vermeiden, wurde das Plasma wenn möglich durch DPBS Puffer ersetzt. Um gleiche Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺ Konzentrationen zu erreichen wurde die jeweils nötige Zymosanmenge in 1/10 des Endvolumens DPBS 75 mM Glucose 9 mM CaCl₂ 5 mM MgSO₄ resuspendiert. Um eine bessere Stimulation zu erzielen, wurde das Zymosan 30 Minuten bei 37 ° C in Plasma vorinkubiert (Opsonierung des Zymosans)

Standardblut:

Um individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Blutspenden zu auszugleichen, wurden für die meisten Versuche die Zellzahlen auf den jeweiligen Mittelwert standardisiert (4.1 10⁵ Neutrophile, 4.8 10⁵ RBC, 1.58 10⁵ Lymphozyten in je 100 µl). Ferner wurde weitgehend auf Plasma verzichtet. Die Proben wurden daher mit DPBS auf das jeweilige Volumen aufgefüllt. Um trotzdem eine annähernd gleiche Versorgung mit Ca, Mg und Glucose sicherzustellen, wurde mit einem konstantem Volumen Zymosan (1/10 der Ansatzgröße) in DPBS 75 mM Glucose 9 mM CaCl₂ und 5 mM MgSO₄ stimuliert.

Inhibition der Katalase:

Die intrazelluläre Katalase wurde durch eine modifizierte Version der Methode von Miura und Ogiso gehemmt. . Hierzu wurden 200 µl 5-mal gewaschene Erythrozyten der Plasma Präparation in 1.8 ml DPBS 20 mM Aminotriazol und 2 mM Ascorbinsäure (10%ige Zellsuspension) resuspendiert und 2h bei 37° C inkubiert .

Nach der Inkubation wurden die Erythrozyten 5-mal in DPBS gewaschen (20 sec bei RT in der Tischzentrifuge pelletiert und mit 1 ml DPBS 5-mal gewaschen)

Inhibition der Superoxiddismutase:

Zur Inhibition der Superoxiddismutase wurden 200 µl 5-mal gewaschene Erythrozyten der Plasma Präparation in 8.8 ml DPBS 0.1 M Diethylthiocarbamat (DCC) resuspendiert (2%ige Zellsuspension) und 2h bei 37° C unter Schütteln inkubiert.

Nach dieser Inkubation wurden die Erythrozyten 5-mal in DPBS gewaschen (20 sec bei 14000 rpm pelletiert und 5-mal in 1 ml DPBS gewaschen).

Doppelinhibition von Katalase und Superoxiddismutase:

Hierfür wurden 200 µl gewaschene Erythrozyten 1 h bei 37° mit 20mM Aminotriazol und 2mM Ascorbinsäure (siehe Katalaseinhibition) und nach 5-mal Waschen in DPBS 1h bei 37° mit DDC (Inhibition der Superoxiddismutase) inkubiert.

Herstellung von Vesikeln:

- Hierfür wurden 5 ml gewaschene Erythrozyten in 45 ml TBS 1mM CaCl₂ resuspendiert und mit 100 µl Ionophor A23187 (Calcineurin, 2mM Stocklösung) 30 min bei 37° unter Schütteln inkubiert.
- Nach Zugabe von 500 µl EDTA wurden die Erythrozyten kurz pelletiert (Hereaus 4000rpm, 27°C, 1 min) und der Überstand in der Ultrazentrifuge bei 4° C und 30.000 rpm 30 min zentrifugiert.
- Das Pellet wurde in 1 ml TBS resuspendiert und 30 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert um die Ghosts abzuheben. Die im Pellet befindlichen Vesikel wurden in TBS resuspendiert und kurz abgespinn um die Großvesikel zu erhalten. Aus dem Überstand wurden durch Zentrifugation (13k 4°C 30 Minutn) die Vesikel präpariert und ebenso wie die Großvesikel bis zur Weiterverarbeitung (Konzentrationsbestimmung, Labeling) auf 4 ° gelagert.

FITC Markierung der Vesikel:

Die so erhaltenen Vesikel wurden abzentrifugiert (große Vesikel: 20 Sekunden bei 13k Raumtemperatur, kleine Vesikel: 30 Minuten bei 13 K und 4° C) und in 600µl Carbonatpuffer (0.1 M, pH 9.5) resuspendiert und mit 2 µl Fluorothioisocyanat (FITC) 30 Minuten bei 37 ° C inkubiert (Schüttelinkubator)

Anschließend wurden die gelabelten Vesikel abzentrifugiert (20 sec große Vesikel, 30 Minuten Vesikel) und je 2 mal im Carbonatpuffer und 2 mal in Phosphatpuffer gewaschen und anschließend in je 200 µl Phosphatpuffer resuspendiert.

Um gleiche Konzentrationen der Vesikelsuspension zu erreichen wurden Vesikelkonzentration und Extinktion gemessen und die Vesikel auf das nötige Volumen verdünnt.

Proteinbestimmung mittels BIORAD Proteinassay:

Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe von BSA in TBS 0.5 % SDS verwendet

S1 = 40 µl BSA (3 mg/ml)

S2 = 32 µl BSA (3 mg/ml) + 8 µl TBS 0.5 % SDS (=2.4 mg/ml)

S3 = 20 µl BSA (3 mg/ml) + 20 µl TBS 0.5 % SDS (= 1.5 mg/ml)

S4 = 8 µl BSA (3mg/ml) + 32 µl TBS 0.5 % SDS (= 0.6 mg /ml)

S5 = 40 µl BSA (0.3 mg/ml)

S6 = 20 µl BSA (0.3 mg/ml) + 20 µl TBS 0.5 % SDS (= 0.15 mg /ml)

S0 = 40 µl TBS 0.5 % SDS (Nullkontrolle ohne Protein)

Die Vesikel wurden ebenfalls in TBS SDS verdünnt

V1 = 20 µl Vesikelresuspension in 20 µl TBS 1% SDS (1/2)

V2 = 20 µl von V1 + 20 µl TBS 0.5 % SDS (1/4)

V3 = 20 µl von V2 + 20 µl TBS 0.5 % SDS (1/8)

Proteinassay:

Um die Proteinkonzentration wurden je 40 µl Standard bzw. Vesikelverdünnung mit 100 µl A' (= 1000 µl Biorad Solution A + 12 µl Solution S) versetzt und gut durchmischt. Nach Zugabe von 800 µl Solution B (Starten der Reaktion) und mindestens 15 Minuten inkubiert. Die Proteinbestimmung erfolgte durch Messung bei 720 nm im Photometer).

Als zweites Maß für die Proteinkonzentration diente die Messung der Extinktion einer Vesikelverdünnungsreihe (1/20, 1/40, 1/80 der Ausgangslösung in TBS, Nullwert reines TBS) bei 412 nm (U-2000 Hitachi, Tokyo)

Messung der Acetylcholinesterase Aktivität:

Um für die Vesikelversuche gleiche gelabelte Oberflächen zwischen Erythrozyten und Vesikeln zu erhalten, wurde die jeweilige Acetylcholinesterase Aktivität bestimmt

Reagentien:

Natrium Phosphat , 100 mM , pH 7.5

DNTB 10 mM in 100 mM Natriumphosphat

Acetylthiocholine Chlorid (ATCC) 12.5 mM

Triton X-100 2% (v/v) in 5P8

5p8: 5mM Natrium Phosphat, pH=8

Assay:

Für den AChE- Assay wurde die Probe in gleichem Volumen Triton-X-100 gelöst und kurz vorinkubiert. Nach Zugabe von 600 µl Natrium Phosphat und je 50 µl DNTB und ATCC wurde die Acetylcholinesteraseaktivität bei 412 nm (Hitachi U 2000, Tokyo)

Phagozytoseassay: Durchflusszytometrie

90 µl Probe wurden mit 10 µl Zymosan (NOZ, NOZ-F, NoZ-AF 633 in Pu+ Ca +Mg), fMLP, PMA oder Vesikel stimuliert und 15 bis 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Danach wurden die Proben mit 1000 µl FACS Lysingsolution versetzt und lysiert. Nach 10 Minuten Inkubation im Dunkeln wurden die neutrophilen Granulozyten in 1 ml DPBS resuspendiert und im FACSCalibur bei geeigneten Settings gemessen (Gate auf Population der neutrophilen Granulozyten, 10000 events pro Messung).

Die Phagozytoseaktivität wurde an Hand der Aufnahme von gelabelten Zymosan, Erythrozyten oder Vesikeln durch die neutrophilen Granulozyten erfasst. Als Maß für den oxidativen Stress durch die Stimulation diente die Zugabe von DHR. Es besteht jedoch der Verdacht, dass DHR selbst zum Teil von den Erythrozyten gebunden wird bzw. geringfügig die Phagozytose hemmt.

Auswertung der Phagozytose erfolgte über die im Gerät inkludierte Statistiksoftware. Als Maß für die Aktivierung wurde der % der gateden Events im Bereich M2 (Fluoreszenzbereich 10^2 bis 10^4). Definitionsgemäß wurde jede Zelle mit einer Fluoreszenz größer 10^2 als aktiv gewertet. Als Lagemaße wurden Mittelwert bzw. geometrisches Mittel verwendet um die Verschiebungen der Granulozytenpeaks zu messen. Da es trotz Standardisierung der Zellzahlen und Verwendung von DPBS Puffer an Stelle von Plasma große Unterschiede in der Aktivierbarkeit der Zellen gab, wurde aus den gemittelten Messresultaten jeweils ein Koeffizient ermittelt.

Alternativ dazu wurden die events pro gate herangezogen, um den Grad der Aktivierung zu ermitteln. Hierzu wurden insgesamt 9 gates definiert, aus denen sich wichtige Parameter der Aktivierung messen lassen. Um von diesen relativen Werten zu Absolutwerten zu gelangen, wurden zudem Experimente in sog TruCountTubes

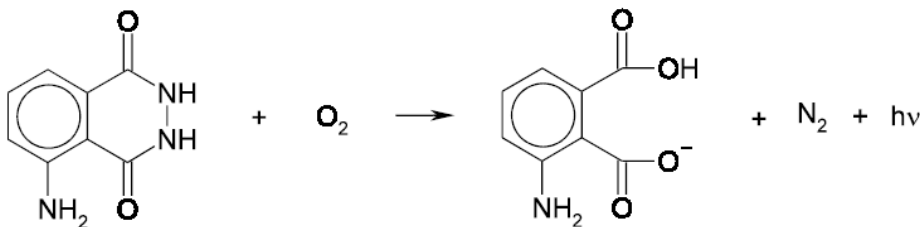
(BD Catalog Nr. 340334). Hierzu wurden 500 µl Lysepuffer in die Tubes vorgelegt, gut gevortext und 15 Minuten im Dunkeln vorinkubiert. Jeder 100 µl Ansatz wurde in FACS Lysingpuffer (BD Bioscience, 1:10 verdünnt) lysiert und nach der Inkubation in die TruCountTube überführt. Da sich pro Tube 53788 fluoreszierende Beads befinden, lässt sich aus der Zahl der gemessenen Beads auch die Absolutzahl der Zellen errechnen.

Die Messung in den TruCountTubes zeigte, dass die Zahl der neutrophilen Granulozyten geringer war als angenommen. Grund hierfür dürfte die Präparation durch Dextranfällung sein. Durch das langsame Absinken der Erythrozyten müsste ein Teil der WBC entgegen der Sedimentationsrichtung nach oben diffundieren. In der Tat entspricht dieser „Verlust“ ziemlich genau (1-Hämatokrit). Daher wurde auch das Volumen, in dem die WBC resuspendiert wurden um diesen Faktor auf $4 \cdot (1 - \text{Hkt})^2 / 2$ korrigiert (bei Präparation von WBC aus 4 µl VB).

Lumineszenzmessung:

Zur Messung des Oxidativen Bursts wurde ferner die Messung der Lumineszenz im Luminometer Victor3 herangezogen. Als Marker für die Bildung der ROS wurden Luminol und Lucigenin verwendet:

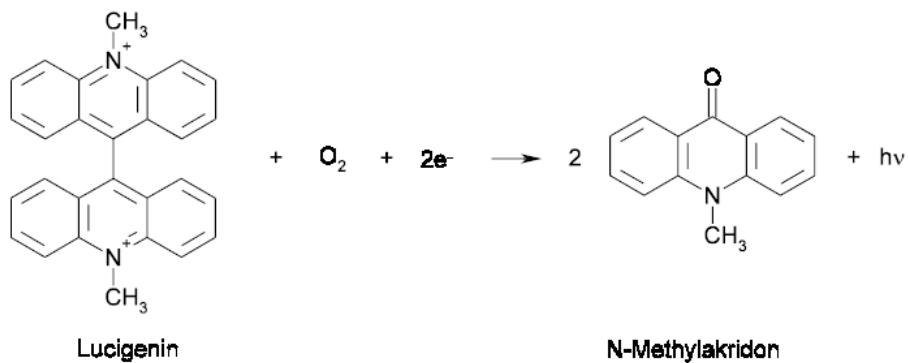
Die dem Nachweis von Sauerstoffradikalen mit Luminol zu Grunde liegende Reaktion ist eine Oxidation, genauer gesagt eine 1-Elektronen Oxidation und 1-Elektron-Reduktion. Dabei bildet Luminol mit Superoxidionen das angeregte Reaktionsprodukt Aminophthalat.



Luminol

Aminophthalat

Lucigenin (chemischer Name bis-N-Methylacridinium) hingegen bildet in einer reduktiven Oxygenierung das chemolumineszierende angeregte Endprodukt N-Methylacridon.



Für die Messung des Oxidativen Bursts wurde ein Gesamtmix aus Zellen und DBS mit 2µl Lucigenin bzw. 5µl Luminol (2mm)/ 100 µl Probe versetzt und in die Well Platten vorgelegt. Auf Grund der sehr starken Absorption des Signals durch das in den Erythrozyten enthaltene Hämoglobin kam es bei einigen Experimenten zu relativ schwachen Signalen. Daher wurde die Probe in diesen Fällen durch 100 µl DPBS 1:1 verdünnt (100 µl DPBS wurden in die Wells vorgelegt und mit der Probe versetzt). Die Messung der Biolumineszenz erfolgte bei 37 ° C am Luminometer Victor 3 des Departments für Molekulare Genetik (99 repeats ohne delay, shaking um ein Absinken der Zellen zu verhindern).

4 Ergebnisse

4.1 Variationen der Zellzahlen

Um den Einfluss der Zellzahlen auf die Phagozytose zu untersuchen wurden Proben mit unterschiedlichen Zellzahlen vorbereitet (Berechnung mittels Excel File) und im Phagozytoseassay (0.5 Zymosanstandard, 30 min bei 37°) untersucht:

WZ = „Wiederzusammengesetztes Blut“ (Zellzahlen wie Vollblut lt. Blutbild),

ER = „Erythrozytenreich“ (Erythrozytenzahl + 25%, WBC bzw. Granulozyten wie Vollblut)

EA = „Eryarmes Blut“ (Erythrozytenzahl + 25%, WBC bzw. Granulozyten wie Vollblut)

LR = „Leukozytenreiches Blut“ (Erythrozytenzahl wie Vollblut, WBC bzw. Granulozyten + 25%)

LA= „Leukozytenarmes Blut“ (Erythrozytenzahl wie Vollblut, WBC bzw. Granulozyten - 25%)

WBCR= WBC + 25% in Puffer

WBCA= WBC-25% in Puffer

Um die Proben aufzufüllen wurde je nach Fragestellung Plasma oder DPBS verwendet, um die Proben auf das gewünschte Volumen zu bringen. Soweit als möglich wurde Plasma durch Puffer ersetzt um annähernd gleiche Bedingungen zu erreichen. Aus diesem Grund sind wir auch dazu übergegangen, Zymosan in einem fixen Volumen 10x DPBS + Ca Mg + Glucose zu resuspendieren. Die Menge an eingesetzter Zymosan Stocklösung wurde zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den Experimenten in jeweils gleichen Volumina zugegeben (1/10 des Endvolumens). Auf diese Weise konnten wir annähernd gleiche Ca²⁺ Mg+ Glucose Versorgung sicherstellen.

VB	WZ	ER	EA	LR	LA	WBC	WBCR	WBC A
0,77	1,00			0,78	1,42	1,72	1,46	2,06
1,86	1,00			0,79	0,93	1,21	1,29	3,07
0,76	1,00			0,80	1,80	1,72	2,16	0,28
1,34	1,00							
1,13	1,00	1,71	1,32	0,74	1,58	1,55	1,52	2,71
1,14	1,00			0,54	2,08	2,27	1,70	1,65
1,30	1,00	1,50	1,27	1,10	1,97	1,63	1,33	2,37

	1,15	1,00	0,87	1,04	0,61	1,30	1,63	1,09	1,43
	0,78	1,00	1,33	0,67	0,67	1,86	1,33	1,86	2,22
	0,00	1,00	1,00	0,88	0,45	1,30	1,45		
MW	1,14	1,00	1,27	1,03	0,72	1,58	1,61	1,55	1,97
STABW.	0,35	0,00	0,40	0,27	0,19	0,38	0,30	0,34	0,86

Tabelle 4.1-A Mittelwerte und Standardabweichungen d ,Aktivitätskoeffizienten verschiedener Versuche (n=9): Zweck s Vergleichbarkeit wurde der Prozentsatz an aktiven Granulozyten in WZ 1 gesetzt und die restlichen Werte dazu in Relation gesetzt

Wie aus der Tabelle 4.1.-A eindeutig hervorgeht, führt eine Erhöhung der Anzahl an Granulozyten zu einem Rückgang des Anteils der phagozytierenden Granulozyten. Dies sieht man sowohl bei Vergleich von WZ mit LR, als auch wenn man WBC ohne Erythrozyten betrachtet (Vergleich WBC mit WBCR). Ebenso führt eine Reduktion der Anzahl an WBC in beiden Fällen zu einer massiven Steigerung des Anteils der phagozytierenden Granulozyten. Proben ohne Erythrozyten (WBC, WBC R, WBC A) zeigen mit Abstand die höchsten Werte an Phagozytose. Man kann daher daraus schließen, dass Erythrozyten direkt oder indirekt die Phagozytose von Neutrophilen hemmen.

Betrachtet man die Werte für ER und EA so scheinen mehr Erythrozyten ebenfalls die Phagozytose zu steigern. Es ist jedoch anzunehmen, dass diese Steigerung auf noch in der Erythrozytensuspension vorhandenen neutrophilen Granulozyten zurückzuführen ist. Auch zeigen die großen Standardabweichungen die große Varianz in der Fähigkeit zur Phagozytose. Dies liegt zum einen an den unterschiedlichen Zellzahlen, da sich bei diesem Experiment die Blutzusammensetzung sich an der des Spenderblutes orientiert. Zum anderen kann das aber auch an einer gewissen Voraktivierung der Zellen liegen. Ein Hinweis darauf findet sich auch darin, dass auch bei Verwendung von „ Standardblut“ (sowohl Erythrozyten als auch neutrophile Granulozyten standardisiert auf einen Mittelwert laut Blutspenderliste, Zymosanmenge berechnet auf neutrophile Granulozyten) ähnlich große Schwankungen in der Phagozytoseaktivität zu beobachten ist. Auch das Plasma kann hier eine gewichtige Rolle spielen. Zwar sind die einzelnen Proben (mit Ausnahme von VB ohne Plasma) bereitet worden, das Zymosan ist jedoch 30 min bei 37° in zellfreiem Plasma vorinkubiert worden. Dies sollte die Fähigkeit der Neutrophilen zur Phagozytose erhöhen (Opsonierung).

Den Einfluss der Erythrozyten auf die Phagozytose sieht man auch, wenn man betrachtet, was bei einer Reduktion der Erythrozytenzahl um mehr als 25% passiert.

VB	WZ	E1/4	E1/16	E1/64	E1/256	1/1024	E1/4384	WBC	
36,0	24,0	39,0	54,0	69,0	58,0	65,0	76,0	81,0	% aktive Granulozyten
64	76	61	46	31	42	35	24	19	% inaktive Granulozyten
0,67	1,00	1,63	2,25	2,88	2,42	2,71	3,17	3,38	Aktivitätskoeff.

Tabelle 4.1-B : Abhängigkeit der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten von der Erythrozytenzahl bei Blutvariationen aus WBC und Erythrozyten: Hier ist eine deutliche negative Korrelation zwischen Erythrozytenzahl und dem Grad der Aktivierung der Neutrophilen zu erkennen

Wie in Tabelle 4.1-B dargestellt zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit der Phagozytoseaktivität von der Erythrozytenzahl. Die Phagozytoseaktivierung ist indirekt proportional zur Anzahl der Anwesenden Erythrozyten. Selbst bei einer Verdünnung der Erythrozyten auf 1/4384 der Ausgangsmenge findet sich ein Unterschied in der Phagozytoseaktivierung verglichen mit einer vollkommen erythrozytenfreien Probe. Bereits geringe Mengen an Erythrozyten sind in der Lage, in die Aktivierung einzugreifen.

Diese inhibierende Wirkung ist wahrscheinlich nicht Lymphozytenabhängig, denn auch bei Verwendung von Ficoll gereinigten neutrophilen Granulozyten gibt sich die gleiche indirekte Proportionalität zwischen Erythrozytenzahl und Phagozytoseaktivität (Tabelle 4.1-C).

VB	WZ	E1/4	E 1/16	E1/64	WBC	
4,00	5,50	4,50	12,00	15,00	16,50	aktiv %
96,00	94,50	95,50	88,00	85,00	83,50	inaktiv %
0,73	1,00	0,82	2,18	2,73	3,00	Koeff.aktive

Tabelle 4.1-C Abhängigkeit der Aktivierung (Phagozytose) von der Erythrozytenzahl unter Verwendung gereinigter Granulozyten: Der Grad an Aktivierung ist indirekt proportional der Erythrozytenanzahl

Wie aus Tabelle 4.1_C ersichtlich steigt der Prozentsatz an phagozytierenden Neutrophilen mit abnehmender Erythrozytenzahl auf bis zu 300% des Ausgangswertes (aktivierte Neutrophile im wiederzusammengesetzten Vollblut). Unabhängig von der Anzahl der Lymphozyten zeigt sich auch hier eine negative Korrelation zwischen Erythrozytenzahl und Aktivierung.

4.2 Einfluss der Enzyme Katalase und Superoxiddismutase

Der inhibierende Einfluss der Erythrocyten könnte möglicherweise durch die beiden Enzyme Katalase und Superoxiddismutase vermittelt werden. In der Tat zeigte ein Vorversuch eine Steigerung des Prozentsatzes an aktiven Granulozyten (Phagozytose) bei Inhibierung eines oder beider Enzyme.

	WZ	WZ	WZ	CAT-	CAT-	CAT-	SOD-	CAT-/SOD-
aktiv	43%	45%	27%	57%	39%	62%	48%	65%
inaktiv	57%	55%	73%	43%	61%	38%	52%	35%

Tabelle 4.2-A : Vorversuch zu den Inhibierungsexperimenten: Inhibition von Katalas (CAT) und/oder Superoxiddismutase unter Verwendung von WBC: Sowohl die Inhibition von CAT als auch SOD bringt eine erhöhte Aktivierung der Granulozyten in Prozent der gatedeten Neutrophilen laut FACS)

Wie aus Tabelle 4.2-1 hervorgeht, hemmen sowohl CAT als auch SOD die Phagozytose. Bei Inhibierung der CAT kommt es zu einem Anstieg in der Aktivierung von ursprünglich 45 % auf über 60 %, bei Doppelinhibierung gemeinsam mit SOD sogar 65%. Eine Inhibierung der SOD alleine zeigt nur einen geringen Effekt Da bei Wegfall der CAT die Aktivierung mehr zunimmt als bei Inhibierung der SOD, wurde beschlossen, die Rolle der Katalase näher zu durchleuchten.

4.2.1 Einfluss der Katalase auf WBC

Um den Einfluss der Erythrozytenkatalase auf WBC zu untersuchen wurde der oxidative Stress (durch Zugabe von DHR, FL1 bzw. über Luminol in der Lumineszenzmessung) als auch die Fähigkeit zur Phagozytose (gemessen durch die Aufnahme von AF-633 markiertem Zymosan, FL4) bei unterschiedlichen Erythrozytenzahlen bestimmt

Ohne zusätzlichen Stress durch Zugabe von Wasserstoffperoxid sind allgemein die Unterschiede mit und ohne Katalase relativ gering. Bei normaler Erythrozytenzahl betrifft die Inhibierung vor allem inaktive Granulozyten (1. Peak). Bei Reduktion der Erythrozytenzahl auf 1/64 findet man keinen Unterschied mehr zwischen Katalase+ und Katalase -. Allgemein steigt der Oxidative Stress mit Reduktion der Erythrozytenzahl. Diese Beobachtung ist unabhängig von der Katalaseaktivität der Erythrozyten. Diese Zunahme ist zu groß um alleine durch eine Bindung von dem Marker DHR an Erythrozyten erklärbar zu sein. Wir gehen daher davon aus, dass Erythrozyten per se Fähigkeit besitzen, den oxidativen Stress abzupuffern.

Was die Fähigkeit zur Phagozytose von Zymosan betrifft, kann bei normaler Anzahl an Erythrozyten kein Unterschied festgestellt werden. Erst bei einer Reduktion der Erythrozytenzahl auf 1/64 scheint die Inhibierung der Katalase zu einer verstärkten Phagozytose zu führen.

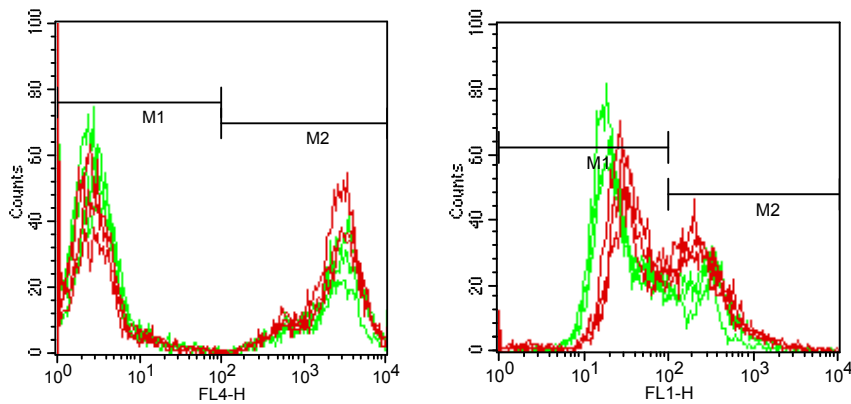


Abbildung 4.2.1-A: Vergleich zwischen WBC CAT+ (grün) und CAT- in Phagozytose (FL4) und oxidative Burst (FL1): Es zeigt sich lediglich ein geringer Unterschied im FL1 da Wasserstoffperoxid nicht abgebaut wird.,

Bei einfacher Erythrozytenzahl findet sich kein Unterschied zwischen CAT+ und CAT- in FL4. Bei Inhibition der Katalase kommt es jedoch zu einem geringen Anstieg des oxidativen Stresses (durch verminderten Wasserstoffperoxidabbau)

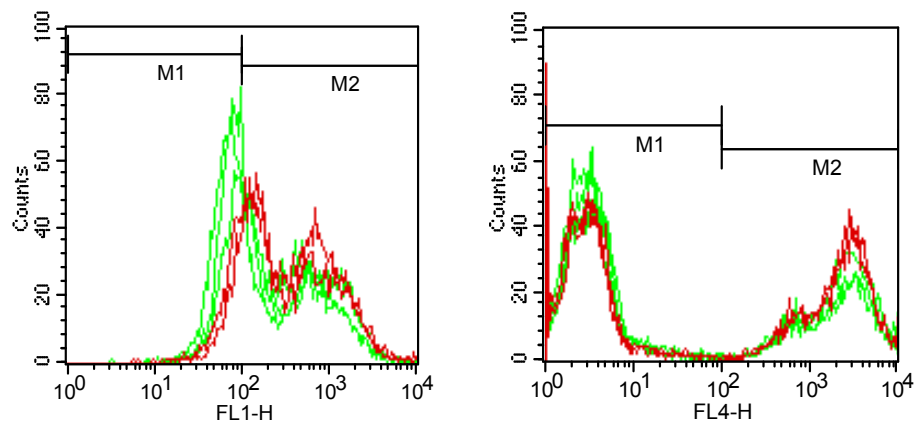


Abbildung 4.2.1-B: Vergleich von WBC E 1/64 CAT+ (grün) und CAT- (rot) in FL4 (Phagozytose) und FL1 (oxidativer Burst): Trotz des leicht gestiegenen oxidativen Stresses finde man bei 1/64 CAT- sogar einen leichten Anstieg in der Phagozytose gegenüber 1/64 CAT+)

Bei Reduktion der Erythrozytenzahl auf 1/64 der Ausgangskonzentration steigt zwar der oxidative Stress (Abb. 4.2.1-B links) bei fehlender Enzymaktivität, dennoch findet man einen leichten Anstieg in der Phagozytose. (Abbildung 4.2.1-B rechts) Wir sehen darin ein Indiz für einen Regelmechanismus durch ROS, Wasserstoffperoxid könnte in der Tat aktivierend auf die Phagozytoseaktivität einwirken)

4.2.2 Einfluss der Katalase auf gereinigte Granulocyten

Auch für Ficoll gereinigte Granulozyten gilt prinzipiell das Gleiche wie für WBC. Auch hier ist die Phagozytoseaktivität bei Standarderythrozytenzahl nahezu identisch. Unterschiede werden, wenn überhaupt, meist erst bei Reduktion der Anzahl der RBC beobachtet.

Eine Steigerung in der Phagozytoseaktivität durch Reduktion der Erythrozytenzahl fanden wir sowohl mit als auch ohne aktive Katalase. Hierbei soll erwähnt werden, dass die Veränderung in der Phagozytose vor allem bei aktiver Katalase zu sehen ist. Daraus lässt sich folgern, dass die Katalaseaktivität der Erythrocyten bzw. die Konzentration von Wasserstoffperoxidationen zumindest zum Teil regulativ auf die Immunantwort der Granulozyten eingreift. In geringerem Maße steigt auch bei Katalaseinhibition die Phagozytoseaktivität mit abnehmender Erythrozytenanzahl. Allgemein scheint ohne Lymphozyten die Katalase der Erythrozyten eher von Vorteil zu sein. Gibt man jedoch eine Standardmenge an Lymphozyten (Durchschnittswert der Blutspenderliste) zu, so verhalten sich die Proben wie ungereinigte WBC. Wie in der Tabelle 3.2.2a zu sehen, nimmt bei Anwesenheit von Lymphozyten der Grad der Aktivierung bereits bei einfacher Erythrozyten Zahl zu und die Population schieft etwas nach rechts (deutlich an der Lage des Mittelwertes bzw. geometrischen Mittels zu sehen.) Bei weiterer Erhöhung des oxidativen Stresses durch Reduktion der Erythrozytenzahl auf 1/64 der Ausgangskonzentration, verschiebt sich zwar der Peak weiter nach rechts, der Prozentsatz an phagozytierenden Neutrophilen unterscheidet sich jedoch nur mehr geringfügig. Bei nur 1/64 der Erythrozyten dürfte der Stress bereits einen Punkt erreicht haben, der über einen negativen Rückkoppelungsmechanismus die Aktivierung der Neutrophilen erschwert. An diesem Punkt wird auch der Unterschied zwischen CAT+ und CAT- durch die Reduktion der Erythrozyten bereits derart reduziert, dass die erhöhte ROS-Konzentrationen nur mehr marginal mehr Phagozytose erlaubt.

		events	% gated	% Total	Mittelwert	geometrisches Mittel
Neu CAT+ Lym-	FL4	4917	49	48	2397	1984
Neu CAT- Lym-	FL4	4825	48	46	2312	1938
Neu 1/ 64 CAT+ lym -	FL4	5332	53	52	2544	2117
Neu 1/64 CAT-lym-	FL4	4852	48	46	2375	1924
Neu CAT+ Lym+	FL4	4298,00	42,54	38,82	2007,92	1612,37
Neu CAT- Lym+	FL4	5969,33	59,16	55,24	2253,42	1839,15
Neu 1/ 64 CAT+ lym +	FL4	7122,67	64,89	64,89	2486,51	1996,76
Neu 1/64 CAT-lym+	FL 4	7200,00	65,68	65,68	2436,60	1961,32

Tabelle 4.2.2-A Vergleich von gereinigten Neutrophilen mit unterschiedlichen CAT+/CAT- Erythrozytenzahlen mit und ohne Lymphozyten

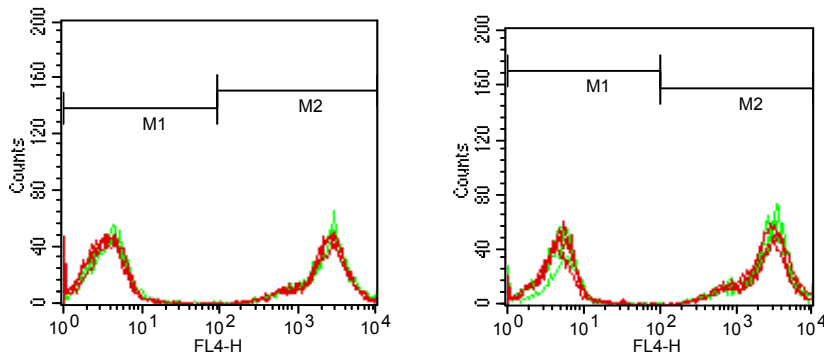


Abbildung 4.2.2-A: Vergleich Neu CAT+ (grün) und CAT- (rot) ohne Lymphozyten im FL4 (Phagozytose); links normale Eryzahl, rechts Reduktion auf E 1/64; leicht mehr Phagozytose mit Katalase bei E 1/64)

Ohne Lymphozyten findet sich bei einfacher Erythrozytenzahl kaum ein Unterschied in der Phagozytose (Abb 4.2.2-A, links). Auch bei Reduktion auf 1/64 erlaubt der Schutz durch das Erythrozytenenzym Katalase nur eine geringe Steigerung im Grad der Aktivierung.

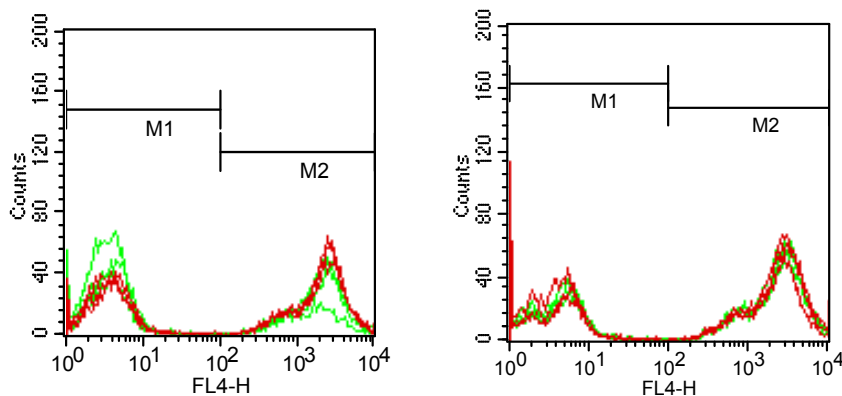


Abbildung 4.2.2-B Vergleich Neutrophile CAT+ (grün) und CAT- (rot) im FL4 (links normale Konzentration, rechts Reduktion auf 1/64 der Eryzahl) mit Lymphozyten. Unter Anwesenheit von Lymphozyten verliert die Katalase ihren Vorteil bezüglich der Phagozytose.

Sind Lymphozyten anwesend (laut Blutspenderliste) kann CAT- trotz erhöhten oxidativen Stresses (Abb 4.2.2-C und D) sogar leicht mehr Zymosan aufnehmen als CAT+.

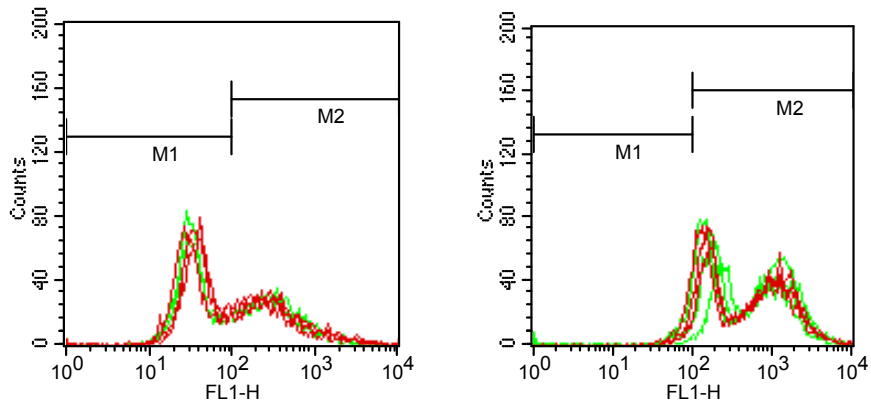


Abbildung 4.2.2-C: Vergleich Neu CAT+ (grün) und CAT- (rot) bzw. 1/64 CAT+ und 1/64 CAT- ohne Lymphozyten im FL1 (Oxidativer Burst):

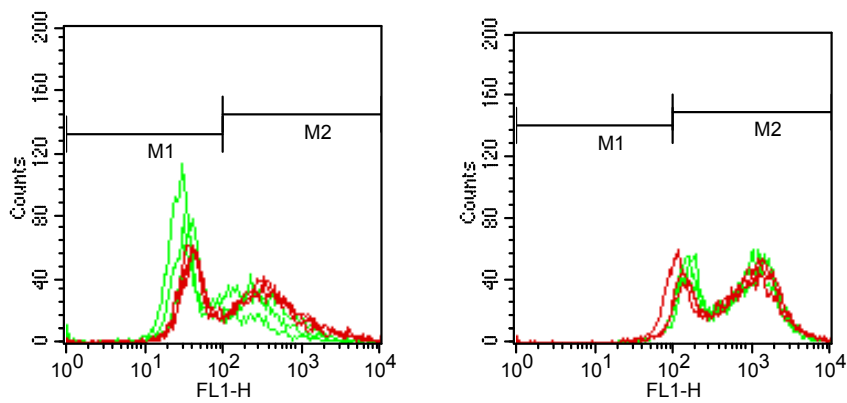


Abbildung 4.2.2-D: Vergleich Neu CAT+ (grün) und CAT- (rot) bzw. 1/64 CAT+ und 1/64 CAT- mit Lymphozyten im FL1 (Oxidativer Burst):

Wie aus der Tabelle 4.2.2-A ersichtlich, ist bei normaler Erythrozytenzahl der Prozentsatz der in M2 gateden (aktiven) Granulozyten (per Definition jener Prozentsatz der Neutrophilen in einem Fluoreszenzbereich von 10^2 bis 10^4 laut Histogrammstatistik) nahezu ident. Erst bei Reduktion der Erythrozytenzahl nimmt bei CAT+ der Prozentsatz der aktiven Granulozyten leicht zu, während bei CAT- die Aktivierung in etwa gleich bleibt. Möglicherweise ist unter diesen Bedingungen mit 48 % bereits das Maximum erreicht, das ohne Schutz durch Katalase möglich ist. Da sowohl Mittelwert als auch geometrisches Mittel bei Anwesenheit der Katalase nach rechts shiften, ist offenbar die Katalase in diesem Fall von Vorteil für die Phagozytose.

Bei Anwesenheit von Lymphozyten ändert sich das Bild wie in Tabelle 3.2.a unten angeführt. Nun sind sowohl bei CAT+/CAT- als auch bei Reduktion der Erythrozytenzahl auf 1/64 die katalaseinaktivierten Proben diejenigen, die mehr Zyмосan aufnehmen können. Betrachtet man als 2. Parameter Mittelwert oder geometrisches Mittel, so ist auch hier die Inaktivierung von Katalase fördernd für die Aufnahme von Zyмосan.

Sowohl Mittelwert als auch geometrisches Mittel zeigen eine leichte Zunahme bei inaktiver Katalase. Auch unter Einfluss der Lymphozyten sieht man eine Steigerung der Phagozytose bei Reduktion der Erythrozyten. Bei einer Erythrozytenzahl von 1/64 des Standards ($4.8 \cdot 10^5$ pro 100 μ l) nähern sich die Werte für Cat+ und CAT- wieder an. Dies spricht dafür, dass auch hier die Grenzen des Schutzes durch die radikalabbauende Katalase langsam erreicht wird. Dieser Wert liegt jedoch deutlich höher als in Proben ohne Lymphozyten. Dies kann eine aktivierende Wirkung der Lymphozyten auf die Phagozytose bedeuten. Entweder direkt, indem Lymphozyten aktiv über Cytokine regulierend eingreifen, oder indirekt über Reduktion des oxidativen Stresses.

	events	% gated	% total	Mittelwert	Geometrisches Mittel
Neu CAT+ Lym-	4208	42	41	389	298
Neu CAT- Lym -	4171	41	40	449	302
Neu 1/64 CAT+ Lym -	9482	94	89	772	495
Neu 1/64 CAT- Lym -	9247	92	89	741	443

Neu CAT+ Lym +	3452	34	31	360	269
Neu CAT- Lym +	5594	55	52	583	382
Neu 1/64 CAT+ Lym +	9615	95	88	854	548
Neu 1/64 CAT- Lym +	9091	90	83	927	589

Tabelle 4.2-B Vergleich Neu CAT+ und CAT- bei diversen Erykonzentrationen mit (unten) und ohne (oben) Erythrozyten gemessen im FL1 (oxidativer Burst)

Wie aus Tabelle 4.2.2-B ersichtlich unterscheiden sich im FL1 die Prozentsätze der Aktivierung im oxidativen Burst (FL1) zwischen CAT+/CAT- bzw. 1/64 CAT+/- kaum. Hier nimmt wie erwartet der oxidative Stress sowohl bei Inhibierung der Katalase als auch, im wesentlich stärkeren Ausmaß, bei Reduktion der Erythrozytenzahl zu. Während bei Standarderythrozytenzahl der Peak bei Katalaseinhibition nach rechts shiftet, zeigt sich bei Reduktion der Erythrozyten auf 1/64 der Ausgangszahl genau das Umgekehrte. Auch dieses ist ein Indiz für zunehmende Hemmung der neutrophilen Granulozyten durch den von ihnen selbst verursachten oxidativen Stress. Die neutrophilen Granulozyten scheinen bereits über einen negativen feedback loop den oxidativen Burst einzubremsen, da eine weitere Zunahme des oxidativen Stresses schwere Folgen mit sich bringen würde.

4.3 Einfluss von Wasserstoffperoxid

Da die obigen Experimente zum Teil nur geringe Unterschiede +/- aktive Katalase zeigten, stellte sich die Frage, wie die Zellen reagieren, wenn auf die Erythrozyten zusätzlicher Stress über externes H_2O_2 ausgeübt wird. Hierfür wurden je 5µl gereinigte Erythrozyten +/- Katalase in 150µl DPBS resuspendiert und mit 5µl Wasserstoffperoxid (30%) versetzt. Nach einer kurzen Abzentrifugation wurden die Erythrozyten in DPBS resuspendiert.

Aus den so erhaltenen Erythrozyten wurde mit WBC Proben mit unterschiedlicher Erythrozytenzahl gemischt und mit Zymosan und DHR in einem Phagozytoseassay untersucht.

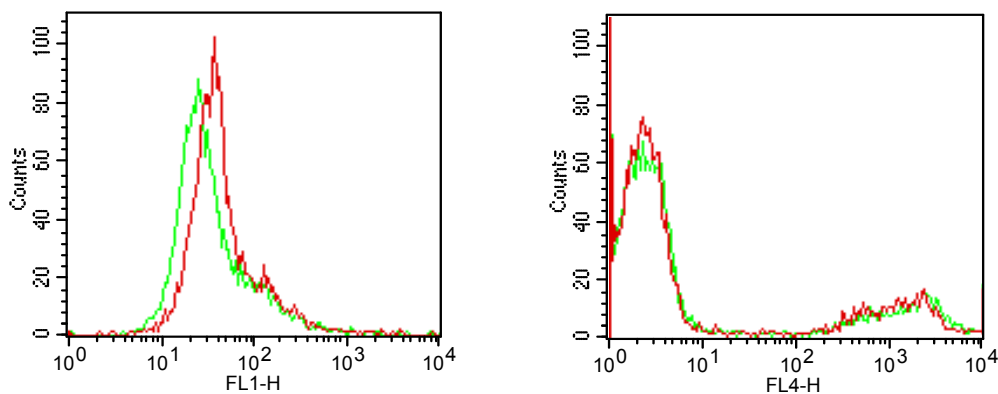


Abbildung 4.2.2-A Vergleich von WBC + CAT+ (grün) und CAT- (rot) Erythrozyten ohne Vorbehandlung der Erythrozyten mit Wasserstoffperoxid

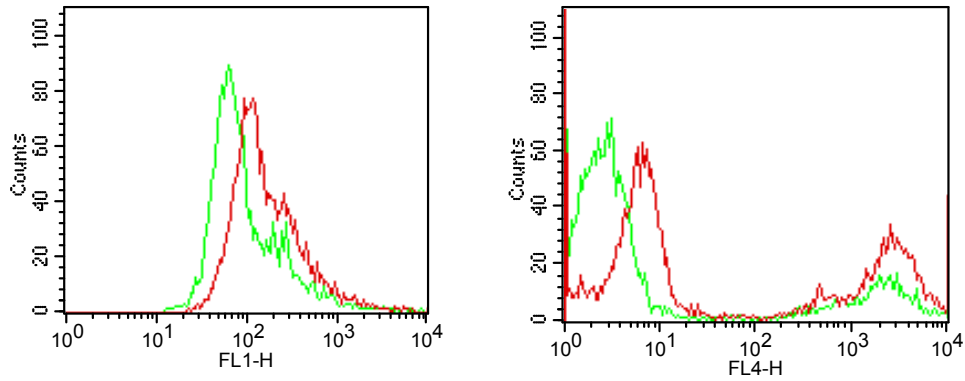


Abbildung 4.2.2-B von WBC + CAT+ (grün) und CAT- (rot) Erythrozyten ohne Vorbehandlung der Erythrozyten mit Wasserstoffperoxid

Es zeigte sich, dass bei einfacher Erythrozytenzahl sich die Phagozytoseraten nur geringfügig zwischen CAT+ und CAT- unterscheiden. Ohne zusätzlichen Stress ist z. T. noch mehr Phagozytose bei aktiver Katalase beobachtbar, reduziert man jedoch die Erythrozytenzahl, so sind die Granulozyten bei inhibierter Katalase wesentlich aktiver:

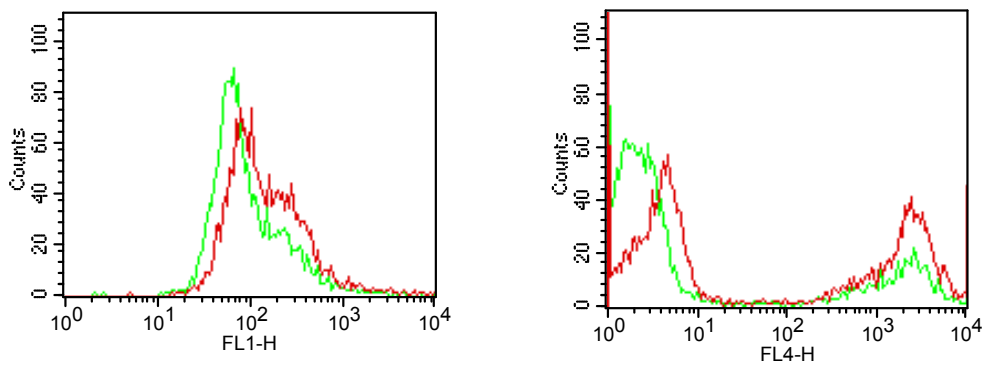


Abbildung 4.2.2-C WBC + 1/64 CAT+ (grün) und 1/64 CAT- (rot) Erythrozyten mit Vorbehandlung der Erythrozyten mit Wasserstoffperoxid

Mit zunehmender Verdünnung nähern sich dann wieder die Phagozytoseraten an. Ist zusätzlicher Stress durch H_2O_2 vorhanden, findet man kaum Unterschiede.

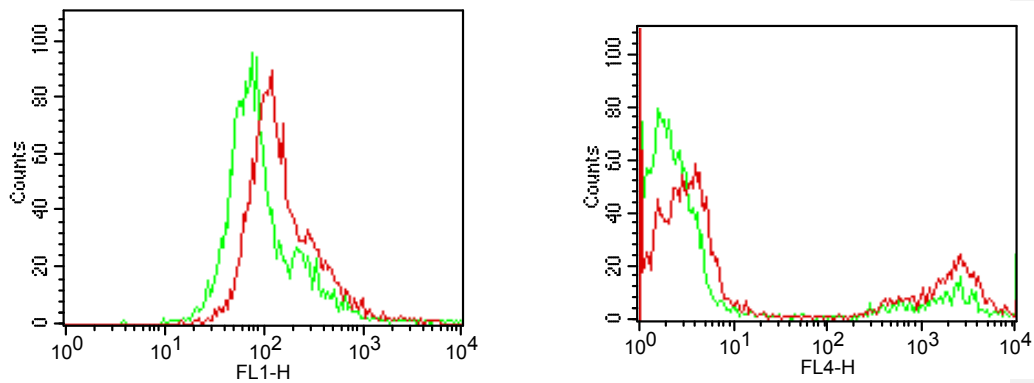


Abbildung 4.2.2-D: Vergleich WBC 1/256 CAT+ (grün) und 1:256 CAT-) ohne Vorbehandlung mit Wasserstoffperoxid.

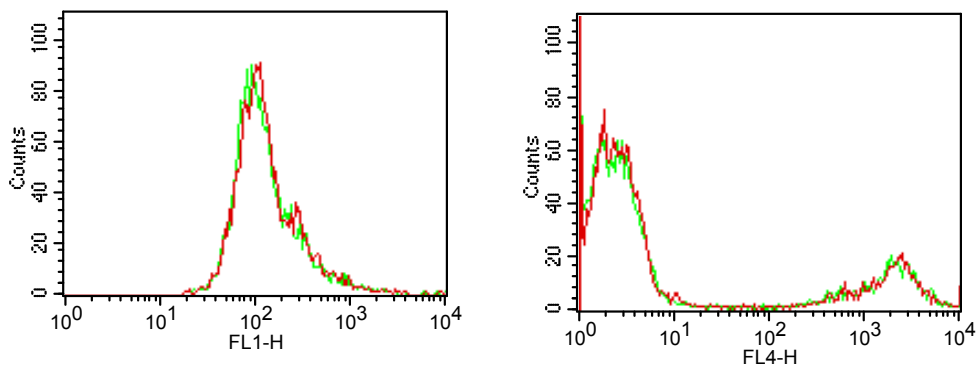


Abbildung 4.2.2-E: Vergleich WBC 1/256 CAT+ (grün) und 1:256 CAT-) mit Vorbehandlung mit Wasserstoffperoxid.

Was den oxidativen Stress betrifft, so reicht bei normaler Erythrozytenzahl alleine deren Anwesenheit aus, um den Stress abzapuffern. Erst bei Reduktion der Erythrozytenzahl bzw. zusätzlichem H_2O_2 zeigt sich ein Rechtsshift im FL1 sowie deutlich gesteigerte Phagozytose. Jedoch wird bei zusätzlichem Wasserstoffperoxid bei Reduktion der Erythrozytenzahl rasch ein Punkt erreicht, an dem die Katalaseaktivität nicht mehr ausreicht, den oxidativen Stress abzubauen.

	% Gated	X Mean	X Geo Mean	Median
WZ Ery	11,6	255,28	197,68	171,54
WZ Ery H202	10,56	238,85	179,15	149,89
WZ E1/64	31,1	281,62	210,24	187,69
WZ E1/64 H202	31,83	254,39	201,25	182,69
WZ E1/256	35,87	267,79	188,97	162,53
WZ E1/256 H202	58,48	221,69	173,54	142,02
WZ CAT-	5,26	194,08	156,39	126,35
WZ CAT- H202	12,76	231,47	175,41	149,89
WZ CAT- 1/64	67,05	286,26	210,99	181,06
WZ CAT- 1/64 H202	57,78	309,67	224,05	201,69
WZ CAT- 1/256	59,35	273,63	211,75	177,83
WZ CAT- 1/256 H202	49,31	245,48	197,28	164

Tabelle 4.3-A: Vergleich WZ mit unterschiedlichen CAT+ oder CAT- Konzentrationen mit und ohne Wasserstoffperoxidvorbehandlung. (gemessen im FL1)

Wie aus der Tabelle 4.3-A hervorgeht, nimmt der oxidative Stress mit sinkender Erykonzentration zu. Während bei aktiver Katalase bis zu einer Reduktion der Erythrozyten auf 1/64 die Prozentsätze mit und ohne Wasserstoffperoxid fast ident sind und erst bei weiterer Verdünnung der oxidative Stress bei zusätzlichem Wasserstoffperoxid auf 58% steigt, steigt bei inhibierter Katalase der oxidative Stress schon bei normaler Erythrozytenzahl stark an (von 5.26 auf 12.76 %) und flacht dann stark ab. Bei einer Verdünnung auf 1/256 schließlich sind die Werte für CAT+/- bei Zugabe von H202 fast ident. Offensichtlich stößt das Enzymsystem bei diesem Stresspegel an seine Grenzen, sodass eine weitere Zunahme auch durch eine funktionierende Katalase nicht mehr effektiv abgepuffert werden kann. Bei inaktiver Katalase geht danach der Prozentsatz an aktivierten Granulozyten sogar schon zurück. Möglicherweise beginnt hier schon der Weg in die Apoptose.

		%	Mw	geom Mw	median
WZ Ery	FL4-H (Log)	22,2	2381,07	1697,99	1980,96
WZ Ery H202	FL4-H (Log)	18,74	1968,64	1364,79	1553,84
WZ E1/256	FL4-H (Log)	13,5	2244,24	1485,81	1610,76
WZ E1/256 H202	FL4-H (Log)	20,35	1989,09	1524,52	1794,35
WZ CAT-	FL4-H (Log)	27,38	1829,68	1308,31	1433,01
WZ CAT- H202	FL4-H (Log)	19,6	1648,76	1125,59	1186,37
WZ CAT- 1/64	FL4-H (Log)	38,26	2651,51	1966,7	2246,79
WZ CAT- 1/64 H202	FL4-H (Log)	43,89	2428,71	1821,79	2090,8
WZ CAT- 1/256	FL4-H (Log)	26,94	2182,03	1677,91	1963,22
WZ CAT- 1/256 H202	FL4-H (Log)	19,73	2068,71	1593,05	1843,42

Tabelle 4.3-B Vergleich WZ mit unterschiedlichen CAT+ oder CAT- Konzentrationen mit und ohne Wasserstoffperoxidvorbehandlung. (gemessen im FL4)

Wie aus der Tabelle 4.3-B ersichtlich, kann die Katalase bei normaler Erythrozytenzahl den oxidativen Stress noch sehr gut abfangen, sodass auch die zugesetzten Wasserstoffperoxidationen die Phagozytoseaktivität nur geringfügig hemmen. Bei größter Verdünnung zeigt sich jedoch in großer Unterschied +/- Wasserstoffperoxid.

Aus den gemachten Beobachtungen lässt sich schließen, dass Wasserstoffperoxidationen zwar einerseits schwere Schäden anrichten können und auch für die Wirtszellen potentiell gefährlich sind, dass sie jedoch andererseits daneben als second messenger fungieren und als solche durchaus auch aktivierende Wirkung auf die Phagozytose haben können. In der Tat haben neuere Studien gezeigt, dass Wasserstoffperoxid durch Ca^{2+} Mobilisierung zu einer Erhöhung der Phagozytoseaktivität führt (Bejarano, Terron et al. 2007).

Auch in der Biolumineszenz unterscheiden sich Proben aus WBC und CAT +/- Erythrozyten nicht signifikant.

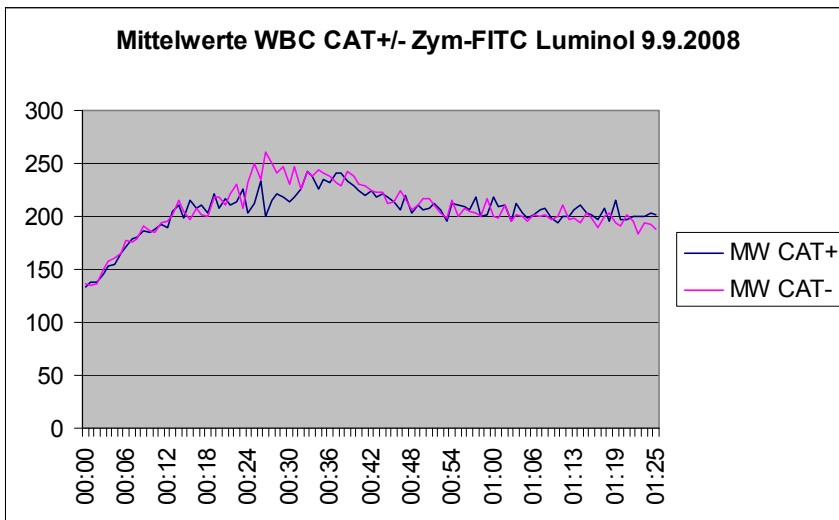


Abbildung 4.2.2-F: Mittelwerte WBC CAT+ / CAT- Zym-F Luminol (Luminometer Victor 3)

Bei normaler, standardisierter Erythrozytenzahl findet man keinen Unterschied zwischen aktiver und inaktiver Katalase der Erythrozyten. Der Verlauf und die Stärke des oxidativen Bursts ändern sich nicht.

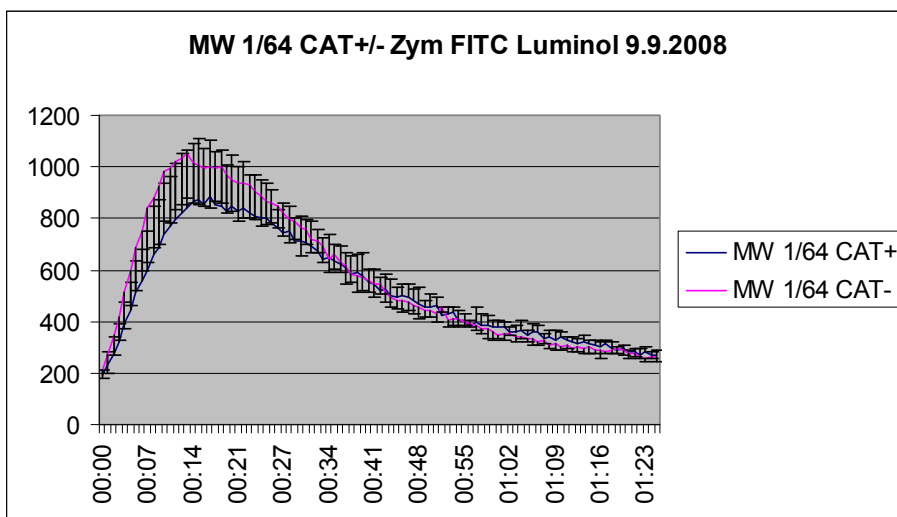


Abbildung 4.2.2-G: Oxidativer Burst WBC 1/64 CAT+/CAT- Zym-F Luminol

Bei Verwendung von Luminol als Marker sieht man einen deutlichen, wenn auch nicht signifikanten Unterschied zwischen CAT+ und CAT- wenn die Erythrozytenzahl auf ein Vierundsechzigstel reduziert wird. (Abb, 3.2.3f).

Es hat sich ferner gezeigt, dass die zur Messung des Oxidativen Bursts verwendeten Marker Luminol und Lucigenin sich bezüglich des oxidativen Bursts nicht gleich verhalten.

Wie untenstehendes Beispiel zeigt, sind die beiden Messmethoden nicht gleich sensitiv auf die Unterschiede zwischen CAT+ und CAT- Proben ist. Während mit Lucigenin kein Unterschied zwischen aktivem und inaktivem Enzym beobachtbar ist, zeigt sich bei Messung mit Luminol ein deutlich stärkeres Signal bei Inhibition der Katalase, was auf Grund der Funktion dieses Enzyms verständlich erscheint. Möglicherweise benutzen Luminol und Lucigenin nicht dieselben ROS als Substrate bzw. sind unterschiedlich stark anregbar..

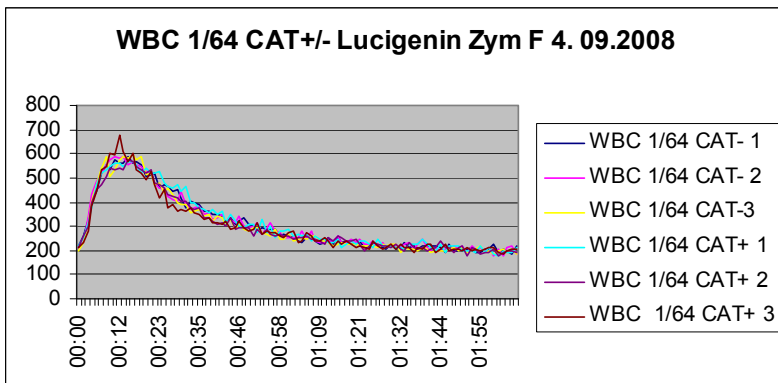


Abbildung 4.2.2-H: WBC 1/64 CAT+/- Zym-F gemessen mit Lucigenin

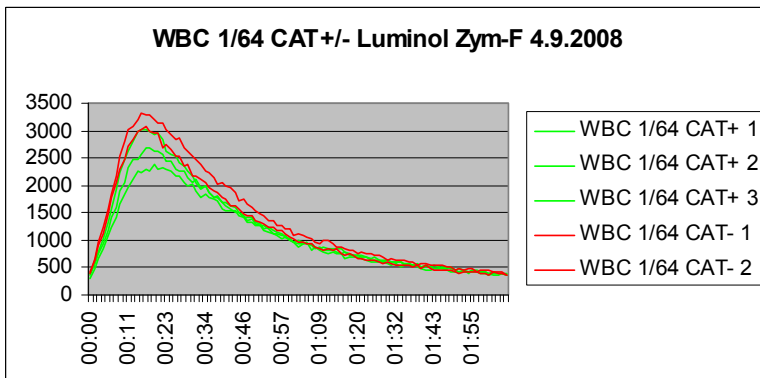


Abbildung 4.2.2-I WBC 1/64 CAT+/- Zym-F gemessen mit Luminol

Vergleich der Lumineszenzmessungen mit Luminol und Lucigenin als Indikatoren für den oxidativen Burst. Wie in Abb. 4.2.2-H und I eindeutig zu sehen ist, unterscheiden sich die Signale sowohl in ihrer Intensität als auch in ihrer Sensivität für ROS. Während bei Verwendung von Luminol eindeutig ein Unterschied zwischen aktiver (grün) und inaktiver Katalase sichtbar wird, unterscheiden sich die Werte bei Verwendung von Lucigenin kaum.

Dieser Unterschied kann entweder eine unterschiedliche Sensivität der Nachweissysteme hindeuten. Oder aber Luminol und Lucigenin benutzen unterschiedliche Radikale als Substrat. Das würde auch die zum Teil entgegengesetzten Ergebnisse bei Verwendung von Lucigenin und Luminol erklären.

4.4 Stimulierbarkeit der Granulozyten durch PMA, fMLP

Um die Aktivierbarkeit der Granulozyten durch andere Stimuli abzutesten, wurden Proben (VB bzw. WBC mit DHR) mit 5 μ M fMLP (aus 50x Stocklösung) oder 3 μ M PMA (50x Stock) stimuliert.

Verglichen mit Zymosan gab es hier jedoch kaum zusätzliche Aktivierbarkeit, weder im oxidativen Burst gemessen über Zugabe von DHR, noch in der Phagozytose von NOZ-F.

Phorbol myristate Acetat (PMA) zeigte unter diesen Bedingungen keinerlei Stimulation der neutrophilen Granulozyten, weder im VB noch bei Verwendung von WBC. Die fehlende Stimulation durch PMA dürfte mit einer Überdosierung zusammenhängen. Eine Dissertation an der Tierärztlichen Hochschule Hannover (Sandra Eickhoff, 2002) an Hundegranulozyten hat ergeben, dass die Wirkung von PMA dosisabhängig ist. Laut dieser Dissertation wirkt PMA in einer Konzentration von 2nM stimulierend auf die Aktivität der neutrophilen Granulozyten aus Hundeblood. Bei Erhöhung der Dosis kommt es jedoch zu einer Hemmung der Zellen.

Was die Stimulation mit fMLP betrifft, variierten die Ergebnisse zwischen den Versuchen ebenso wie die Aktivierbarkeit durch Zymosan, was auf die unterschiedliche Zusammensetzung der einzelnen Blutspenden hindeutet und auf große Spenderspezifitäten hindeutet. Allgemein konnten wir nur eine geringe Aktivierung der Neutrophilen bei Stimulation mit fMLP, verglichen mit jener mit Zymosan, feststellen.

Auch die Zugabe von Zymosan und fMLP brachte nur eine geringe Steigerung gegenüber der Stimulation mit Zymosan alleine. Daher wurde beschlossen, zur Stimulation standardisierte Mengen an Zymosan zu verwenden (0,5xZymosan, berechnet laut Excelfile auf die Granulozytenzahl der Blutspende vom 5. 3. 2008, 25 μ g Zymosan pro 2306 Neutrophile Granulozyten/ μ l).

4.5 Verlauf der Aktivierung durch Zymosan:

Variationen der Zeit (15, 30 und 60 min) haben gezeigt, dass bereits nach 15 bis 30 Minuten das Maximum erreicht ist.

4.6 Reaktionen der Granulozyten auf Ca-induzierte Vesikel

In Blutkonserven bilden sich spontan aus den Erythrozyten Vesikel, wodurch die Blutproben nur begrenzt haltbar sind. Wir haben für unsere Experimente durch Ca induzierte Vesikel verwendet um zu testen, welche Auswirkung diese auf die Aktivität der Granulozyten haben.

4.6.1 Einfluss des Plasmas auf die Vesikelaufnahme.

Um die Rolle des Plasmas bei dem Response auf heterologe Vesikel nachzugehen, wurden WBC Proben (Zellzahl der Weißen Blutkörperchen wie im VB) in Plasma bzw. PBS Puffer in einem Phagozytoseassay untersucht.

In einem Phagozytoseassay wurden die Zellen mit Vesikeln und/oder 0,5 Zym AF stimuliert (30 min bei 37° Inkubation, Lyse). Hier zeigt sich, dass in beiden Fällen Vesikel alleine ausreichen, um aufgenommen zu werden. Wird jedoch zusätzlich Zymosan zugegeben, so kommt es nochmals zu einer gesteigerten Aufnahme der Vesikel durch die neutrophilen Granulozyten.

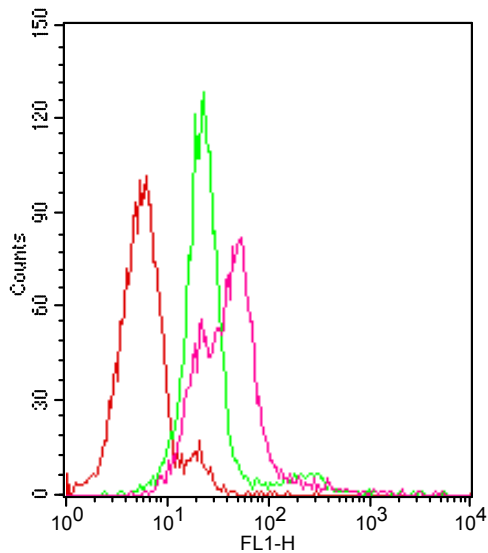


Abbildung 4.6.1-A : Vergleich WBC (Nullkontrolle, rot), WBC V (grün) WBC V 0.5 Zym (violett) in Puffer

Auch die Stimulation mit heterologen Vesikeln alleine reicht aus, um WBC zur Phagozytose zu stimulieren. Wie in Abbildung 4.6.1-B zu sehen, kommt es durch Zugabe von 0.5 Zym nochmals zu einer Zunahme der Vesikelaufnahme

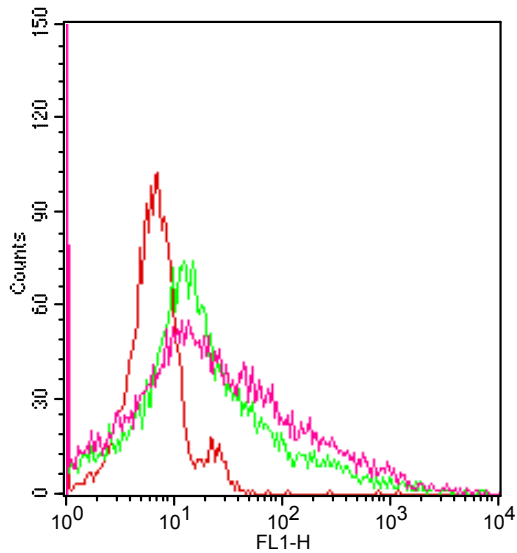


Abbildung 4.6.1-C: Vergleich WBC (Nullkontrolle, rot), WBC V (grün) WBC V 0.5 Zym (violett) in Plasma

Ist Plasma vorhanden (Abbildung 4.6.1-D) so verbreitern sich die Peaks durch die allgemein höhere Aktivierung durch Opsonierung durch das Komplementsystem bzw. die im Plasma vorhandenen Cytokine und Antikörper. Durch diese gesteigerte Aktivierung wird jedoch auch der Unterschied zwischen der Zugabe von Vesikeln und der Zugabe von Vesikeln und Zymosan im FI1 (Aufnahme von FITC markierten Vesikeln) geringer.

Die Wiederholung des Versuchs mit gereinigten Granulozyten zeigte nur einen geringen Response auf Vesikel bzw. nur eine geringe Zunahme der Vesikelaufnahme bei Doppelstimulation mit Vesikeln und Zymosan. Möglicherweise handelt es sich hierbei jedoch um ein Charakteristikum dieser speziellen Blutprobe (0 pos). Wie das Blutbild zeigte hatte dieser Spender nur eine relativ geringe Leukozytenzahl (3,13 G/l, Durchschnitt aller Blutspender 4,1 G/L). Es sei an dieser Stellen darauf hingewiesen, dass auch nach Standardisierung der Zellzahlen, es bei den unterschiedlichen Blutspendern zu zum Teil erheblichen Unterschieden in der Aktivierbarkeit gekommen ist. Es ist daher nicht auszuschließen, dass auch ohne Plasma die neutrophilen Granulozyten unterschiedlich voraktiviert waren.

4.6.2 Vesikel und Zymosan

Unsere Versuche haben gezeigt, dass sowohl die Aufnahme von Zymosan durch die Anwesenheit von heterologen Vesikeln als auch umgekehrt die Aufnahme von heterologen Vesikeln durch Zymosan gesteigert wird. Zwar zeigt auch die Zugabe von Zym-AF (Fluoreszenz im FL4) einen geringen Shift nach rechts im FL1, dieser unspezifische Anteil ist jedoch zu gering um die Zunahme im FL1 Signal zwischen WBC mit Vesikeln und WBC mit Zymosan und Vesikeln zu erklären. Andererseits strahlen die Vesikel nicht im FL4, wodurch diese Zunahme jedenfalls echt ist

In einem anderen Experiment mit neutrophilen Granulozyten haben wir nachgewiesen, dass heterologe Vesikel sowohl Phagozytose als auch Oxidativen Burst auslösen.

Hierzu wurden Neutrophile Granulozyten mit 5 µl Vesikelsuspension in 100 µl Pu+ 20 Minuten bei 37° inkubiert, kurz pelletiert und nach einer Waschung in PBS in der entsprechenden Menge PBS resuspendiert. Ferner haben wir auch Zymosan mit Vesikel präinkubiert (Zymosan mit Vesikeln wurden zuerst 20 Minuten 37° in PBS vorinkubiert, pelletiert und nach einer Waschung in PBS wie üblich 30 min in Plasma inkubiert.)

Wie aus den Histogrammen ersichtlich, erfolgt sowohl bei der Präinkubation mit Vesikeln als auch bei Zugabe der Vesikel zugleich mit Zymosan beim Phagozytoseassay eine deutliche Steigerung in der Phagozytose (FL4) und im Oxidativen Burst (über DHR gemessen, FL1). Diese Zunahme ist jedoch nicht durch die Präinkubation selbst verursacht, da die ohne Vesikel präinkubierten Neutrophile Granulozyten deutlich weniger Aktivität zeigen. Wir sehen also, dass die Aktivierung der Neutrophile Granulozyten durch Präinkubation mit Vesikeln ausreicht, um deutlich mehr Zym-AF 633 aufnehmen zu können

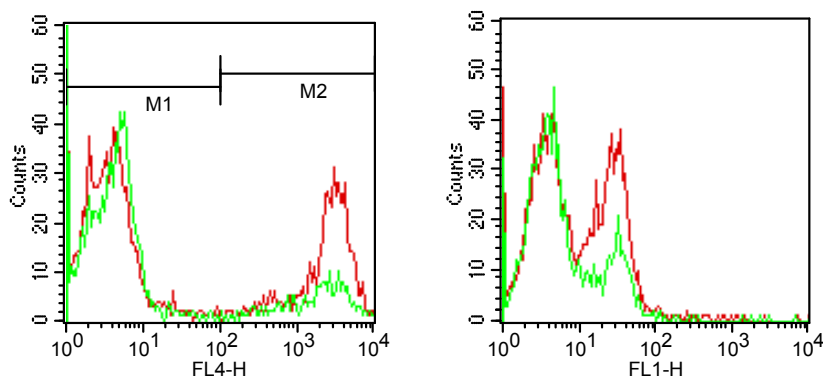


Abbildung 4.6.2-A: Vergleich der Phagozytose (FL4) und oxidativen Burst (FL1): Neutrophile Granulozyten 20 min vorinkubiert mit (rot) bzw. ohne Vesikel (grün)

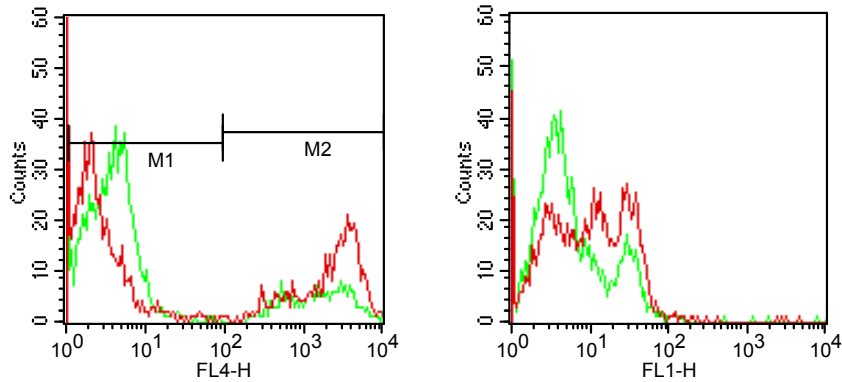


Abbildung 4.6.2-B: Nicht vorinkubierte Neutrophile Granulozyten mit (rot) und ohne Vesikel (grün)

Eine Präinkubation von Zymosan mit Vesikeln (20 min 37° in DPBS) zeigte jedoch keinen Unterschied in Phagozytose/ Burst verglichen mit der Kontrolle. Daraus lässt sich folgern, dass es nicht zur Bildung von stabilen Zymosan/Vesikelkomplexen kommt. Die wechselseitige Steigerung in der Aufnahme von Zymosan könnte theoretisch ja auch darauf zurückzuführen sein, dass Zymosan und Vesikel gemeinsam als Komplex aufgenommen werden.

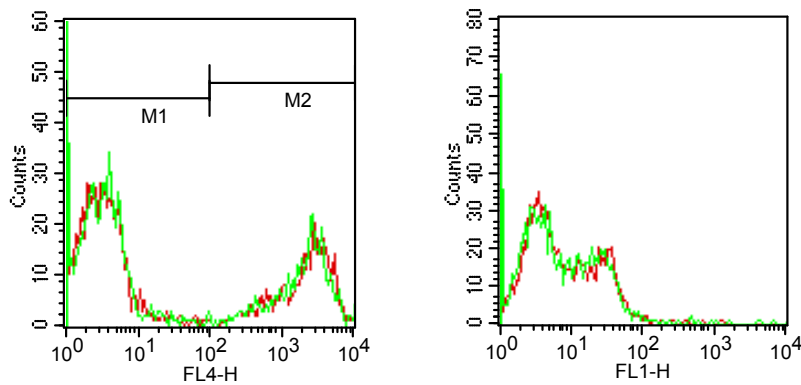


Abbildung 4.6.2-C: Zym 20 min bei 37 °C vorinkubiert mit (rot) und ohne Vesikel

Ferner zeigte sich auch in der Lumineszenzmessung mit Luminol, die enorme Steigerung im Oxidativen Burst durch Zugabe von 5 µl Vesikel, nicht jedoch bei Präinkubation von Neutrophilen mit 5µl Vesikellösung.

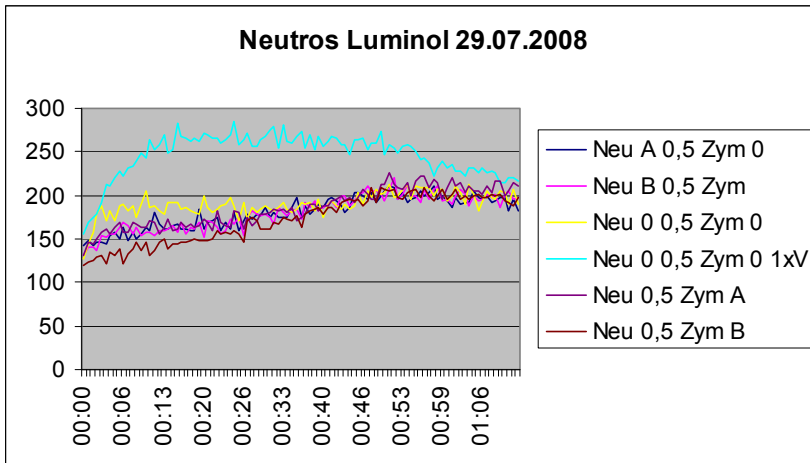


Abbildung 4.6.2-D: NeuA (Vorinkubation der Neutrophilen in DPBS mit Vesikel), NeuB (Vorinkubation d. Neutrophile Granulozyten in DPBS ohne Vesikel), Neu0 (keine Vorinkubation), Zym A (Zymosan vorinkubiert mit Vesikeln), ZymB (Zymosan vorinkubiert ohne Vesikel), Zym 0 (keine Vorinkubation)

Auch ändert sich der Response wenn man Zymosan und Vesikel gemeinsam als Mix zugibt. In WBC Proben sieht man, dass bei Zugabe als Mix (Zymosan wie üblich mit Plasma opsoniert und anschließend mit der entsprechenden Menge Vesikel gemischt) sowohl das FL1 Signal als auch FL4 Signal gegenüber Einzelzugabe wesentlich stärker wird. Während bei getrennter Zugabe der gesamte Peak nach rechts shiftet, entsteht bei Zugabe als Mix daneben noch eine 2. Population, die noch stärker im FL1 fluoresziert.

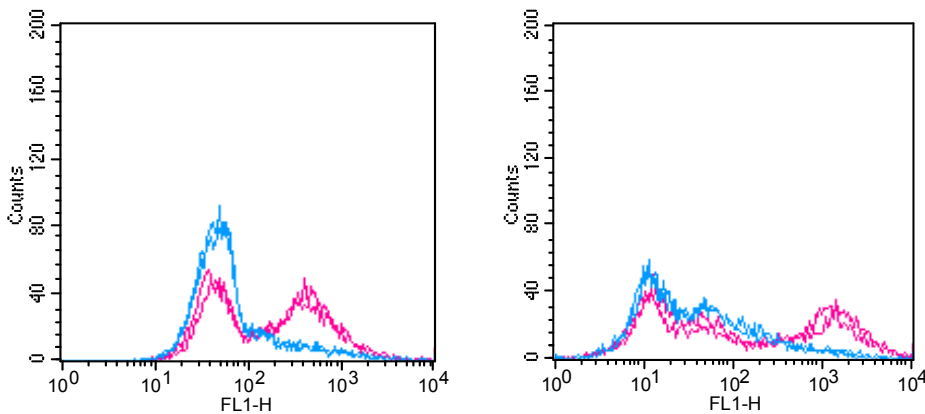


Abbildung 4.6.2-E: Vergleich der Zugabe von Zymosan und Vesikeln als Mix (violett) oder einzeln (blau). Links Zugabe zu WBC, rechts Zugabe zu Vollblut

Die Änderung der Vesikelaufnahme (Abb 4.6.2-E) bei Zugabe als Mix könnte eine Folge der Opsonierung des Zymosans in Plasma sein. Wird das mit Plasma opsonierte Zymosan mit

Comment [IB1]: Welche Abbindeungsnummer? Gib an ob Zymosan oder Vesikel FITC markiert sind!

Vesikeln gemischt, können Komplementfaktoren auf die Vesikel übertragen, und diese dadurch verstärkt von den Neutrophilen aufgenommen werden.

Für diese Hypothese spricht, dass der linke der beiden Peaks in etwa an der gleichen Stelle ist, wie bei getrennter Zugabe. Hierbei könnte es sich um die Aufnahme von nicht opsonierten Vesikeln handeln. Der zweite Peak wäre demnach durch die verstärkte Aufnahme der opsonierten Vesikel bedingt. Dafür spricht auch die Situation bei Verwendung von Vollblut. Hier finden wir auch bei getrennter Zugabe die Andeutung eines zweiten Peaks. Im Mix ist auch im Vollblut der linke Peak nahezu ident mit jenem bei getrennter Zugabe. Dazu finden wir auch hier eine Population, die wesentlich stärker Vesikel aufgenommen hat. Nach unserer Hypothese sind das diejenigen Vesikel, die mit Komplementfaktoren, die durch eine Übertragung vom opsonierten Zymosan die Phagozytose begünstigen. Die höhere Aktivierung im Vollblut kann mit dem Vorhandensein von Plasma im Probensatz erklärt werden.

Wie in Abb 4.6.2-E zu sehen, kommt es bei Zugabe von Zymosan und Vesikel als Mix zu einer wesentlich stärkeren Fluoreszenz im FL1. Wobei der erste Peak dem bei getrennter Zugabe entspricht. Daneben entsteht bei Zugabe als Mix jedoch noch eine zweite Population. Derselbe Versuch mit Vollblut zeigt im Wesentlichen dasselbe Bild. Auch hier entstehen bei Zugabe 2 Peaks, während bei getrennter Zugabe die gesamte Population etwa gleich im FL1 shiftet. Allerdings führt hier auch die Zugabe von Zymosan zu einem Rechtshift. In beiden Fällen wird auch deutlich mehr FL4 bei Zugabe als Mix aufgenommen.

4.6.3 Reaktion auf Vesikel und Erythrozyten

Für diese Versuche wurden FITC markierte heterologe Vesikel und Erythrozyten verwendet. Von beiden wurde mittels der AChE Aktivität bestimmt (U-2000 Hitachi, Tokyo) um gleiche Oberflächen einsetzen zu können.

Wie im Histogramm 4.6.3-A ersichtlich lösen sowohl heterologe Vesikel (A pos) als auch Erythrozyten (A pos) in den neutrophilen Granulozyten (0 pos) eine deutliche Phagozytosereaktion aus. Offenbar erkennen die WBC auch ohne Plasma die Blutgruppenantigene auf den heterologen Vesikeln und Erythrozyten.

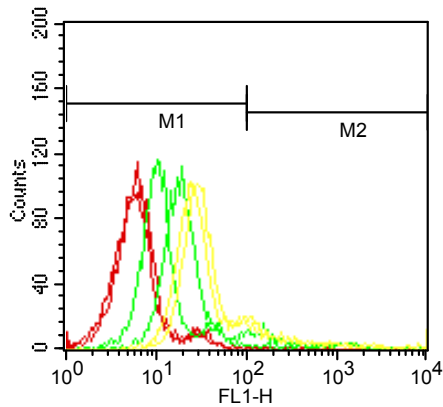


Abbildung 4.6.3-A: Stimulation von WBC (O pos, rot) mit FITC markierten heterologen Vesikeln (gelb) und Erythrozyten (grün) in DPBS.

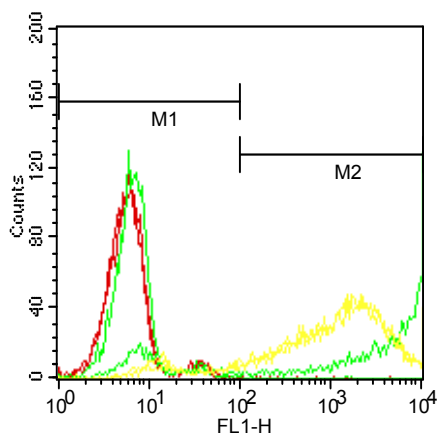


Abbildung 4.6.3-B: Stimulation von VB (O pos) mit FITC- markierten Erythrozyten (grün, A pos) und Vesikeln (gelb, A pos)

Wie groß hierbei der Einfluss des Plasmas auf die Aktivierung ist, sieht man, wenn man die Reaktion von WBC und Vollblut miteinander vergleicht. Auch ohne Plasma und Erythrozyten können WBC fremde Vesikel und Erythrozyten erkennen und phagozytieren. Unter dem Einfluss von Plasma kommt es jedoch zu einer gewaltigen Steigerung in der Aufnahme. Dies liegt sicherlich zum einen an den im Plasma vorhandenen Antikörpern (der Blutspender hat die Blutgruppe O pos und bildet daher sowohl Antikörper gegen A als auch B), zum anderen aber auch am Komplementsystem. Nach einer Hypothese (Forslid, Hallden et al. 1991) sind Erythrozyten ebenso in der Lage, die Phagozytose zu steigern. Erythrozyten binden über ihren CR1 Rezeptor das Antigen. Durch die Bindung des Komplexes an Neutrophile

Granulozyten wird der oxidative Stress, der durch den oxidativen Burst entsteht durch die in der Erythrozytenmembran enthaltenen Enzyme bzw. (worauf unsere Daten hindeuten) auch bereits durch die Anwesenheit von Erythrozyten sehr stark abgepuffert.

Betrachtet man die Phagozytoseaktivität von gereinigten neutrophilen Granulozyten in Puffer so zeigt sich auch hier nur auf heterologe Vesikel in DPBS ein großer Shift in der Phagozytose. Offenbar können die neutrophilen Granulozyten unter diesen Bedingungen auch alleine die heterologen Vesikel als fremd erkennen, die heterologen Erythrozyten jedoch nicht. Dies kann einerseits an unterschiedlichen Oberflächenstrukturen liegen. Wie man heute weiss, segregieren die einzelnen Membranproteine nicht gleichmäßig bei der Vesikelbildung. Möglicherweise liegt es aber an der Größe der Erythrozyten, die eine Phagozytose durch annähernd gleich große Zellen erschwert

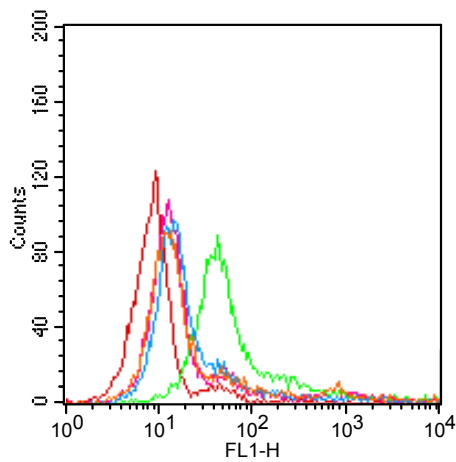


Abbildung 4.6.3-C: Stimulation von gereinigten Neutrophilen (rot) mit heterologen Vesikeln (grün), heterologen Vesikeln (violett) sowie autologen Vesikeln (blau) und Erythrozyten in DPBS

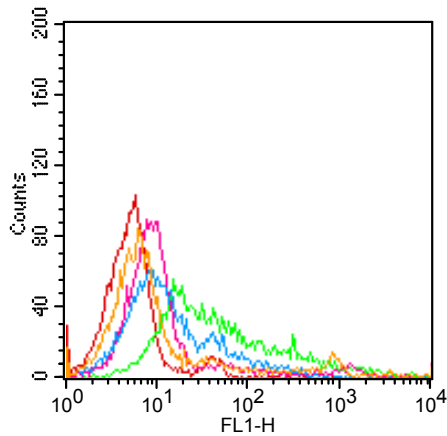


Abbildung 4.6.3-D: Stimulation von gereinigten Neutrophilen (rot) mit heterologen Vesikeln (grün), heterologen Vesikeln (violett) sowie autologen Vesikeln (blau) und Erythrozyten in Plasma.

Sowohl heterologe Erythrozyten als auch autologe Vesikel bzw. Erythrozyten führen nur zu einer geringen Phagozytoseaktivität. Ist zusätzliche Hilfe durch Plasma vorhanden, steigt allgemein die Aktivierung. Auch hier zeigt sich eindeutig der meiste Response auf heterologe Vesikel. Es scheint unter diesen Bedingungen so zu sein, dass Vesikel einen größeren Einfluss auf die Phagozytose haben als Erythrozyten. So werden heterologe Vesikel stärker phagozytiert als heterologe Erythrozyten und autologe Vesikel stärker als autologe Erythrozyten. Auch der Einfluss des Plasmas ist bei Vesikeln wesentlich stärker zu sehen.

Bei zusätzlicher Anwesenheit von Erythrozyten (WZ) ändert sich an der Reihenfolge nicht allzu viel. Auch hier lösen vor allem heterologe Vesikel eine starke Reaktion der Neutrophilen Granulozyten aus. Im Vollblut lösen Erythrozyten ebenso wie autologe Vesikel nahezu keine Phagozytose aus.

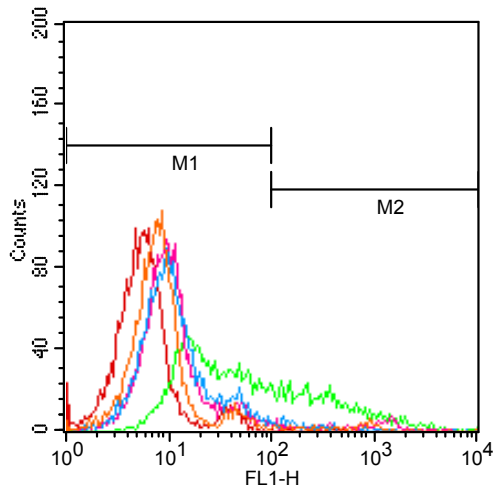


Abbildung 4.6.3-E: Stimulation von WZ in Plasma mit heterologen Vesikeln (grün) und Erythrozyten (violett) bzw. autologen Vesikeln (blau) und Erythrozyten (orange)

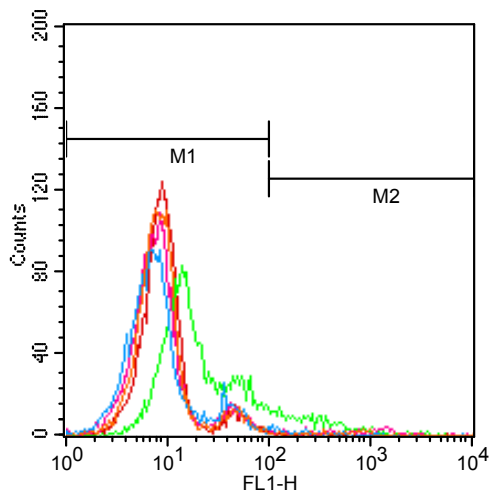


Abbildung 4.6.3-F: Stimulation von WZ mit heterologen Vesikeln (grün) und Erythrozyten (violett) bzw. autologen Vesikeln (blau) und Erythrozyten (orange) in DPBS

Wir können daraus schließen, dass bei gleicher zugegebener Oberflächenmenge Vesikel besser phagozytiert werden als Erythrozyten des gleichen Spenders. Erythrozyten können wahrscheinlich schon alleine wegen Ihrer Größe nicht so einfach phagozytiert werden. Die im obigen Experiment beobachtete Steigerung von WBC zu VB ist alleine auf die Anwesenheit von Plasma und den darin enthaltenen Komplementfaktoren zurückzuführen. Bestätigt wird das dadurch, dass sich die Histogramme der Neutrophilen mit und ohne Erythrozyten in Plasma kaum unterscheiden. Im Gegenteil ist gerade der Verlauf bei Stimulation mit heterologen Vesikeln fast deckungsgleich.

VB und WZ lassen sich in diesem Fall jedoch nur bedingt miteinander vergleichen, da die Zellzahlen der anderen Proben standardisiert sind (Mittelwert laut Blutspenderliste). Was man jedoch auch hier beobachten kann, ist dass eigentlich nur heterologe Vesikel eine Reaktion auslösen.

4.6.4 Einfluss der Blutgruppe von Plasma und Vesikel

Für diesen Versuch verwendeten wir WBC eines Spenders mit Blutgruppe 0 pos und testeten mit verschiedenen heterologen bzw. orthologen Vesikeln und den Einfluss der Blutgruppe von Plasma und Vesikeln auf Phagozytose und oxidativen Burst.

Bei Verwendung des Plasmas des Zellspenders (autolog, 0 pos Abb links) zeigte sich die Stärkste Phagozytose bei Vesikeln der Blutgruppe AB neg (blau), gefolgt von A pos (grün) und B pos (gelb). Aber auch Vesikel der eigenen Blutgruppe 0 pos (türkis und orange) lösen eine, wenn auch wesentlich geringere Aktivierung der neutrophilen Granulozyten aus.

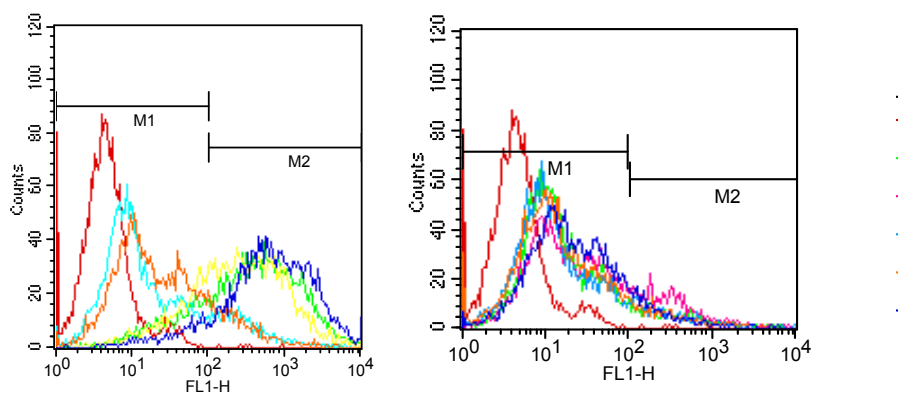


Abbildung 4.6.4-A: Stimulation von WBC (0 pos) mit diversen heterologen, Vesikeln: Nullkontrolle (reine WBC, rot), orthologe Vesikel (türkis und orange, O pos), B pos (gelb), A pos (grün) und AB neg (blau). Linkes Bild: autologes Plasma (Plasma des Neutrosponders, 0 pos); Rechtes Bild (heterologes Plasma (Plasma des jeweiligen Vesikelsponders)).

Wird jedoch heterologes Plasma, d. h. das Plasma der Vesikelspender, (Blutgruppe der Vesikel) eingesetzt, zeigen sich wesentlich geringere Unterschiede zwischen den verschiedenen Blutgruppen, was die enorme Wichtigkeit des Blutplasmas auf die Phagozytoseaktivität verdeutlicht. Das hier auch die heterologen Vesikel einen etwa so starken Response zeigen wie die orthologen Vesikel lässt den Schluss zu, dass Neutrophile Granulozyten auch ohne Hilfe durch die im Plasma enthaltenen Antikörper Vesikel erkennen und phagozytieren.

Betrachtet man dazu parallel den durch die Vesikel verursachten oxidativen Burst, so finden wir den stärksten oxidativen Stress bei Vesikeln der Blutgruppe A pos gefolgt von B pos. Überraschenderweise zeigen hier die WBC nur einen geringen Response auf die Vesikel der Blutgruppe AB neg. Diese befinden sich sowohl bei Anwesenheit von heterologem als bei autologem Plasma im Bereich der beiden orthologen Proben. Verwendet man heterologes Plasma der Blutgruppe AB neg ist der mit Luminol detektierbare oxidative Stress nahe dem der Nullkontrolle (WBC ohne Vesikel). Erst durch die Hilfe der Antikörper im autologen Plasma zeigt sich ein deutlicher Unterschied zur Kontrolle. Offensichtlich sind die Aktivierungsmechanismen der angeborenen Immunantwort durch neutrophile Granulozyten zumindest teilweise von einander unabhängig und somit getrennt von einander modulierbar.

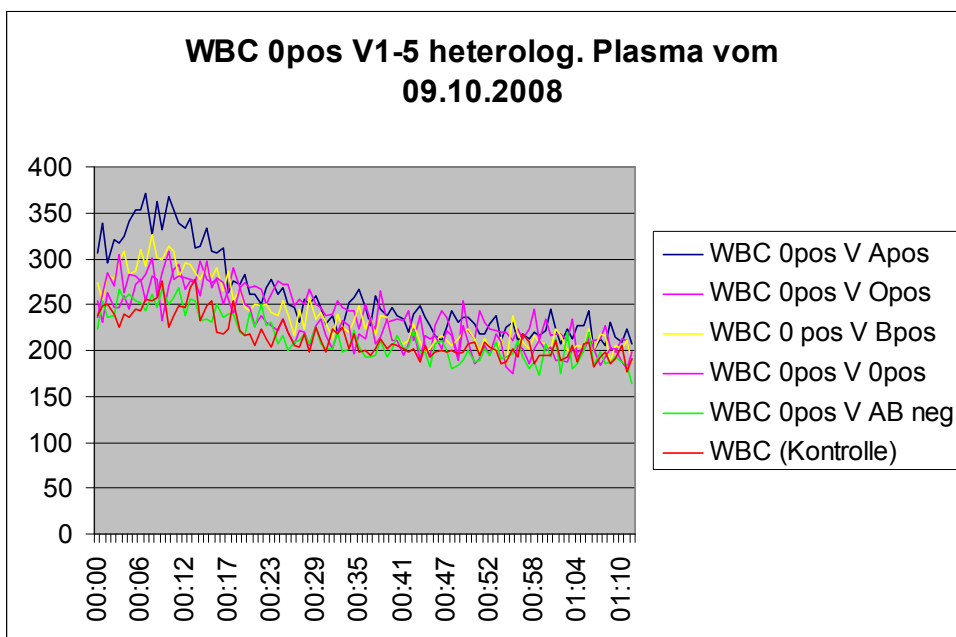


Abbildung 4.6.4-B: Lumineszenzmessung mit Luminol der Proben aus Abb 4.6.4 A) unter Verwendung von heterologem Plasma

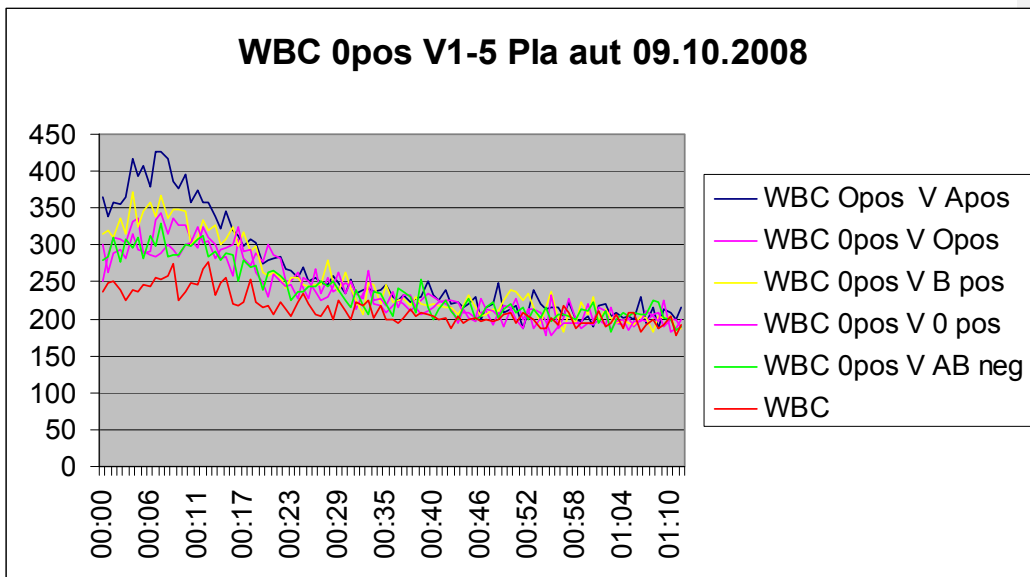


Abbildung 4.6.4-C: Lumineszenzmessung von WBC (opos) stimuliert mit diversen Vesikeln (hetero- bzw. ortholog) mit autologem Plasma (0 pos, Plasma des Neutrophilenspenders)

)

4.7 Einfluss von Begasung mit N_2 , O_2 , Druckluft

Um zu testen welchen Einfluss Sauerstoff bzw. Stickstoff auf die Funktion der neutrophilen Granulozyten haben, wurden Proben mit Sauerstoffgas bzw. Stickstoffgas (direkt aus Gasflaschen) bzw. Druckluft begast.

In diesem Versuch wurden WBC Proben in einem 1.5 ml Eppendorf Tube 1 Minute begast und nach Stimulation und einer weiteren Begasung von 30 Sekunden bei 37° 30 Minuten unter Schütteln inkubiert. Die Messung der Fluoreszenz im FACSCalibur ergab einen deutlichen Unterschied zwischen den einzelnen Begasungsformen

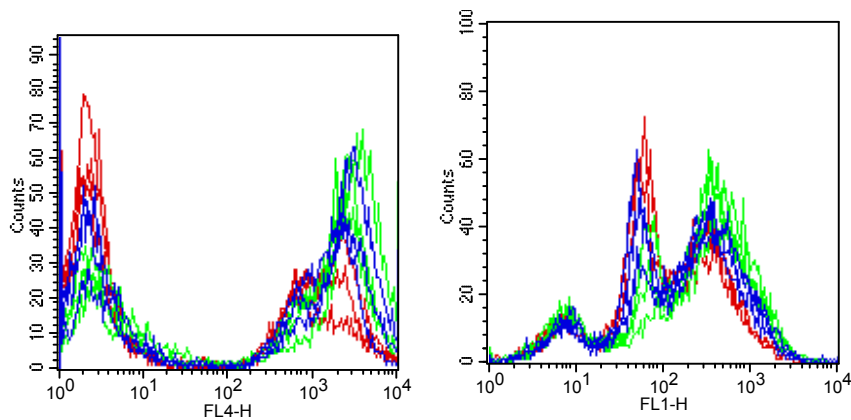


Abbildung 4.6.47 – A: Nullkontrolle (reine WBC, rot), orthologe Vesikel (türkis und orange, O pos), B pos (gelb), A pos (grün) und AB neg (blau).

Wie in den Histogrammen deutlich zu sehen scheint in diesem Falle die Begasung durch Sauerstoff als auch die Begasung mit Druckluft die Zellen sowohl in ihrer Fähigkeit zu oxidativen Burst (Abb. 4.6.4-A rechts.) als auch zur Phagozytose (Abb. 4.6.4-A links) im Vergleich zu Stickstoff besser zu stimulieren. Es sei an dieser Stelle jedoch erwähnt, dass nachfolgende Experimente mit Druckluft und Stickstoff eher darauf hindeuten, dass Stickstoff vor allem bei Anwesenheit von Erythrozyten zu einer Zunahme an Phagozytose und Oxidativen Burst führt. Allgemein ist zu sehen, dass sich Sauerstoff (grün) deutlich von Stickstoff (rot) abhebt. Die mit Druckluft (blau) begasten Proben verhalten sich in etwa wie jene mit Sauerstoff.

			% aktive	Mittelwert	Geom. Mittel	Median
WBC E 1/16 N2	FL1	MW	48,12	380,20	301,57	291,74
		Stdev	3,94	18,39	10,25	11,13
WBC E 1/16 O2	FL1	MW	71,59	544,89	418,11	406,20
		Stdev	6,60	44,72	27,78	27,15
WBC E 1/16 D	FL1	MW	61,79	478,98	364,52	346,28
		Stdev	7,46	26,21	17,08	17,22

Tabelle 4.7-A: Messung des Oxidativen Bursts bei Begasung von WBC 1/16 Ery mit Sauerstoff, Stickstoff und Druckluft. Messung über DHR im Durchflusszytometer (FACSCalibur)

Im FL1 (oxidativer Stress) scheint eine Begasung mit Sauerstoff zu einer massiven Zunahme in der Aktivierung zu führen. Dies spiegelt sich auch in den Lagemaßen Mittelwert, Geometrisches Mittel und Median wiederzuspiegeln. Es kommt sowohl zu einer Steigerung im Prozentsatz der Aktivität von 48% auf 71 % sowie einer Verschiebung des Mittelwertes von 380 auf 544 (geometrisches Mittel respektive von 301,57 auf 418,11, Median von 291,74 auf 406,20). Auf Grund der geringen Standardabweichungen sind diese Verschiebungen durchaus als signifikant zu betrachten.

			% aktive	Mittelwert	Geom. Mittel	Median
WBC E 1/16 N ₂	FL4	MW	42,78	1594,77	1145,15	1169,86
		Stdev	12,02	111,36	120,70	228,00
WBC E 1/16 O ₂	FL4	EW	58,45	1598,52	1265,28	1394,86
		STdev				
WBC E 1/16 D	FL4	MW	62,20	2232,17	1728,55	1941,98
		Stdev	7,55	617,31	486,93	554,13

Tabelle 4.7-B: Messung der Phagozytose von WBC 1/16 Erythrozyten (Experiment von Tabelle 4.7-A)

Auch bei Betrachtung der Daten bezüglich der Phagozytose N₂, O₂ und D (Tab. 4.7-B)) kommt es zu signifikanten Zunahmen in der Phagozytose bei Begasung mit Sauerstoff bzw. Druckluft verglichen mit jener mit N₂. Entgegen den Ergebnissen andere Experimente scheint die Begasung mit Sauerstoff oder Druckluft in diesem Falle stimulierend auf Burst und Phagozytose. Ebenso wie beim oxidativen Burst shiften auch hier die Lagemaße Mittel, geometrisches Mittel und Median nach rechts.

Unsere Experimente haben gezeigt, dass sowohl eine Begasung mit N₂ als auch O₂ bzw. Druckluft zu einer erhöhten Aktivität der neutrophilen Granulozyten im Vergleich mit mit unbegasteten Proben führt. Dies könnte jedoch allein darauf zurückzuführen sein, dass die begasteten Proben besser durchmischt sind. Interessanterweise zeigte sich, dass hierbei mit Stickstoff begastete mehr phagozytieren als jene mit Sauerstoff. Dieser Unterschied wird deutlicher, wenn Erythrozyten anwesend sind.

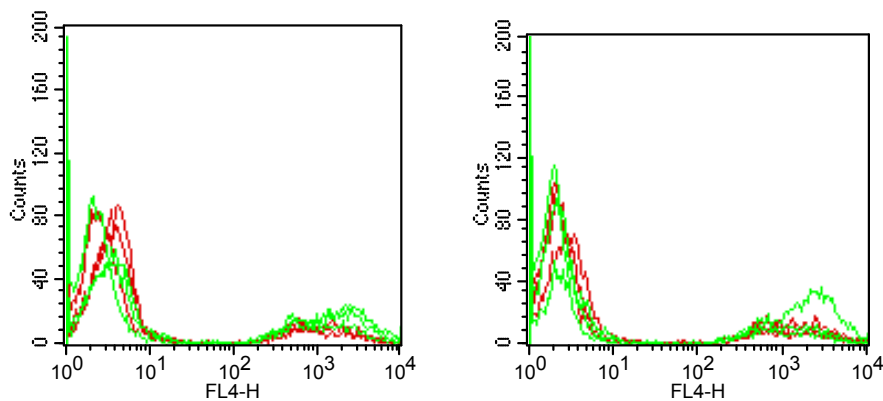


Abbildung 4.7-B: Phagozytose von WBC mit (grün) und ohne 1/16 Erythrozyten, begast mit Stickstoff (links) bzw. Sauerstoff (rechts)

Bezüglich der Phagozytose kann festgehalten werden, dass die Aufnahme von Zymosan durch Begasung mit Sauerstoff oder Stickstoff zunimmt.

Wie aus den Histogrammen 4.7-B hervorgeht, nimmt bei Begasung der WBC mit N₂ (links) die Phagozytoseaktivität bei Anwesenheit von Erythrozyten noch zu. Wir gehen daher davon aus, dass die aktivierende Wirkung höchstwahrscheinlich durch Erythrozyten vermittelt wird. Im Gegensatz dazu scheint die Phagozytoseaktivität bei Begasung mit Sauerstoff (rechts) nicht beeinflusst zu werden. Betrachte man die Histogrammstatistiken, so nimmt hier die Phagozytose tendenziell bei Anwesenheit von Erythrozyten noch ab

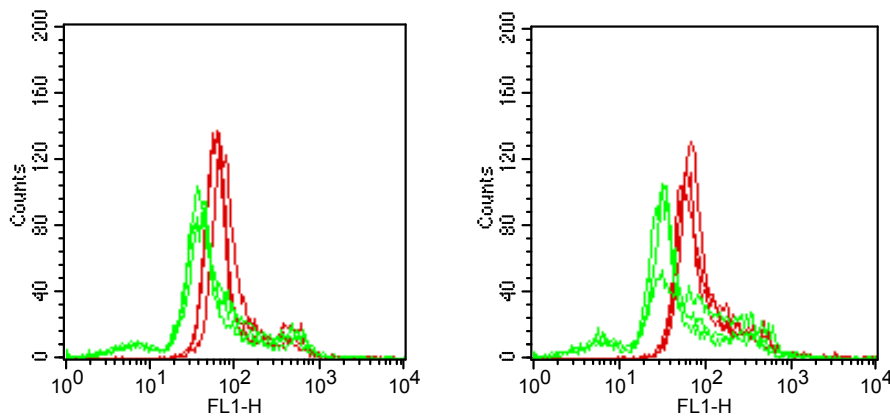


Abbildung 4.7-C: Vergleich WBC mit 1/16 E (grün) und ohne 1/16 E im FL1 (Oxidativer Burst indirekt über DHR gemessen): Begasung mit Stickstoff (links) bzw. Sauerstoff (rechts)

Wie aus den Histogrammen 4.7-C hervorgeht, bewirkt die Anwesenheit von Erythrozyten sowohl bei Begasung mit Stickstoff als auch mit Sauerstoff eine deutliche Reduzierung des oxidativen Stresses. Dies ist zu einem durch die Funktion der Erythrozytenenzyme Katalase und Superoxiddismutase erklärbar. Zum anderen wissen wir aus den CAT Versuchen, dass bereits die Anwesenheit von Erythrozyten, unabhängig von diesen Enzymen, den oxidativen Stress puffern. Des Weiteren haben wir Grund zur Annahme, dass auch DHR von Erythrozyten kompetitiv gebunden.

Da wir Grund zur Annahme hatten, dass das zur Messung der ROS Produktion verwendete DHR selbst geringfügig die Phagozytosefähigkeit der Granulozyten hemmt und ferner DHR zum Teil von Erythrozyten gebunden wird, wiederholten wir das Experiment ohne Zugabe von DHR. Da auch unter diesen Bedingungen mit Stickstoff begaste WBC deutlich mehr Zymosan aufnehmen und dieser Unterschied bei Zugabe von Erythrozyten noch größer wird,

kann davon ausgegangen werden, dass der aktivierende Einfluss des Stickstoffs durch die Anwesenheit von roten Blutkörperchen vermittelt wird.

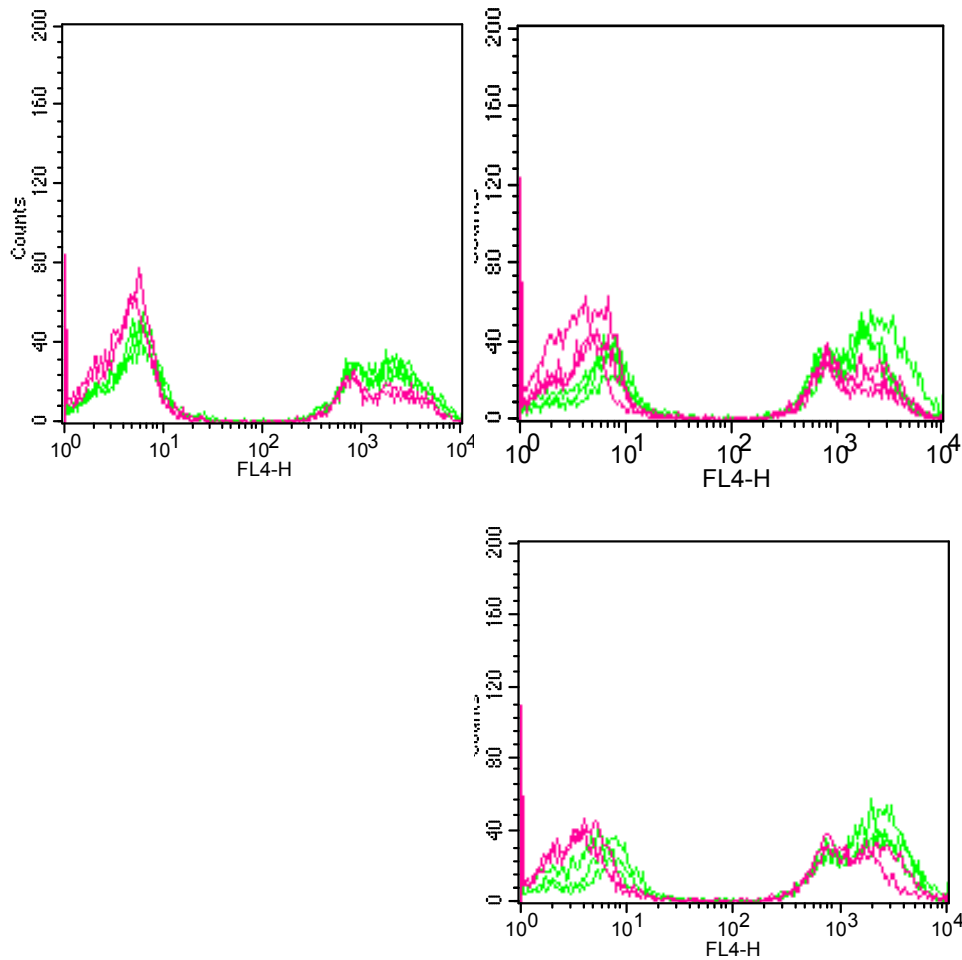


Abbildung 4.7-D: Vergleich von WBC begast mit Sauerstoff (violett) oder Stickstoff (grün) mit unterschiedlichen Erykonzentrationen : WBC ohne Erythrozyten (links oben), WBC 164 E (rechts oben) sowie WBC 1/16 Ery (rechts unten): Da der Abstand zwischen Sauerstoff und Stickstoff mit Zunehmender Erythrozytenanzahl größer wird, dürfte der positive Effekt der Begasung mit Stickstoff erythrozytenvermittelt sein. Die Messung erfolgte ohne DHR)

Wie aus den Histogrammen 4.7-D ersichtlich, nimmt die Phagozytose bei Anwesenheit von Erythrozyten eher noch zu. Auf Grund dieser Beobachtung gehen wir davon aus, dass die aktivierende Wirkung von N₂ tatsächlich erythrozytenvermittelt ist.

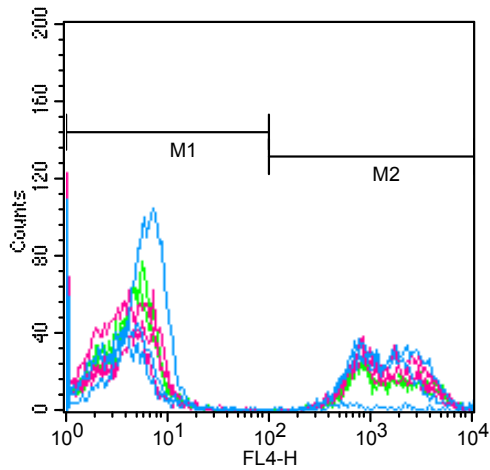


Abbildung 4.7-E: Vergleich WBC bei unterschiedlichen Erykonzentrationen mit Sauerstoff begast: wBC (grün), WBC 1/64 E (violett) WBC 1/16 E (blau). Im Gegensatz zur Stickstoffbegasung scheint die Erythrozytenanzahl nicht so sehr mit der Phagozytose korreliert sein; dennoch nimmt auch hier die Phagozytose scheinbar mit der Erythrozytenanzahl zu. Messung ohne DHR (siehe Text)

Bei Begasung mit Sauerstoff zeigen sich kaum Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Erythrozytenkonzentrationen. Ohne DHR bleibt dennoch die Reihenfolge, wenn auch schwach erkennbar.

	% gated	stdev	mean	geom Mean	Cv	median	stdev
WBC unbegast	55,51		1823,94	1429,74	72,05	1526,14	
WBC N2	49,75	5,10	1912,63	1466,75	75,80	1490,39	43,41
E1/64 N2	66,99	7,63	1857,85	1490,00	67,77	1583,57	391,26
E1/16 N2	56,15	9,48	1973,52	1546,22	68,83	1673,10	127,27
WBC O2	30,25	1,15	1686,31	1280,98	79,41	1204,30	6,24
E1/64 O2	39,69	9,11	1559,43	1224,87	74,78	1160,94	149,77
E1/16 O2	33,99	27,10	1594,49	1146,95	92,87	1095,14	324,60

Tabelle 4.7-F Tabelle zu den Histogrammen 4.7-d und 4.7-E: Messung des Einflusses der Eryzahl auf die Phagozytose ohne DHR,

Die Auswertung der FACS Analysen mehrerer Experimente mit DHR ergab hinsichtlich der % aktiven Granulozyten (Bereich 10^2 bis 10^4) zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen Stickstoff- und Sauerstoffbegasung:

		WBC	WBC	WBC	WBC	WBC	WBC	WBC E 1/64	WBC
			E 1/16	N2	E1/64 N2	E1/16 N2	O2	O2	E 1/16 O2
2008-09-23	A pos			1,00			2,70		
2008-09-23	O pos			1,00			2,38		
2008-09-24	Apos			1,00	0,53	1,27	0,40	0,52	0,88
2008-09-25	B pos			1,00	0,65	1,87	0,91	0,88	1,12
2008-09-30	O pos			1,00		1,94			
2008-10-02	O pos	3,24		1,00		1,62			
2008-10-03	AB neg	0,64	3,33	1,00		2,27			
2008-10-20	A pos	1,12		1,00	1,35	1,13	0,61	0,80	0,68
		1,67		1,00	0,84	1,68	1,40	0,73	0,89

Tabelle 4.7-G: Mittelwert aus verschiedenen Experimenten (Einfluss von Erythrozytenanzahl und Begasung auf die Phagozytose von Zym-AF-633), Proben mit DHR

Mittelwerte im FL4 relativ zu mit Stickstoff begasten WBC: Die Anwesenheit der Erythrozyten scheint die Fähigkeit der WBC zur Phagozytose zu fördern (bei 1/16 der Erythrozytenzahl finden wir 68 % mehr aktive Granulozyten verglichen mit der erythrozytenlosen Probe).

Mit Ausnahme eines Versuchs sind Prozentsätze an phagozytierenden neutrophilen Granulozyten (FL4) bei Stickstoffbegasung höher als jene bei Begasung mit Sauerstoff. Ferner fällt hier auf, dass der Begasungseffekt von der An- bzw. Abwesenheit von Erythrozyten mit beeinflusst wird, besonders deutlich zu sehen bei Stickstoffbegasung: Hier finden wir bei nur 1/16 der Standarderythrozytenzahl bis zu über 100 % mehr aktive neutrophile Granulozyten verglichen zu erythrozytenlosen Proben. Bei Begasung mit Sauerstoff ist der Einfluss nicht so deutlich zu sehen.

Bezüglich des oxidativen Burst haben Erythrozyten sowohl bei Stickstoff- als auch bei Sauerstoffbegasung einen dämpfenden Einfluss. Hier nimmt der oxidative Stress mit steigender Erythrozytenzahl eher ab. Das kann aber damit zusammenhängen, dass das zur Bestimmung verwendete DHR von den Erythrozyten abgefangen wird. Andererseits zeigt diese Tatsache auch die Schutzfunktion der in der Erythrozytenmembran befindlichen Enzyme Katalase und Superoxiddismutase, deren Aufgabe es ist, den oxidativen Stress durch Abbau von Superoxid bzw. Wasserstoffperoxid zu verringern.

				WBC	WBC	WBC	WBC	WBC	WBC	WBC E	WBC
					E	N2	E1/64	E1/16	N2	O2	E 1/64
					1/16		N2				O2
39714,00	Apos			1,00			5,23				1,53
39714,00	Opos			1,00			1,74				1,57
39715,00	Apos			1,00	0,22	0,27	0,34	0,20	0,23		
39716,00	B pos			1,00	0,42	0,99	1,21	0,56	0,68		
39721,00	0 pos			1,00		0,61				0,48	0,78
39723,00	0 pos	1,52	0,68	1,00		0,54				0,93	0,56
39724,00	AB neg	0,32	0,40	1,00		0,27	0,23		0,28		
		0,92	0,54	1,00	0,32	0,54	1,75	0,38	0,40	1,13	0,67

Tabelle 4.7-H Mittelwerte der Experimente aus Abb 4.7-G im FL (Oxidativer Burst, DHR gemessen)

Zieht man nun als Lagemaß das geometrische Mittel oder den Mittelwert heran, so zeigen sich ohne DHR deutliche Unterschiede zwischen den Begasungsformen. Vergleicht man die Lage des Mittelwerts mit jener von unbegasteten WBC, so ist jener bei Stickstoffbegasung im FL4 (Phagozytose) deutlich größer als jener der Sauerstoffbegasung. Auch nimmt der Mittelwert mit steigender Erythrozytenzahl zu. Es scheint also die Stickstoffbegasung die Phagozytose von Zymosan zu steigern. Zudem nimmt der Mittelwert mit zunehmender Erythrozytenzahl zu. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass die Erythrozyten, indirekt oder direkt, irgendeine Form die Aktivierung durch Stickstoff fördern. Bei Verwendung von Sauerstoff verhält es sich genau umgekehrt. Hier nimmt der Mittelwert mit steigender Erythrozytenzahl ab.

Es scheint so zu sein, dass durch die Begasung mit Stickstoff sowohl der Prozentsatz der Neutrophilenaktivierung zunimmt als auch diese Population im FL4 weiter nach Rechts shiftet. Sauerstoff scheint hingegen deutlich die Aktivierung zu hemmen. Bezüglich der Erythrozytenzahl wirken Erythrozyten bei Sauerstoffbegasung ebenso wie ohne Begasung prinzipiell hemmend. Diese Wirkung erklärt zum Teil auch die Beobachtung aus den Zellzahlvariationen, dass die Phagozytoseaktivität indirekt proportional der Erythrozytenzahl ist.

Wird zusätzlich zu den Proben DHR zur Bestimmung des oxidativen Bursts eingesetzt, so scheint dieses ebenfalls die Aktivierung zu hemmen. Hier geht auch bei steigender Erythrozytenzahl zum Teil die Aktivierung durch Stickstoff zurück.

5 Diskussion

Blut ist ein sehr komplexes System, in dem eine Vielzahl von physiologischen Prozessen wie Sauerstofftransport, Nährstofftransport, Blutdruckregulation und Immunreaktionen ablaufen.

Unseren Daten nach gibt es einen offensichtlich einen Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von Erythrozyten und der Phagozytoseaktivität der neutrophilen Granulozyten sowie deren Fähigkeit zum Oxidativen Burst. Je mehr Erythrozyten anwesend sind, desto stärker wird in der Regel die Phagozytose gehemmt. So ist bei Variationen der Zellzahl bei Verwendung von Zellen ein und desselben Spenders die Phagozytoseaktivität bei jenen Proben am größten, die nur WBC und keine Erythrozyten enthalten. Man kann daher annehmen, dass die Anwesenheit von Erythrozyten inhibierend wirkt. Ferner gibt es auch hier wahrscheinlich einen internen Regulationsmechanismus, in dem die Neutrophilen Rückmeldungen über die Anzahl an aktiven Granulozyten in ihrer Umgebung erhalten und ihre eigene Aktivität der jeweiligen Situation anpassen. Wie wir gesehen haben, steigt die Phagozytoseaktivität bei Reduktion der Granulozyten um 25 % bzw. nimmt ab, wenn die Granulozytenzahl um 25 % erhöht wird.

Eine Möglichkeit wie diese Beobachtungen zu erklären ist die Aktivität der Radikalabbauenden Enzyme Katalase und Superoxiddismutase. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass neben der sehr stark autotoxischen Wirkung der ROS diese auch wichtige Funktionen in Signalwegen haben. Heute weiss man, dass es bedingt durch die Anwesenheit von Wasserstoffperoxid zu einem Ca^{++} Influx in die Zelle kommt. (Giambelluca et al, 2008). Ca^{++} löst dann innerhalb der Zellen eine Reihe von Veränderungen aus. Die möglichen Folgen reichen von einer Aktivierung von Signalwegen bis hin zur Steuerung des eigenen Tods.

Gerade die Fähigkeit der Erythrozyten die während des Oxidativ Burst auftretenden ROS abzubauen kann durchaus der Schlüssel zu der von uns gemachten Beobachtung sein: Je weniger Erythrozyten anwesend sind, desto weniger CAT und SOD stehen zur Verfügung, den oxidativen Stress abzubauen. Die logische Folge davon ist ein Anstieg in der Konzentration an ROS. ROS sind zwar prinzipiell autotoxisch, führen aber auch durch den Ca^{++} Influx zu physiologischen Veränderungen innerhalb der Zelle.

Wenn wir nun davon ausgehen, dass Ca^{++} in der Lage ist, die Phagozytose zu steigern, dann bedeutet die durch die Reduktion der Erythrozytenzahl bedingte erhöhte ROS Konzentration indirekt auch eine verstärkte Phagozytose. In der Tat zeigen neue Studien,

dass es durch H_2O_2 auch zu einer Mobilisierung von agonistischen Ca Speichern kommt. Diese Mobilisierung führt schließlich zu einer deutlichen Steigerung der Phagozytose, sowohl bezüglich des Prozentsatzes phagozytischer Zellen als auch in der Effizienz (Bejarano, Terron et al. 2007).

Diese von uns gemachte Beobachtung widerspricht auf den ersten Blick der Hypothese, dass Erythrozyten über den CR1 Rezeptor die $C3b$ abhängige Phagozytose durch Neutrophile stimuliert. (Forslid, Hed et al. 1985). Nach dieser Hypothese sind es gerade CAT und SOD der Erythrozyten, die durch Abbau der Radikale eine gesteigerte Phagozytose erlauben. Nach Forslid binden die Erythrozyten über ihren CR1 Rezeptor das Antigen und liefern während der Phagozytose die zum Schutz der Neutrophilen vor dem von ihnen selbst ausgelösten Oxidativen Stress nötigen Enzyme CAT und SOD. Diese Hypothese stützt sich auch auf die Tatsache, dass diese Aktivierung auch bei Zugabe eines Zelllysats bzw. der beiden Enzyme beobachtbar ist.

In unseren Versuchen fanden wir jedoch höhere Phagozytoseraten bei Inhibition dieser beiden Enzyme, was darauf hindeutet, dass eine leicht erhöhte Konzentration an ROS durchaus nicht zwangsläufig zu einem Rückgang der Phagozytose führen muss. Wahrscheinlich sind in vivo beide Effekte der Erythrozyten zu beobachten. Es ist an dieser Stelle jedoch anzumerken, dass die von Forslid et al publizierten Ergebnisse durch Stimulation mit fMLP hervorgerufen wurden. Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin wirkt bekanntlich über die Öffnung von internen Ca^{++} Speicher und ist somit ein Agonist von Wasserstoffperoxid. Daher bewirkt die Anwesenheit des Erythrozytenenzym Katalase durch Wegfall des Agonisten eine scheinbar stärkere Aktivierung durch fMLP. Tatsächlich benutzen fMLP und Wasserstoffperoxid dieselben Ca^{++} Speicher, sodass Wasserstoffperoxid die durch fMLP bewirkte Ca Mobilisierung verhindert. Da wir in unseren Versuchen mit Zymosan stimulierten, wurde hier die Aktivierung durch zusätzliches Öffnen der Ca^{++} Speicher leicht erhöht.

In den Katalaseversuchen zeigte sich uns ein ähnliches Bild: eine Inhibierung der Katalase führt zwar zu zusätzlichem oxidativen Stress durch die Bildung von ROS, die Phagozytoseaktivität wurde dadurch jedoch meist kaum beeinflusst. Bei normaler Erythrozytenzahl findet sich oft auch kein Unterschied zwischen CAT+ und CAT- im FL1. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass bereits die Anwesenheit von Erythrozyten genügt, um oxidativen Stress abzuf puffern. Ebenso wie Plasma puffern auch Erythrozyten alleine durch ihre Anwesenheit den oxidativen Stress. Reduziert man aber die Erythrozytenzahl, so steigt der oxidative Stress. Bei 1/64 der Erythrozytenzahl zeigt sich oft ein klarer Unterschied zwischen An- und Abwesenheit von Katalase, sowohl in die eine als auch in die andere Richtung. Auch das kann als Indiz für mehrere Faktoren in der Regulation der Aktivierung hindeuten. Wie wir bereits bei der Erythrozytenzahl gesehen haben, gibt es auch hier große individuelle Unterschiede zwischen den Spendern. Manchmal reicht die normale Erythrozytenzahl um den Stress durch ROS abzuf puffern, manchmal sieht man aber bereits hier Unterschiede mit und ohne Katalase. Offensichtlich variiert die Menge und Effizienz der Katalase von Spender zu Spender.

Wenn die oben formulierte Arbeitshypothese stimmt und Wasserstoffperoxid sowohl aktivierend als auch inhibierend wirken kann, so müsste ab einem gewissen Level an ROS die autotoxische Wirkung zu stark werden und die Phagozytose deutlich zurückgehen.

In der Tat zeigt sich bei zusätzlichem Stress durch Vorbehandlung der Erythrozyten mit Wasserstoffperoxid sehr früh ein Unterschied zwischen CAT+ und CAT-, wobei häufig sogar CAT- Proben mehr phagozytieren. Erhöht man den oxidativen Stress weiter indem man die Erythrozytenzahl verringert, so nähern sich CAT+ und CAT- wieder etwas an. Anscheinend können nicht mehr durch Katalase geschützte Zellen nur noch begrenzt phagozytieren. Ab einem bestimmten Stresslevel reicht auch die Katalase nicht mehr aus und CAT+ und CAT- phagozytieren auf dem gleich niedrigen Level. Unter diesen Bedingungen überwiegt offensichtlich der inhibierende Einfluss der Sauerstoffradikale über den aktivierenden über den Ca⁺⁺ Influx.

Man nimmt heute zudem an, dass die Produktion von Sauerstoffradikalen und der dadurch bedingte Ca⁺⁺ Influx ab einem gewissen Grad über einen negativen Loop sogar die Zellen in die Apoptose treiben. Dieser Mechanismus macht durchaus Sinn:

Während der Inflammation kommt es zu einer Akkumulation von ROS produzierenden Neutrophile Granulozyten. Anfänglich stimulieren sie sich gegenseitig über die ROS induzierte Wege. Ab einem gewissen Stresspegel setzt der negative Loop ein und die Zellen sterben ab, die Inflammation klingt ab.

Des Weiteren haben unsere Experimente gezeigt, dass die ebenfalls durch Ca⁺⁺ abhängige Signalwege gebildete Vesikel sowohl die Zellen zur Produktion von ROS als auch zur Phagozytose anregen. Auffallend ist dabei, dass offensichtlich Burst und Phagozytose getrennt von einander modulierbar sind. Wie gezeigt können Vesikel der Blutgruppe AB neg Neutrophile der Blutgruppe O pos sehr stark zur Phagozytose anregen, der oxidative Burst ist jedoch nur geringfügig erhöht gegenüber der Nullkontrolle. Es gibt also mehrere Möglichkeiten die Art der Immunantwort zu steuern. Eine Möglichkeit hierzu liefern die Bestandteile des Plasmas.

Ohne Unterstützung durch das Plasma werden sowohl autologe als auch heterologe Vesikel nur schwach phagozytiert. Daher findet man bei Verwendung von heterologem Plasma (Plasma und Vesikel gleiche Blutgruppe) nur eine schwache Reaktion, unabhängig von der Blutgruppe. Sowohl autologe als auch heterologe Vesikel werden durch die Neutrophile Granulozyten erkannt und lösen eine schwache Immunantwort aus. Erst bei Verwendung von autologem Plasma (Blutgruppe der Neutrophile Granulozyten) kommt es zu einer vollen Aktivierung der Neutrophile Granulozyten. Hier handelt es sich offensichtlich um einen internen Schutzmechanismus, der eine Autoimmunreaktion verhindern soll. Eine volle

Aktivierung der Neutrophilen ist nur bei Kostimulation durch andere Immunzellen und Komplementsystem möglich. Die Neutrophilen steuern die Immunantwort durch Rekrutierung anderer Zellen, die ihrerseits über Signale erst die volle Aktivierung der Neutrophilen Granulozyten ermöglichen.

Wie wir zeigen konnten lösen auch Vesikel der eigenen Blutgruppe (auto- oder heterolog) eine geringe Immunantwort aus. Bedenkt man, dass auch in Blutkonserven ständig Vesikelbildung stattfindet (Salzer, Zhu et al. 2008), macht das Problem von Bluttransfusionen bei Akuttraumapatienten deutlich. Auch eine Transfusion mit Eigenblut bedeutet bis zu einem gewissen Grad physiologischen Stress durch eine schwache Immunreaktion. Vesikel sind in der Lage, Neutrophile sowohl zum oxidativen Burst, als auch zur Phagozytose zu stimulieren. Diese Immunantwort wird nicht zuletzt durch die im Plasma vermittelten Antikörper vermittelt. Überraschenderweise zeigte sich, dass es die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten zum oxidativen Burst nicht zwangsläufig auch eine Aktivierung im Sinne der Phagozytose bedeutet. Durch FACS und Lumineszenzmessung derselben Probe konnten wir zeigen, dass Vesikel der Blutgruppe AB neg WBC zu einer starken Phagozytose stimulieren, dieselbe Probe im Luminometer jedoch kaum oxidativen Burst zeigte. Tatsächlich war das Luminolsignal nur geringfügig höher als die Nullkontrolle und etwa in dem Bereich der orthologen Blutgruppe des WBC Spenders. Diese Beobachtung zeigt deutlich, dass entgegen der früher vorherrschenden Meinung, dass eine Stimulation von Neutrophilen immer sowohl eine Aktivierung im Sinne von Phagozytose und Produktion von ROS bedeutet. Offensichtlich sind die Aktivierungsmechanismen für Burst und Phagozytose zumindest teilweise voneinander getrennt und unabhängig von einander modulierbar.

Es wäre sehr riskant, auf ein Signal wie die Antigene A und B auf der Erythrozytenoberfläche von AB neg Vesikeln auch einen starken oxidativen Burst auszulösen. Da die Stimulation zur Phagozytose stark genug ist um die Situation zu klären, ist ein zusätzlicher oxidativer Burst nicht nötig und würde nur unnötige Kollateralschäden verursachen. Tatsächlich stellen die Neutrophilen auch so etwas wie wichtige Schaltzentralen in der Immunantwort dar. Sie rekrutieren dendritische Zellen und Macrophagen an den Ort der Immunantwort und bestimmen so auch den Verlauf der Immunreaktion. Auf Grund der potentiellen Gefährlichkeiten muss die genau orchestriert werden.

Wie wir gesehen haben, existieren eine Reihe von Regelmechanismen. Sei es der durch Botenstoffe ausgelöste Ca^{++} Influx, der seinerseits im Inneren eine Reihe von biochemischen und molekularbiologischen Signalwege anschaltet. Auf diese Weise regulieren Neutrophile ihre eigene Immunantwort ebenso wie jene ihrer Interaktionspartner. Oft ist bereits in dieser Reaktion die Auflösung der Immunantwort inkludiert.

6 Literatur

Bejarano, I., M. P. Terron, et al. (2007). "Hydrogen peroxide increases the phagocytic function of human neutrophils by calcium mobilisation." Mol Cell Biochem **296**(1-2): 77-84.

Bluml, S., B. Rosc, et al. (2008). "The oxidation state of phospholipids controls the oxidative burst in neutrophil granulocytes." J Immunol **181**(6): 4347-53.

Dekaris, I., T. Marotti, et al. (1998). "Hydrogen peroxide modulation of the superoxide anion production by stimulated neutrophils." Immunopharmacol Immunotoxicol **20**(1): 103-17.

Forslid, J., G. Hallden, et al. (1991). "The inhibition of CR1 mobilization of human granulocytes by the presence of erythrocytes. A possible mechanism for intravascular regulation of granulocyte modulation." Immunology **74**(4): 685-8.

Forslid, J., J. Hed, et al. (1985). "Erythrocyte enhancement of C3b-mediated phagocytosis by human neutrophils in vitro: a combined effect of the erythrocyte complement receptors CR1 and erythrocyte scavengers to reactive oxygen metabolites (ROM)." Immunology **55**(1): 97-103.

Salzer, U., R. Zhu, et al. (2008). "Vesicles generated during storage of red cells are rich in the lipid raft marker stomatin." Transfusion **48**(3): 451-62.

Giambelluca, M. S. and O. A. Gende Mol Cell Biochem.2008

Goldschmidt-Clermont, P. J. and L. Moldovan (1999). "Stress, superoxide, and signal transduction." Gene Expr **7**(4-6): 255-60.

Heyworth, P. G., A. R. Cross, et al. (2003). "Chronic granulomatous disease." Curr Opin Immunol **15**(5): 578-84.

Kovalenko, E. I., G. N. Semenkova, et al. (2007). "[Effect of hydrogen peroxide on ability of neutrophils to generate the reactive oxygen and chlorine species and secrete myeloperoxidase in vitro]." Tsitologiya **49**(10): 839-47.

Morgan, B. P., J. R. Dankert, et al. (1989). "Vesicular removal by oligodendrocytes of membrane attack complexes formed by activated complement." J Immunol **339**(6226): 620-2.

Noack, D., J. Rae, et al. (2001). "Autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by defects in NCF-1, the gene encoding the phagocyte p47-phox: mutations not arising in the NCF-1 pseudogenes." Blood **97**(1): 305-11.

Salzer, U., R. Zhu, et al. (2008). "Vesicles generated during storage of red cells are rich in the lipid raft marker stomatin." Transfusion **48**(3): 451-62.

Scolding, N. J., B. P. Morgan, et al. (1989). "Vesicular removal by oligodendrocytes of membrane attack complexes formed by activated complement." Nature **339**(6226): 620-2.

Werner, E. (2004). "GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling." J Cell Sci **117**(Pt 2): 143-53.

7 Lebenslauf

GEBLERGASSE 24-26/1/12 • 1170 WIEN
TELEFON 0664/5018129 • E-MAIL HERBERT.JANK@UNIVIE.AC.AT

HERBERT JANK

PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

- Familienstand: ledig
- Nationalität: Österreich
- Geburtsort: St. Veit/ Glan
- Eltern: Josef und Theresia Jank

AUSBILDUNG

1993 bis 2008 Universität Wien
Biologie/Humanbiologie

BERUFSERFAHRUNG

10/2007 - fortlaufend Max F. Perutz Laboratories GmbH
Wien
Wissenschaftlicher Mitarbeiter
■ Institut für Medizinische Biochemie

SPRACHKENNTNISSE

Englisch in Wort und Schrift
Italienisch in Wort und Schrift
Grundkenntnisse Französisch

HOBBIES

Bouldern
Bonsai
Shogi

WEHRDIENST

September 2001 bis März 2002 Fernmeldebataillon 1 Villach

