

**Isolierung und Charakterisierung
 unreifer immunsuppressiver Neutrophiler
 im peripheren Blut von Tumorpatienten**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem.

Dominik Schmaltz

geboren am 28.12.1976 in Hagenow

2007



Aus dem **Institut für Physiologische Chemie**
Tierärztliche Hochschule Hannover
Arbeitsgruppe für Angewandte Molekularbiologie
und Proteindesign (Prof. Dr. Bernd Otto)



Durchgeführt am **Forschungszentrum Borstel**
Leibniz - Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Abteilung Immunologie und Zellbiologie
Laborgruppe Immuntherapie (PD Dr. Sven Brandau)

**Auch aus Steinen, die einem in den Weg gelegt werden,
kann man Schönes bauen.**

Johann Wolfgang von Goethe

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Bernd Otto
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Walter Müller
Tag der Promotion: 22. Februar 2007

Dominik.Schmaltz@web.de

Gewidmet ist diese Arbeit

meiner Tochter Luise Dosdahl

und

meinen Großeltern Wilhelm und Gisela Schmaltz

 Günther und Elfriede Pries

Finanziert wurde diese Arbeit von

Mai 2003 bis Mai 2006

durch ein Stipendium der DFG,

Graduiertenkolleg 288 "Strukturen und Mediatoren der Zellinteraktion", Projekt B9

Mai 2006 bis Juli 2006

durch das Forschungszentrum Borstel

Inhaltsverzeichnis

Dominik.Schmaltz@web.de

Abkürzungen	7
Zusammenfassung.....	9
Abstract.....	11
1 Einleitung	13
1.1 Granulopoese	13
1.2 Immunologische Funktionen der Neutrophilen	14
1.3 Tumorwachstum als entzündlicher Prozess	15
1.4 Dichotome Rolle von Neutrophilen bei inflammatorischem Tumorwachstum	16
1.5 Immunsuppressive Zellen myeloiden Ursprungs	17
1.6 Fragestellung und Ziele der vorliegenden Arbeit	17
2 Patienten, Material und Methoden	19
2.1 Patienten	19
2.1.1 Patientenkollektiv	19
2.2 Material	19
2.2.1 Chemikalien und Lösungen	19
2.2.2 Puffer und Kulturmedien	20
2.2.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie	20
2.2.4 Antikörper zur Stimulation von T-Zellen	21
2.2.5 Substanzen zur Isolierung von PMN mittels MACS	21
2.2.6 Stimuli	21
2.2.7 Instrumente und Geräte	21
2.2.8 Sonstiges	22
2.3 Zellbiologische Methoden	22
2.3.1 Dichtegradientenzentrifugation von peripherem Blut	22
2.3.2 Isolierung von MNC aus peripherem Blut nach Dichtegradientenzentrifugation	22
2.3.3 Isolierung von PMN durch Lyse der Erythrozyten	23
2.3.4 Separation von MNC mittels diskontinuierlichem Dichtegradienten	23
2.3.5 Positive Selektion von LD-PMN mittels MACS mit anti CD15-Beads	24
2.3.6 Positive Selektion von LD-PMN mittels MACS mit Antikörper gegen CD66b	24
2.3.7 Isolierung von hochreinen LD-PMN und gleich behandelter HD-PMN	25
2.4 Biochemische Methoden	26
2.4.1 Immunfluoreszenzfärbung für die Durchflusszytometrie	26
2.4.2 Bestimmung der Viabilität durch Färbung mit Annexin V-PE und 7-AAD	27
2.4.3 Panoptische Färbung von Zytospinpräparaten nach Pappenheim	27

2.4.4	Bestimmung der Konzentration von IL-8 mittels ELISA	28
2.5	Experimente zur Funktion von PMN.....	28
2.5.1	Analyse der Adhäsion von PMN an Endothelzellen.....	28
2.5.2	Untersuchung der Chemotaxis von PMN.....	28
2.5.3	Analyse der Produktion von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten (ROI)	29
2.5.4	Kultur und Stimulation von PMN	30
2.5.5	Analyse des Einflusses von PMN auf die Proliferation von T-Zellen.....	30
3	Ergebnisse	32
3.1	Identifizierung von LD-PMN im peripheren Blut von Tumorpatienten.....	32
3.1.1	Nachweis von LD-PMN im peripheren Blut von Tumorpatienten	32
3.1.2	Gesteigertes Zellvolumen stellt einen Grund für geringere Dichte der LD-PMN dar.....	34
3.2	Immunphänotypische Charakterisierung der LD-PMN	35
3.2.1	LD-PMN unterscheiden sich von HD-PMN in der Expression Funktions-assoziiertes Moleküle	35
3.3	Isolierung hochreiner LD-PMN aus dem peripheren Blut von Tumorpatienten ...	41
3.3.1	Unzureichende Isolierung von LD-PMN durch diskontinuierliche Dichtegradienten	41
3.3.2	Verunreinigende Monozyten in LD-PMN nach positiver Selektion durch MACS.....	43
3.3.3	Isolierung hochreiner LD-PMN nach Depletion der Monozyten und positiver Selektion durch MACS	45
3.4	Viabilität und Kernmorphologie isolierter LD-PMN	47
3.4.1	LD-PMN sind nach Isolierung viabel.....	47
3.4.2	Unreife Neutrophile stellen Subpopulation der LD-PMN dar.....	48
3.4.3	Anteil der CD16 ^{low} LD-PMN korreliert signifikant mit dem Anteil unreifer LD-PMN	49
3.5	Funktionelle Eigenschaften der LD-PMN von Tumorpatienten	49
3.5.1	LD-PMN adhären verstärkt an Endothelzellen.....	50
3.5.2	LD-PMN weisen reduzierte Chemotaxis auf	51
3.5.3	LD-PMN sind in der Produktion von ROI stark eingeschränkt	52
3.5.4	LD-PMN sezernieren vermindert IL-8	55
3.5.5	LD-PMN inhibieren die Proliferation von T-Zellen.....	56
4	Diskussion	58
4.1	Eindeutige Identifizierung von LD-PMN im peripheren Blut von Tumorpatienten ...	58
4.2	Erste erfolgreiche Isolierung hochreiner LD-PMN.....	59
4.3	LD-PMN stellen unreife Neutrophile dar	60
4.4	Funktionelle Eigenschaften von LD-PMN	63
4.5	LD-PMN supprimieren die Proliferation von T-Zellen.....	65
Literatur.....		68

Abbildungsverzeichnis	78
Veröffentlichungen.....	79
Danksagung.....	81
Curriculum vitae	83
Erklärung zur Dissertation.....	84

Abkürzungen

AAD	A mino A ctinomycin D
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BCG	<i>Mycobacterium bovis</i> B acillus C almette- G uérin
BSA	Rinderserum-Albumin (b ovine s erum a lbumin)
CD	Differenzierungsmarker (c luster of d ifferentiation)
CFSE	C arboxy f luorescein-Diacetat- S uccinimidyl- E ster
CFU	Kolonie bildende Einheit (c olony f orming u nit)
Ci	Curie
cpm	Ereignisse pro Minute (c ounts p er m inute)
DMSO	D imethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (e thylene d iamine t etra a ctic a cid)
ELISA	Enzym-gekoppelte Immunabsorptions-Untersuchung (e nzyme l inked i mmunosorbent a ssay)
<i>et al.</i>	<i>Et altera</i> (und andere)
ely	Erythrozytenlyse
Fab	Antigen-bindendes Fragment (f ragment a ntigen b inding)
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (f luorescence a ctivated c ell s orting)
Fc	Konstantes Fragment (f ragment c rystallizable)
FcR	Rezeptor für konstantes Fragment von Antikörpern
FITC	F luorescein- I sothiocyanat
FCS	Fötales Kälberserum
fMLP	N - F ormyl- M ethionin- L euclin- P henylalanin
FSC	Vorwärts-Streuung (f orward s catter)
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (g ranulocyte- c olony s timulating f actor)
GM-CFU	Granulozyten/Monozyten-Kolonie bildende Einheit (g ranulocyte/ m onocyte- c olony f orming u nit)
GM-CSF	G ranulozyten/ M onozyten-Kolonie stimulierender Faktor (g ranulocyte/ m onocyte- c olony s timulating f actor)
GPI	G lycosyl p hosphatidylinositol
h	Stunde
HBSS	H anks b alanced s alt s olution
HD-PMN	Granulozyten mit regulärer Dichte (H igh D ensity G ranulozytes)
HOCl	hypochlorige Säure
HUVECs	Humane Nabelschnur-Endothelzellen (H uman U mbilical V ein E ndothelial C ells)

IFN	I nterferon
Ig	I mmunglobulin
IL	I nterleukin
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
LD-PMN	Granulozyten geringer Dichte (<i>Low Density Granulocytes</i>)
LPS	L ipopolysaccharid
Lsg.	L ösung
MACS	Magnetisch aktivierte Zellsortierung
M-CSF	Monozyten-Kolonie stimulierender Faktor (<i>monocyte-colony stimulating factor</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
min	Minute(n)
MCP-1	M onozyten c hemotaktisches P rotein-1
mlg	aus der Maus stammendes Immunglobulin
MIP-1	M akrophagen inflammatorisches P rotein-1
MNC	Mononukleäre Zellen
MOI	Multiplizität der Infektion
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	P hycoerythrin
PF-4	P lättchenfaktor-4
PMN	Granulozyten (<i>polymorphonuclear leukocytes</i>)
PS	P hosphatidylserin
PVA	P olyvinylalkohol
RLU	Relative Lichteinheiten (<i>relative light units</i>)
ROI	Reaktive Sauerstoff-Intermediate
RT	R aumtemperatur
Rxx10	Kulturmedium RPMI 1640, 1 % Penicillin/Streptomycin-Lsg. (v/v), 10 % FCS (v/v)
SSC	orthogonale Seitwärts-Streuung (<i>side scatter</i>)
TNF	T umornekrosefaktor
TRAIL	Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose induzierender Ligand (<i>tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Biologische Aktivitätseinheit (u nit)
v/v	V olumen pro V olumen
w/v	G ewicht pro V olumen

Zusammenfassung

Neutrophile Granulozyten stellen die größte Population der Leukozyten im peripheren Blut des Menschen dar. Sie entwickeln sich im Knochenmark aus pluripotenten Stammzellen und werden nach abgeschlossener, myeloider Differenzierung als reife Neutrophile ins Blut ausgeschüttet. Bei Entzündung adhären Neutrophile ans Endothel und nach Diapedese migrieren sie als erste Zellen ins Gewebe. Am Entzündungsort weisen Neutrophile bakterizide und fungizide Funktionen auf, bei denen Phagozytose und Produktion von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten (ROI) eine zentrale Rolle spielen. Über diese Effektorfunktionen hinaus wurde in Neutrophilen auch die Kapazität zur Regulation von Immunantworten entdeckt. Beide Funktionen der Neutrophilen spielen bei der Entzündung von Tumoren eine wichtige Rolle. Neueste Erkenntnisse geben jedoch Hinweise darauf, dass Neutrophile neben ihrer protektiven Wirkung auch eine das Wachstum von Tumoren unterstützende Funktion besitzen können. So wurde in Neutrophilen aus Tumorpatienten die Produktion von tumoralen Wachstumsfaktoren und angiogenetischen Faktoren, als auch die Freisetzung von genotoxischen ROI nachgewiesen. Weiterhin wurden in Tiermodellen Tumor-assoziierte, unreife myeloide Zellen, die auch potentielle Vorläufer von Neutrophilen darstellen, als immunsuppressive Zellen identifiziert.

Ziel dieser Arbeit war es, Tumor-assoziierte neutrophile Granulozyten im peripheren Blut von Malignom-Patienten zu identifizieren und zu charakterisieren. Der Arbeit lag eine Beobachtung zu Grunde, nach der gegenüber gesunden Spendern im Blut von Tumorpatienten Granulozyten mit verringerter physikalischer Dichte (*low density polymorphonuclear granulocytes*, LD-PMN) nachweisbar sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden LD-PMN von 93 unbehandelten, infektionsfreien Tumorpatienten erstmals phänotypisch sowie funktionell charakterisiert und Neutrophilen regulärer Dichte (*high density* PMN, HD-PMN) gegenübergestellt. Notwendig dafür war die erfolgreiche Entwicklung einer Kombination von Dichtegradientenzentrifugation und Magnetseparation über CD66b nach Depletion residueller Monozyten zur Isolierung viabler LD-PMN mit einer Reinheit von über 99 %. Die Zellen dieser Fraktion erwiesen sich in Färbungen nach Pappenheim als Neutrophile, die zum großen Teil stabkernig und damit unreif vorlagen, während sich die restlichen LD-PMN wie HD-PMN als segmentkernige Neutrophile präsentierten. In den umfangreichen durchflusszytometrischen Analysen stellten sich LD-PMN anhand der Expression von CD16 ebenfalls als heterogen dar (CD16^{high}, CD16^{low}), wobei der Anteil der CD16^{low} LD-PMN mit dem Anteil stabkerniger LD-PMN korrelierte (*). Aufgrund der homogen stärkeren Expression von CD66b (***) und CD15 (***) und wegen der homogen schwächeren Expression von CD11b (*) und CD14 (*) auf LD-PMN gegenüber den reifen HD-PMN war die Gesamtheit der LD-PMN als unreif einzustufen. Belegt wurde dies ebenfalls durch das homogen gesteigerte Zellvolumen (***) der LD-PMN, sowie der schwächeren Expression von CD16 (**) auf den CD16^{high} LD-PMN im Vergleich zu HD-PMN. Demnach repräsentieren LD-PMN unreife Neutrophile, die sich teils im Differenzierungsstadium der Stabkernigen und teils im Stadium von frühen Segmentkernigen befinden.

Als Ursache für das Vorkommen von unreifen Neutrophilen im Blut von Tumorpatienten konnten bakterielle Infektionen und chronische Entzündung ausgeschlossen werden, denn LD- und HD-PMN exprimierten weder CD83 noch CD80, CD86 oder MHC Klasse II. Gegen den Einfluss von Zytokinen wie $\text{IFN}\gamma$, GM-CSF, $\text{TNF}\alpha$, IL-6 und IL-8 sprachen die nicht gesteigerte Expression von CD11b und CD14 auf HD-PMN, sowie jeweils schwächere Expression auf LD-PMN. Aufgrund der Abwesenheit von LD-PMN im peripheren Blut gesunder Spender wird eine Beeinträchtigung der neutrophilen Granulopoese durch Tumore vermutet.

In den funktionellen Analysen wiesen LD-PMN verstärkte Adhäsion (*) an Endothelzellen gegenüber HD-PMN auf, was in der gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen, resultierend aus dem Differenzierungsgrad, begründet scheint. Die reduzierte Chemotaxis (*) der LD-PMN gegenüber HD-PMN und die stark eingeschränkte Produktion von ROI (*) in LD-PMN entsprechen ihrem unreifen Differenzierungsstadium. Des Weiteren produzierten LD-PMN nach Stimulation weniger IL-8 als HD-PMN. Ein grundlegend wichtiges Ergebnis zur funktionellen Analyse der LD-PMN war, dass weder die Adhäsion an Endothelzellen, noch die Chemotaxis, sowie die Produktion von ROI durch die entwickelte Isolierungsprozedur signifikant beeinflusst werden.

Das interessanteste Ergebnis dieser Arbeit stellt die erstmals beobachtete, von autologen LD-PMN vermittelte Suppression der *in vitro* induzierten Proliferation von T-Zellen dar, während HD-PMN keinen vergleichbaren Einfluss zeigten. Zusammengefasst wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals unreife immunsuppressive Neutrophile im peripheren Blut von Patienten mit urologischen Tumoren, Non-Hodgkin-Lymphom, Pleurakarzinom, Mammakarzinom und Lungenkarzinom identifiziert. Die demonstrierte Suppression von T-Zellen durch LD-PMN spricht für die Berücksichtigung unreifer immunsuppressiver Neutrophiler im Blut von Tumorpatienten bei immuntherapeutischer Behandlung von Tumoren.

Schlagnworte: unreife Neutrophile, myeloide Suppressorzelle, Tumor

Abstract

Neutrophil granulocytes constitute the largest population of leukocytes in human peripheral blood. Evolving from pluripotent stem cells by passing through myeloid differentiation, they are released from the bone marrow into the blood as mature neutrophils. During inflammation they adhere to endothelium and after diapedesis neutrophils are the first cells migrating into the tissue. At the site of inflammation they exhibit bactericidal and fungicidal functions, while phagocytosis and production of reactive oxygen intermediates (ROI) play a pivotal role. Beyond these effector functions also the capacity of neutrophils to regulate immuneresponses was discovered. Both properties of neutrophils play an important role in the inflammation of tumors. However, recent reports provide also indications of neutrophils supporting the progression of tumors besides their protective effects. They were demonstrated to produce tumoral growth factors and angiogenic factors as well as releasing genotoxic ROI in cancer patients. Furthermore tumor-associated immature myeloid cells, which also represent potential progenitors of neutrophils, were identified as immunosuppressive cells.

The goal of this dissertation was to identify and to characterise tumor-associated neutrophil granulocytes in the peripheral blood of malignoma patients. Recent reports on granulocytes with low physical density (LD-PMN) that are present in the blood of cancer patients but not in the blood of healthy individuals, formed the basis of this dissertation.

LD-PMN from 93 non-infected, untreated cancer patients were characterized for the first time phenotypically as well as functionally and compared with granulocytes of regular physical density (High Density-PMN, HD-PMN). We succeeded to isolate viable LD-PMN with more than 99 % purity by the combination of density gradient centrifugation and subsequent magnetic cell separation according to CD66b expression following the depletion of residual monocytes. These cells represented neutrophils as determined by Pappenheim staining. A fraction of LD-PMN exhibited a band nucleus morphology attributing them to immature neutrophils, while segmented nuclei were displayed in the remaining LD-PMN as well as in HD-PMN. Heterogeneity of LD-PMN was also confirmed by flow cytometric analysis of CD16 expression, as LD-PMN were divided into CD16^{high} and CD16^{low} neutrophils, whereby the percentage of the CD16^{low} LD-PMN correlated (*) with the percentage of band LD-PMN. However, because of homogeneously elevated expression of CD66b (***) and CD15 (***) as well as homogeneously decreased expression of CD11b (*) and CD14 (*) on LD-PMN compared to mature HD-PMN, the entire LD-PMN population has to be classified as immature. This was also approved by homogeneously increased cellular volumen (***) of LD-PMN and diminished expression of CD16 (**) on CD16^{high} LD-PMN compared to HD-PMN. Accordingly, LD-PMN represent immature neutrophils, partly in the differentiation stage of band neutrophils and the rest in the stage of early segmented neutrophils.

Bacterial infections and chronic inflammation were excluded as explanations for the existence of immature neutrophils in the blood of cancer patients, since LD- and HD-PMN expressed neither CD83 nor CD80, CD86 or MHC class II. The non-elevated expression of CD11b und CD14 on HD-PMN and the weaker expression of these molecules on LD-PMN militated against effects of

cytokines like IFN γ , GM-CSF, TNF α , IL-6 or IL-8. Concerning the absence of LD-PMN in peripheral blood of healthy individuals, interference of neutrophil granulopoiesis by tumors is assumed.

Functional analyses revealed that in comparison to HD-PMN, LD-PMN displayed increased (*) adhesion on endothelial cells, which may be due to their elevated expression of adhesion molecules, resulting from their differentiation level. According to their differentiation stage LD-PMN exhibited reduced chemotaxis (*) and highly restricted production of ROI (*) compared to HD-PMN. Furthermore LD-PMN produced smaller amounts of IL-8 following stimulation than HD-PMN. Neither adhesion to endothelial cells nor chemotaxis nor production of ROI were significantly impaired by the developed isolation procedure, which was of fundamental importance for the functional analysis of LD-PMN.

The most interesting result of this dissertation is the suppressive effect of LD-PMN on *in vitro* induced proliferation of autologous T-cells, which was observed for the first time, while HD-PMN had no comparable effect. Taken together, in this dissertation immature immunosuppressive neutrophils were identified for the first time in peripheral blood of patients with urological tumors, non-Hodgkin lymphoma, pleural, mamma and lung carcinoma. The demonstrated suppression of T-cells by LD-PMN argues for the consideration of immature immunosuppressive neutrophils in the blood of cancer patients while immunotherapeutical treatment of tumors.

Keywords: immature neutrophils, myeloid suppressor, tumor

1 Einleitung

Neutrophile Granulozyten stellen die größte Population der Leukozyten im peripheren Blut des Menschen dar. Sie erfüllen entscheidende Funktionen bei der Abwehr von Infektionen durch Bakterien und Pilze. Darüber hinaus werden neutrophilen Granulozyten (Neutrophilen) zunehmend auch Funktionen bei der Immunantwort gegen Tumore zugeschrieben¹. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung von Tumor-assoziierten Neutrophilen aus dem peripheren Blut von Malignom-Patienten. Zum besseren Verständnis ihrer Rolle beim inflammatorischen Wachstum von Tumoren wird im Folgenden zunächst die Entwicklung von Neutrophilen im Knochenmark gesunder Individuen genauer beschrieben.

1.1 Granulopoese

Die Entwicklung neutrophiler Granulozyten (Granulopoese) unterscheidet sich deutlich von anderen Leukozyten. Den gemeinsamen Ursprung aller Leukozyten bilden pluripotente hämatopoetische Stammzellen. Aus diesen differenzieren im Knochenmark lymphoide und myeloide Stammzellen unter Kontrolle von Wachstumsfaktoren (Abb. 1.1). Lymphoide Stammzellen entwickeln sich weiter zu T- und B-Zellen. Myeloide Stammzellen differenzieren unter anderem zu Monozyten sowie neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten. Neutrophile und Monozyten teilen dabei zunächst noch eine gemeinsame, weiterdifferenzierte, intermediäre Vorläuferzelle, die Granulozyten/Monozyten-Kolonie bildende Einheit (*granulocyte/monocyte-colony forming unit*, GM-CFU) genannt wird. Wachstumsfaktoren wie Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (*granulocyte-colony stimulating factor*, G-CSF) bzw. Monozyten-Kolonie stimulierender Faktor (M-CSF) induzieren die differentielle Weiterentwicklung zu Myeloblasten bzw. Monoblasten. Aus Monoblasten bilden sich Promonozyten, die sich zu Monozyten entwickeln.

Myeloblasten differenzieren zu Promyelozyten, diese weiter zu Myelozyten und über die darauf folgenden Metamyelozyten entstehen stabkernige Neutrophile (Abb. 1.1). Diese stellen die letzte unreife Form der Neutrophilen dar und können im peripheren Blut gesunder Spender bis zu 5 % aller Neutrophilen ausmachen. Alle Differenzierungsstadien der Neutrophilen lassen sich sowohl morphologisch als auch anhand der Expression spezifischer Moleküle auf der Zelloberfläche unterscheiden². Während der beschriebenen Reifung der Neutrophilen findet spezifisch für jedes Entwicklungsstadium die Biogenese der verschiedenen Granula statt³. Sukzessiv entwickeln sich so auch die funktionellen Eigenschaften der Neutrophilen.

Nach ihrer Differenzierung im Knochenmark sind Neutrophile vollständig ausgereift und werden ins periphere Blut ausgeschüttet. Im Gegensatz dazu können beispielsweise Monozyten nach Einwanderung in Gewebe weiter zu Makrophagen reifen.

Im folgenden Abschnitt werden die immunologischen Funktionen der Neutrophilen dargestellt.

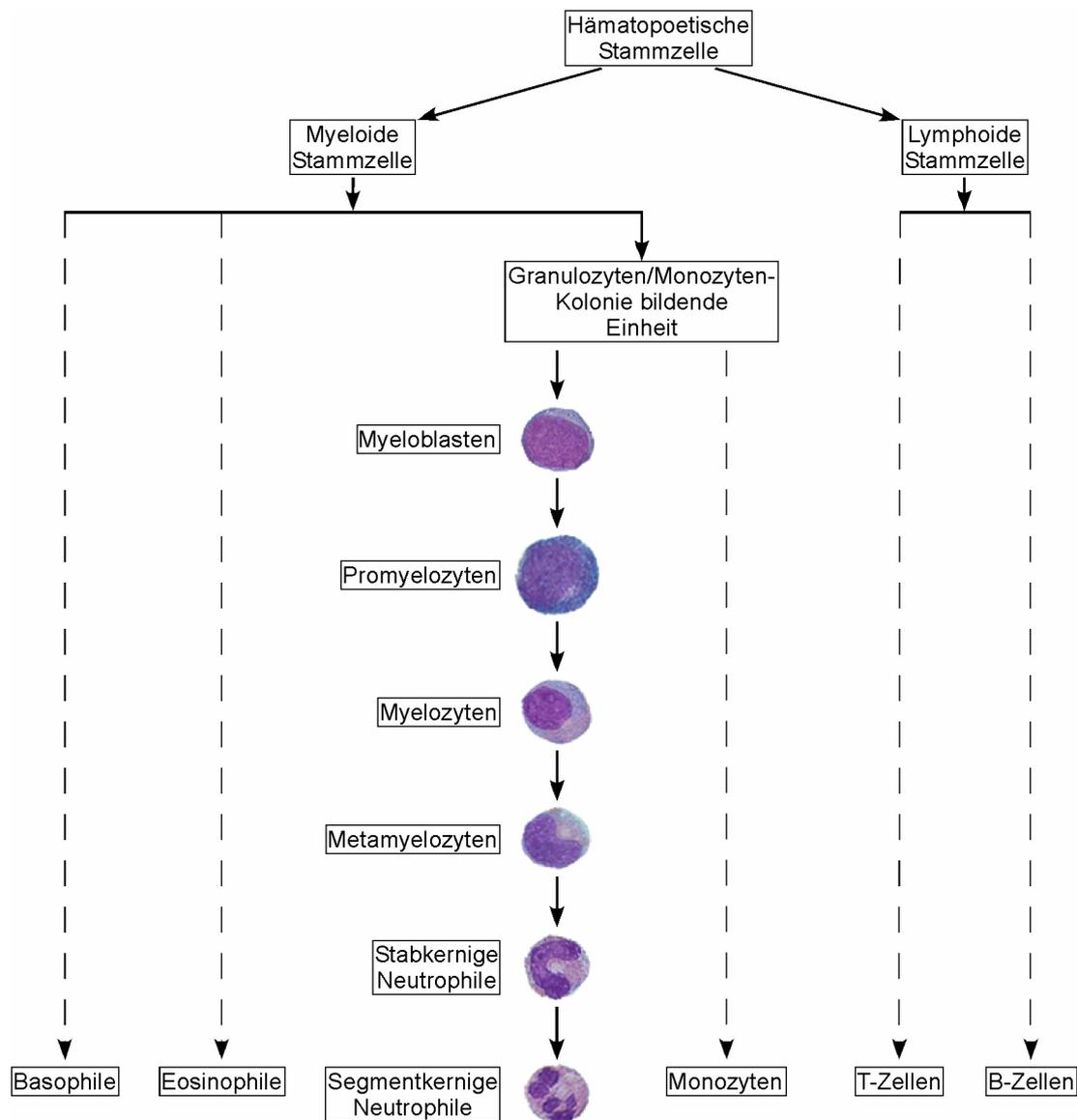


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Hämatopoese (verkürzt) mit Schwerpunkt auf der neutrophilen Granulopoese.

1.2 Immunologische Funktionen der Neutrophilen

Neutrophile werden aufgrund ihrer funktionellen Eigenschaften dem angeborenen Immunsystem zugeordnet. Angeborene Immunität beruht auf der Erkennung konservierter Strukturen von Pathogenen durch keimbahnkodierte Mustererkennungs-Rezeptoren.

Zur Bekämpfung von bakteriellen Pathogenen und Pilzen werden Neutrophile als erste Zellen aus dem peripheren Blut ins infizierte Gewebe rekrutiert. Bevor Neutrophile ins Gewebe migrieren, adhären sie aus dem Blutstrom ans Endothel. Dazu lösen Entzündungsmediatoren aus dem Gewebe die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen aus, die an den Entzündungsort grenzen. Zu diesen endothelialen Adhäsionsmolekülen gehören Kohlenhydrate genauso wie kohlenhydratbindende Proteine (Selektine). Aus schwacher Bindung der Selektine und Kohlenhydrate auf der Zelloberfläche der Neutrophilen ans Endothel resultiert das Rollen der Neutrophilen entlang des Endothels⁴. Auf das Rollen folgt feste Adhäsion, die hauptsächlich auf

Interaktion mit dem interzellulären Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) der Endothelzellen beruht⁵. Endothelzellen produzieren ebenfalls viele Chemokine wie beispielsweise Interleukin-8 (IL-8), welches das bedeutendste Chemokin für Neutrophile ist^{6,7}. Richtungsspezifische Migration von Neutrophilen können neben Chemokinen auch bakterielle Peptide wie z.B. N-Formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin (fMLP) induzieren⁸.

Entlang der Gradienten aus gelösten Chemotaxinen (Chemotaxis) oder immobilisierten Gradienten (Haptotaxis) migrieren Neutrophile durch die extrazelluläre Matrix und das Gewebe zum Infektionsort, wo sie Pathogene direkt an Membranstrukturen wie Lipopolysaccharid (LPS) oder formylierten Peptiden erkennen. Des Weiteren exprimieren Neutrophile auf ihrer Zelloberfläche Komplementrezeptoren und Rezeptoren, die die konstante Region von Antikörpern binden (Fc-Rezeptoren, FcR). Mit diesen beiden Rezeptorklassen können Neutrophile opsonierte (mit Komplement oder Antikörpern beladene) Pathogene erkennen. Das Repertoire der Neutrophilen zur Bekämpfung von Bakterien und Pilzen umfasst unter anderem die Freisetzung eines breiten Spektrums antimikrobieller Peptide⁹ und reaktiver Sauerstoff-Intermediate (ROI)¹⁰. Bis zu einer gewissen Größe nehmen Neutrophile Pathogene auch durch Phagozytose auf, um sie nach Verschmelzen des Phagosoms mit lysosomalen Granula intrazellulär durch ROI und antimikrobielle Peptide zu töten.

Neben diesen Effektorfunktionen weisen Neutrophile auch wichtige immunregulatorische Funktionen auf¹¹. Von Neutrophilen freigesetzte Chemokine wie z.B. MIP-1 α (Makrophagen inflammatorisches Protein-1 α , CCL3)¹², MIP-1 β (CCL4)¹³ und MCP-1 (Monozyten chemotaktisches Protein-1, CCL2)¹⁴ sind an der Rekrutierung von mononukleären Zellen beteiligt. Von Neutrophilen sezernierte Defensine sind antimikrobielle Peptide und parallel Chemotaxine für unreife dendritische Zellen und T-Zellen¹⁵⁻¹⁷. Die Freisetzung von IL-12 aus Neutrophilen¹⁸ kann zur Differenzierung von naiven T-Zellen z.B. zu zytotoxischen T-Zellen und zur Stimulation von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) beitragen¹⁹, während das aus aktivierten Neutrophilen freigesetzte IL-8^{20,21} die Rekrutierung weiterer Neutrophiler induziert und ihre Apoptose verzögert. Auf diese Weise akkumulieren Neutrophile zu einem frühen Zeitpunkt an Entzündungsorten, wo sie durch direkte bakterizide und fungizide Funktionen Pathogene abtöten und sekundäre Immunmechanismen aufgrund ihrer frühen Rekrutierung einleiten können¹¹.

Bevor nun die Rolle von Neutrophilen bei der Tumor-assoziierten Inflammation dargestellt wird, fasst der folgende Abschnitt kurz die Progression von Tumoren als entzündlichen Prozess mit Augenmerk auf T-Zellen zusammen.

1.3 Tumorwachstum als entzündlicher Prozess

1863 entdeckte Rudolf Virchow Leukozyten in neoplastischem Gewebe und stellte damit eine Verbindung zwischen Entzündung und Tumoren her. Klinische Experimente von William Coley am Ende des 19. Jahrhunderts und die Arbeiten von Prehn und Main²² demonstrierten die Existenz von Immunantworten gegen Tumorantigene, die möglicherweise zur Behandlung von Tumorerkrankungen genutzt werden können. Jedoch zeigte sich, dass Tumorzellen einer Immunantwort ausweichen können, was ihnen weitere Proliferation und Metastasierung erlaubt²³. Mechanismen, mit denen sich Tumorzellen dem Immunsystem entziehen sind Gegenstand der

aktuellen Forschung. Mögliche Erklärungen reichen von der Unfähigkeit des Immunsystems, Tumorantigene zu erkennen (Tumorignoranz), bis zur graduellen Reduktion der Immunantwort durch progressives Wachstum von Tumoren.

North und Kollegen fanden in Tiermodellen während der ersten Tage nach Tumorimplantation eine initiale, protektive T-Zell-Antwort, die aber nach weiteren Tagen schnell abnahm, was auf Immunsuppression in Assoziation mit progressivem Wachstum von Tumoren hinwies²⁴⁻²⁷. Diesen Verdacht bestätigend weisen frisch isolierte Tumor-infiltrierende Lymphozyten *in vitro* deutlich reduzierte Proliferation nach Stimulation mit Mitogenen auf^{28;29}. Diese Fehlfunktion wurde ebenso bei T-Zellen des peripheren Blutes von Tumor-tragenden Mäusen beobachtet²³. Eine Ursache für die beschriebene Fehlfunktion von T-Zellen wurde der Induktion von Apoptose in Tumor-infiltrierenden und zirkulierenden T-Zellen zugewiesen^{30;31}. Mizoguchi et al. demonstrierten reduzierte Expression der CD3 ζ -Kette und essentieller Tyrosinkinasen als Erklärung für die Fehlfunktion von T-Zellen in Tumor-tragenden Mäusen³². Verminderte Expression der CD3 ζ -Kette und eingeschränkte Proliferation wurde ebenfalls bei T-Zellen von Patienten mit verschiedensten Tumoren nachgewiesen³³⁻³⁹. Als Ursache werden z.B. ROI aus Makrophagen erwogen, die eine Reduktion der Expression der CD3 ζ -Kette^{40;41} induzieren.

Welche Rolle Neutrophile und die von ihnen freigesetzten ROI in der Tumor-assoziierten Inflammation spielen, wird in den nächsten beiden Abschnitten dargestellt.

1.4 Dichotome Rolle von Neutrophilen bei inflammatorischem Tumorwachstum

Tumore bestehen aus Tumor-, Endothel- und Stromazellen, sowie infiltrierenden Leukozyten, die zum großen Teil dem angeborenen Immunsystem zugeordnet werden⁴². Neutrophile kommen als größte Population des angeborenen Immunsystems sowohl in humanen als auch in tierischen Tumoren vor. Sie weisen ihre aus Infektionen bekannten Effektorfunktionen und immunregulatorischen Funktionen auch bei Entzündungen von Tumoren auf. Doch die Rolle der Neutrophilen innerhalb der Immunologie von Tumoren stellt sich als dichotom dar. Neutrophilen wurde einerseits die Produktion von Faktoren zur Unterstützung der Progression von Tumoren nachgewiesen⁴³⁻⁴⁵. Andererseits werden Tumor-infiltrierende Neutrophile in einigen Fällen mit Tumorregression assoziiert^{46;47}.

In Mäusen mit IL-8 gentransfiziertem, subkutanen Tumor werden hauptsächlich Neutrophile in den Tumor rekrutiert, was mit erniedrigter Tumorgenität verbunden ist⁴⁶. Assoziation von Neutrophilen mit Tumorregression wurde ebenfalls in Mäusen mit G-CSF gentransfiziertem Tumor beobachtet⁴⁷. Intratumorale Rekrutierung von Neutrophilen führte dabei zu verstärkter Einwanderung von T-Zellen. Der antitumorale Charakter der Effektor- und immunregulatorischen Funktionen von Neutrophilen spiegelt sich auch in ihrer Produktion von Defensinen wider. Neutrophile Defensine weisen sowohl chemotaktische Wirkung auf T-Zellen und unreife dendritische Zellen auf¹⁵⁻¹⁷, als auch direkte Toxizität für Tumorzellen⁴⁸. Zytotoxizität von Neutrophilen gegenüber Tumoren wird nach Bindung an Tumorzellen über Integrine auch durch Freisetzen von hypochloriger Säure (HOCl) vermittelt⁴⁹. Des Weiteren sezernieren und

exprimieren Neutrophile auf der Zelloberfläche Tumornekrosefaktor verwandten Apoptose induzierenden Liganden (*tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*, TRAIL)⁵⁰. TRAIL induziert Apoptose in vielen Arten von Tumorzellen, während die meisten gesunden Zellen resistent dagegen sind^{51;52}.

Im Gegensatz zu diesen antitumoralen Eigenschaften fördern Neutrophile auch Tumorstadium und Progression^{53;54}. Abhängig vom Zytokinmilieu produzieren Tumor-assoziierte Neutrophile tumorale Wachstumsfaktoren^{43;44} und angiogenetische Faktoren⁴⁵. ROI aus Neutrophilen weisen direkt genotoxisches Potential auf^{55;56} und können Immunsuppression verursachen⁵⁷. Immunsuppression in Verbindung mit Neutrophilen wird kurz im folgenden Abschnitt beschrieben.

1.5 Immunsuppressive Zellen myeloiden Ursprungs

Fehlfunktionen der T-Zellen von Tumorpatienten wurden bereits in 1.3 beschrieben. Als Ursache für supprimierte T-Zellen werden von Immunologen unter anderem immunsuppressive Zellen myeloiden Ursprungs beschrieben. In Tumorpatienten und Tumor-tragenden Mäusen ist die Progression von Tumoren oft mit veränderter Hämatopoese assoziiert, was zur Akkumulation von myeloiden Zellen führt⁵⁸.

Potentielle Vorläuferzellen der Neutrophilen wurden in verschiedenen Modellen mit Tumor-tragenden Mäusen als unreife myeloide Suppressorzellen identifiziert^{59;60}. Sie wurden im peripheren Blut, in der Milz und in den Tumoren nachgewiesen und inhibieren die Aktivierung von T-Zellen.

Auch in Tumorpatienten wurden unreife myeloide Suppressorzellen im peripheren Blut^{61;62} und in Tumoren⁶³ nachgewiesen. Ihr genauer Phänotyp ist in Tumorpatienten jedoch unklar⁶⁴. Die Beschreibungen reichen von unreifen Makrophagen⁶¹, dendritischen Zellen^{61;62}, Monozyten⁶³, Promonozyten⁶² bis zu unreifen Neutrophilen⁶². Ebenso ungeklärt ist der Mechanismus der Suppression von T-Zellen durch unreife myeloide Zellen.

1.6 Fragestellung und Ziele der vorliegenden Arbeit

Neutrophile besitzen Funktionen zum Abtöten von Bakterien und Pilzen, werden bei Infektion als Erste ins Gewebe rekrutiert und stellen deshalb wichtige Effektorzellen des angeborenen Immunsystems dar (1.2). Darüber hinaus unterstützen sie den weiteren Verlauf von Immunantworten durch Rekrutierung und Aktivierung anderer Leukozyten.

Die Rolle von Neutrophilen bei dem inflammatorischen Wachstum von Tumoren stellt sich jedoch als zwiespältig da (1.4). So wurden Neutrophilen sowohl antitumorale als auch Tumor-unterstützende Funktionen zugewiesen⁴³⁻⁴⁷. Des Weiteren wurden potentielle Vorläuferzellen von Neutrophilen eindeutig als immunsuppressive Zellen identifiziert^{59;60;62}.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Tumor-assoziierte Neutrophile im peripheren Blut von Malignom-Patienten zu identifizieren und zu charakterisieren. Schmielau und Finn⁶⁵ beschrieben 2001 in ihrer Arbeit Granulozyten mit verringerter physikalischer Dichte, die im Blut von Tumorpatienten und nicht im Blut gesunder Spender vorkommen. Um die Frage nach dem Phänotyp und der Funktion dieser Granulozyten mit verringerter Dichte zu beantworten, sollten sie in der vorliegenden Arbeit immunphänotypisch charakterisiert werden. Des Weiteren sollte ein

Protokoll zu ihrer hochreinen Isolierung entwickelt werden, um sie danach in wichtigen immunologischen Funktionen analysieren zu können. Als Vergleich dienten die Granulozyten der Tumorpatienten mit regulärer Dichte.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

2.1.1 Patientenkollektiv

In Kooperation mit der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck wurden Blutproben von Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen des Urogenital- und Gastrointestinaltrakts erhalten. Für die entsprechenden Untersuchungen liegt unter dem Zeichen #02-137 ein positives Votum der zuständigen Ethikkommission der Medizinischen Universität zu Lübeck vor.

Aus der Klinik des Forschungszentrums Borstel wurden Blutproben von Patienten mit Tumorerkrankungen der Lunge und des Brustraums erhalten. Für die entsprechenden Untersuchungen liegt unter dem Zeichen #06-002 ein positives Votum der zuständigen Ethikkommission der Medizinischen Universität zu Lübeck vor.

Kurative oder palliative Bestrahlungen, Chemotherapien oder operative Interventionen waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme noch nicht durchgeführt worden. Des Weiteren konnten zum Entnahmezeitpunkt begleitende systemische Infektionserkrankungen aufgrund klinischer Parameter ausgeschlossen werden.

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien und Lösungen

Bezeichnung	Bezugsquelle
Aqua dest.	Braun (Melsungen)
BSA	PAA (Pasching, Österreich)
CFSE	Molecular Probes (invitrogen, Karlsruhe)
EDTA	Serva (Heidelberg)
DMSO	Sigma-Aldrich (München)
FCS, inaktiviert bei 56°C, sterilfiltriert	Linar is (Bettlingen)
Gemcitabine	Lilly (Gießen)
Giemsa-Lösung	Fluka (Buchs, Schweiz)
HBSS	Gibco (Eggenstein)
Luminol	Boehringer (Mannheim)
Lymphozyten-Separationsmedium (Ficoll)	PAA (Pasching, Österreich)
May/Grünwald-Lösung	Merck (Darmstadt)
$\text{Na}_2[^{51}\text{Cr}]\text{O}_4$	Hartmann-Analytik (Braunschweig)
para-Formaldehyd	Fluka (Buchs, Schweiz)
Penicillin/Streptomycin-Lsg.	PAA (Pasching, Österreich)
Percoll	Pharmacia Amersham Biotech (Freiburg)
PVA	Merck (Darmstadt)
RPMI 1640	PAA (Pasching, Österreich)

Salze u.a. Bestandteile für Lösungen	Merck, Fluka oder Serva
Tris	Fluka (Buchs, Schweiz)
Triton -X- 100	Fluka (Buchs, Schweiz)

2.2.2 Puffer und Kulturmedien

Kulturmedium Rxx10:	RPMI 1640, 1 % Penicillin/Streptomycin-Lsg. (v/v), 10 % FCS (v/v)
Chemilumineszenz-Medium:	RPMI 1640 ohne Phenolrot, 50 mM HEPES, pH 7,4 (Biochrom, Berlin)
10x PBS:	9 mM CaCl ₂ ; 5 mM MgCl ₂ ; 27 mM KCl; 1,4 M NaCl; 15 mM KH ₂ PO ₄ ; 81 mM NaH ₂ PO ₄ lösen in aqua dest.
1x MACS-Puffer:	1x PBS, 0,5% (w/v) BSA, 2 mM EDTA; pH 7,2
1x Azid-PBS:	3 mM NaN ₃ , 121,5 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, 1,5 mM KH ₂ PO ₄ lösen in aqua dest.; pH 7,4
Humanserum:	Humanserum wurde aus Vollblut gesunder Spender der Blutgruppe AB gewonnen und vor Verwendung für 30 min bei 56°C inaktiviert, danach sterilfiltriert und bei -20°C gelagert. Zur Verfügung gestellt vom Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin UKSH, Universität zu Lübeck

10x PBS, 1x Azid-PBS und das Zellkulturmedium Rxx10 wurde überwiegend von den Technischen Angestellten Gabriele Steller und Kirsten Bruderek der Laborgruppe Immuntherapie bereitgestellt.

2.2.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie

In der folgenden Tabelle 2.1.4 sind die verwendeten monoklonalen Antikörper zur durchflusszytometrischen Charakterisierung von Oberflächenmolekülen auf PMN und deren Hersteller aufgelistet.

Tab. 2.2.3: Antikörper für die durchflusszytometrische Charakterisierung von Oberflächenmolekülen auf PMN

Spezifität	Klon	Isotyp	konjugiertes Fluorochrom	Hersteller
CD11b	2LPM19c	mIgG1	PE	Dako
CD14	18D11	mIgG1	PE	Dianova
CD15	80H5	IgM	PE	Immunotech
CD16	DJ130c	mIgG1	PE	Dako
CD66b	80H3	mIgG1	FITC	Immunotech
CD80	MAB104	mIgG1	PE	Immunotech
CD83	HB15e	mIgG1	PE	Pharmingen
CD86	FUN-1	mIgG1	PE	Pharmingen
MHC I	W6/32	mIgG2a	PE	DAKO
MHC II	I3-RD1	mIgG2a	PE	BeckmanCoulter
Isotyp	DAK-GO2	mIgG1	FITC	DAKO
Isotyp	DAK-GO3	mIgG1	PE	DAKO
Isotyp	DAK-GO5	mIgG2a	PE	DAKO

2.2.4 Antikörper zur Stimulation von T-Zellen

In der folgenden Tabelle 2.2.4 sind die verwendeten Antikörper zur Stimulation von T-Zellen und deren Hersteller aufgelistet.

Tab. 2.2.4: Antikörper zur Stimulation von T-Zellen

Spezifität	Klon	Isotyp	konjugiertes Fluorochrom	Hersteller
CD3	X35	mIgG2a	-	Immunotech
CD28	CD28.2	mIgG1	-	Immunotech
Ziege anti Maus-Ig	-	F(ab') ₂	-	DAKO

2.2.5 Substanzen zur Isolierung von PMN mittels MACS

anti CD14-Beads	Miltenyi Biotec (Berg.-Gladbach)
anti CD15-Beads	Miltenyi Biotec (Berg.-Gladbach)
Antikörper gegen CD66b	Immunotech (Hamburg)
Ziege anti Maus-IgG-Beads	Miltenyi Biotec (Berg.-Gladbach)
humanes IgG Fc-Fragment	Acris (Hiddenhausen)

2.2.6 Stimuli

Die verwendeten Substanzen zur Stimulation von PMN sind nachfolgend aufgelistet.

fMLP	Sigma-Aldrich (München)
natives hPF-4 (Endotoxinfrei)	Natives humanes PF-4 wurde von PD Dr. F. Petersen (Forschungszentrum Borstel) nach der durch Petersen <i>et al.</i> ⁶⁶ beschriebenen Methode aus Thrombozytenkonzentraten isoliert
logBCG	<i>Mycobacterium bovis BCG</i> (Stamm Connaught, WTC) wurde in der logarithmischen Wachstumsphase verwendet. Die Bakterienzahl (CFU/ml) wurde unmittelbar vor Verwendung anhand der optischen Dichte bei 600 nm errechnet.
Latexpartikel (1,1 µm Durchmesser)	Sigma-Aldrich (München)
LPS (<i>Salmonella minnesota</i>)	Prof. Dr. K. Brandenburg (Forschungszentrum Borstel)
Zymosan	Sigma-Aldrich (München)

2.2.7 Instrumente und Geräte

FACS Calibur	Becton Dickinson (Heidelberg)
γ-Counter LB 2111	Berthold Detection Systems (Wildbad)
Luminometer	Berthold Detection Systems (Wildbad)
MiniMACS™ Separator	Miltenyi Biotec (Berg.-Gladbach)
Phasenkontrast-Mikroskop	Zeiss (Jena)
Photometer Ultrospec 1000	Pharmacia Amersham Biotech (Freiburg)

QuadroMACS™ Separator	Miltenyi Biotec (Berg.-Gladbach)
Zellcounter CASY TT	Schärfe (Reutlingen)
Zentrifugen	Hettich (Tuttlingen)

2.2.8 Sonstiges

Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I	Pharmingen (Heidelberg)
IL-8 ELISA Set	Pharmingen (Heidelberg)
Kulturplatten	NUNC (Wiesbaden)
Kulturröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
MACS-Säulen	Miltenyi Biotec (Berg.-Gladbach)
Polystyrolröhrchen für Luminometer	Abimed (Düsseldorf)
Transwells+Platten	Corning (New York, USA)

2.3 Zellbiologische Methoden

Die Isolierung und funktionelle Untersuchung von Leukozyten erfordert Sterilität bei jedem Arbeitsschritt, was im Rahmen dieser Arbeit volle Berücksichtigung fand. Dies ist hier exemplarisch für alle folgenden Methoden erwähnt.

2.3.1 Dichtegradientenzentrifugation von peripherem Blut

Die Separation von peripherem Blut erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation nach Boyum et al.⁶⁷.

Dazu wurde humanes Vollblut im Verhältnis 5:1 mit 3,8 %iger (w/v) Natrium-Citrat-Lösung versetzt und 2:1 mit 37°C warmem PBS verdünnt. Anschließend wurden jeweils 35 ml des verdünnten Blutes auf 15 ml Lymphozyten-Separationsmedium (Ficoll; 37°C) in 50 ml Sarstedt-Röhrchen geschichtet. Die Zentrifugation erfolgte für 35 min bei 400 x g und Raumtemperatur mit 2 min Anlaufzeit und ohne Bremse.

Drei Dichtegradientenzentrifugationen wurden von den Technischen Angestellten Gabriele Steller und Kirsten Bruderek der Laborgruppe Immuntherapie durchgeführt.

2.3.2 Isolierung von MNC aus peripherem Blut nach Dichtegradientenzentrifugation

Nach Dichtegradientenzentrifugation peripheren Blutes (2.2.1) stellte sich die Trennung der Leukozyten wie in Abb.3.1 dar.

Der leukozytenfreie Plasmaüberstand wurde abgesaugt und die auf dem Separationsmedium sedimentierten MNC mit einer Pasteurpipette entnommen. Darauf folgte das Waschen der MNC mit 40 ml PBS (10 min, 400 x g, 4°C). Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellsediment, ausgehend von 50 ml Blut, in 10 ml eiskaltem PBS resuspendiert und die Zellzahl der MNC bestimmt, indem 5 µl der Zellsuspension in 5 ml Zählflüssigkeit (Schärfe, Reutlingen) gegeben, dann gemischt und mit einem Zellcounter (CASY TT; Schärfe, Reutlingen) analysiert wurden. Dieses Gerät nutzt Widerstandsmessung zur elektronischen Pulsflächenanalyse, wodurch die Größe einzelner Zellen bestimmt und anhand eines definierten Größenintervalls die Zahl gewisser Zellen ermittelt werden kann. Diese Quantifizierungsmethode wurde in Rahmen dieser Arbeit für

alle Leukozyten verwendet. Vor dem zweiten Waschen mit 40 ml eiskaltem PBS (10 min, 400 x g, 4°C) wurden Aliquots von je 10^6 MNC zur durchflusszytometrischen Analyse in jeweils 1 ml eiskaltes Azid-PBS gegeben. Nach dem zweiten Waschen der MNC wurde der Überstand abgesaugt und das Zellsediment zur Separation mittels MACS in 80 µl eiskaltem MACS-Puffer pro 10^7 MNC resuspendiert. Zur weiteren Separation mittels diskontinuierlichem Dichtegradienten wurden die MNC stattdessen in 2 ml Rxx10 resuspendiert.

2.3.3 Isolierung von PMN durch Lyse der Erythrozyten

Während der gesamten Isolierung von neutrophilen Granulozyten (*polymorphonuclear leukocytes*, PMN) durch Lyse der Erythrozyten (HD-PMN ely) nach Dichtegradientenzentrifugation (2.3.1) wurden übermäßig starkes Resuspendieren und Temperaturen unterhalb der Raumtemperatur vermieden, um die Zellphysiologie der HD-PMN ely nicht unnötig zu beeinflussen⁶⁸.

Nach der Dichtegradientenzentrifugation und dem Entfernen des Plasmaüberstands sowie der MNC (2.3.2) wurde weiter ca. die Hälfte des Separationsmediums abgesaugt. Die Granulozyten-reiche obere Schicht des "Erythrozyten-Sediments" wurde dann mit einer Pasteurpipette abgesaugt, mit dem doppelten Volumen PVA-Lösung (RT) versetzt und durch Invertieren des Röhrchens homogenisiert. Nach 30 min Sedimentation des Erythrozyten/PMN Gemischs (1 x g, RT) wurde der Erythrozyten-depletierte Überstand mit einer Pipette abgesaugt und mit demselben Volumen PBS (RT) vermischt. Nach 10 min Zentrifugation (275 x g, 3 min Anlaufzeit bzw. Bremszeit, RT) wurde der Überstand abgesaugt und das Sediment für 10 Sekunden mit 1 ml aqua dest. (RT) resuspendiert, um restliche Erythrozyten zu lysieren. Danach wurden sofort 1 ml 2xPBS (doppelt-osmolare PBS) und 40 ml PBS zugesetzt und erneut 10 min (275 x g, 3 min Anlaufzeit bzw. Bremszeit, RT) zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die sedimentierten Granulozyten je nach Verwendungszweck im erforderlichen Puffer resuspendiert. Die Zellkonzentration wurde mit Hilfe eines Zellcounters, wie in 2.3.2 beschrieben, bestimmt. Zweimal wurden HD-PMN (ely) von Gabriele Steller isoliert und häufig mit Hilfe von Yvonne Eckstein (Technische Assistentin bzw. Auszubildende der Laborgruppe Immuntherapie).

2.3.4 Separation von MNC mittels diskontinuierlichem Dichtegradienten

MNC wurden in Anlehnung an die Arbeit von Fluks et al.⁶⁹ durch diskontinuierliche Dichtegradienten weiter separiert.

Dazu wurden 9 ml Percoll mit 1 ml 10xPBS versetzt und homogenisiert. Aliquots dieser Percoll-Lösung wurden nach folgendem Schema mit Rxx10 verdünnt:

1,875 ml Percoll-Lsg. + 0,625 ml Rxx10 ≡ **75 % Percoll-Lsg.**

1,750 ml Percoll-Lsg. + 0,750 ml Rxx10 ≡ **70 %**

1,625 ml Percoll-Lsg. + 0,875 ml Rxx10 ≡ **65 %**

1,500 ml Percoll-Lsg. + 1,000 ml Rxx10 ≡ **60 %**

1,375 ml Percoll-Lsg. + 1,125 ml Rxx10 ≡ **55 %**

1,250 ml Percoll-Lsg. + 1,250 ml Rxx10 ≡ **50 %**

Jeweils 2 ml der Verdünnungen von Percoll-Lsg. wurden, wie in Abb.3.4.1 dargestellt, mit einer 5 ml Pipette in einem 15 ml Sarstedt-Röhrchen langsam übereinander geschichtet. Auf diesen Gradienten wurden maximal $100 \cdot 10^6$ MNC in 2 ml Rxx10 gegeben. Nach 25 min Zentrifugation ($275 \times g$, RT, 5 min Anlaufzeit, ohne Bremse) wurden von allen Interphasen, mit Orientierung an der Skalierung des Röhrchens, Zellen mit Pasteurpipetten abgesaugt.

2.3.5 Positive Selektion von LD-PMN mittels MACS mit anti CD15-Beads

Zur Isolierung von LD-PMN aus MNC von Tumorpatienten wurde unter anderem MACS mit anti CD15-Beads genutzt, was bereits erfolgreich von Zahler et al.⁷⁰ verwendet wurde, um PMN aus peripherem Blut gesunder Spender zu isolieren.

MNC lagen nach Isolierung aus Dichtegradienten (2.3.2) mit einer Konzentration von $12,5 \cdot 10^7$ /ml in MACS-Puffer vor. Zuerst wurden $0,1 \mu\text{g}$ humanes IgG Fc-Fragment pro 10^7 MNC zur Blockierung der unspezifischen Bindung des nachfolgenden Antikörpers in die Zellsuspension gegeben. Nach dem Mischen wurden $20 \mu\text{l}$ anti CD15-Beads pro 10^7 MNC dazugegeben. Im Anschluss wurde erneut gemischt und 15 min inkubiert ($6^\circ\text{--}12^\circ\text{C}$). Danach wurde der Ansatz zum Waschen mit dem 20fachen Volumen eiskaltem MACS-Puffer aufgefüllt und 10 min ($400 \times g$, 4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment in $500 \mu\text{l}$ eiskaltem MACS-Puffer resuspendiert (bis zu 10^8 MNC in $500 \mu\text{l}$, größere Zellmengen in entsprechend größerem Volumen).

Die komplette Zellsuspension wurde anschließend auf eine equilibrierte LS-Säule (Miltenyi, Bergisch-Gladbach) gegeben, die sich im Magnetfeld eines MACS-Separators (Miltenyi, Bergisch-Gladbach) befand. Nach Einlaufen der Zellsuspension in die Matrix der Säule wurde dreimal mit jeweils höchstens 4 ml MACS-Puffer gewaschen. Dann wurde die Säule mit den zurückgehaltenen Zellen aus dem Magnetfeld entfernt und 5 ml MACS-Puffer auf die Säule gegeben. Mit Hilfe eines Stempels (Miltenyi, Bergisch-Gladbach) wurden die Zellen dann auf eine nächste equilibrierte, sich im Magnetfeld befindende MS-Säule (Miltenyi, Bergisch-Gladbach) eluiert. Nach Einlaufen der Zellsuspension in die Matrix der Säule wurde dreimal mit jeweils höchstens 2 ml MACS-Puffer gewaschen. Die in dieser Säule zurückgehaltenen Zellen wurden danach außerhalb des Magnetfeldes mit 1 ml MACS-Puffer und Stempel eluiert.

2.3.6 Positive Selektion von LD-PMN mittels MACS mit Antikörper gegen CD66b

Zur Isolierung von LD-PMN aus MNC von Tumorpatienten wurde unter anderem aus der Maus stammender Antikörper gegen CD66b genutzt. Um diesen Antikörper zur Isolierung mittels MACS verwenden zu können, wurden Ziege anti Maus-IgG-Beads eingesetzt. Die aus der Ziege stammenden Antikörper dieser Beads binden an Antikörper der Immunglobulin-Klasse G aus Mäusen, so dass mit Antikörper gegen CD66b opsonierte Zellen im Rahmen dieser Arbeit sekundär magnetisch markiert werden konnten.

MNC lagen nach Isolierung aus Dichtegradienten (2.3.2) mit einer Konzentration von $12,5 \cdot 10^7$ /ml in MACS-Puffer vor. Zuerst wurde die Zellkonzentration mit eiskaltem MACS-Puffer auf $30 \cdot 10^6$ /ml eingestellt und $1 \mu\text{g}$ humanes IgG Fc-Fragment pro $30 \cdot 10^6$ MNC zur Blockierung der unspezifischen Bindung des nachfolgenden Antikörpers in die Zellsuspension gegeben. Nach

Mischen wurde 1 µg Antikörper gegen CD66b pro $30 \cdot 10^6$ MNC dazugegeben. Im Anschluss wurde erneut gemischt und 15 min inkubiert ($6^\circ\text{--}12^\circ\text{C}$). Danach wurde der Ansatz zum Waschen mit dem 20-fachen Volumen eiskaltem MACS-Puffer aufgefüllt und 10 min ($400 \times g$, 4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment in 80 µl eiskaltem MACS-Puffer pro 10^7 MNC resuspendiert.

20 µl Ziege anti Maus-IgG-Beads pro 10^7 MNC wurden in die Zellsuspension gegeben, dann gemischt und 15 min inkubiert ($6^\circ\text{--}12^\circ\text{C}$). Danach wurde der Ansatz zum Waschen mit dem 20-fachen Volumen eiskaltem MACS-Puffer aufgefüllt und 10 min ($400 \times g$, 4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment in 500 µl eiskaltem MACS-Puffer resuspendiert (bis zu 10^8 MNC in 500 µl, größere Zellmengen in entsprechend größerem Volumen). Im Anschluss erfolgte die Separation der MNC zur Isolierung von LD-PMN wie unter 2.3.5 beschrieben.

2.3.7 Isolierung von hochreinen LD-PMN und gleich behandelter HD-PMN

Zur Isolierung hochreiner LD-PMN aus MNC von Tumorpatienten war die Depletion der Monozyten vor positiver Selektion der LD-PMN notwendig (3.4.2, 3.4.3). Mit Hilfe von anti CD14-Beads können Monozyten selektiv magnetisch markiert und depletiert werden⁷¹.

MNC lagen nach Isolierung aus Dichtegradienten (2.3.2) mit einer Konzentration von $12,5 \cdot 10^7/\text{ml}$ in MACS-Puffer vor. Zuerst wurden 0,1 µg humanes IgG Fc-Fragment pro 10^7 MNC zur Blockierung der unspezifischen Bindung des nachfolgenden Antikörpers in die Zellsuspension gegeben. Nach dem Mischen wurden 20 µl anti CD14-Beads pro 10^7 MNC dazugegeben. Im Anschluss wurde erneut gemischt und 15 min inkubiert ($6^\circ\text{--}12^\circ\text{C}$). Danach wurde der Ansatz zum Waschen mit dem 20-fachen Volumen eiskaltem MACS-Puffer aufgefüllt und 10 min ($400 \times g$, 4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment in 500 µl eiskaltem MACS-Puffer resuspendiert (bis zu 10^8 MNC in 500 µl, größere Zellmengen in entsprechend größerem Volumen).

Die komplette Zellsuspension wurde anschließend auf eine equilibrierte MS-Säule gegeben, die sich im Magnetfeld eines MACS-Separators befand. Nach Einlaufen der Zellsuspension in die Matrix der Säule wurde dreimal mit jeweils 0,75 ml MACS-Puffer gewaschen. Der Durchfluss und die Waschfraktionen, welche Lymphozyten und LD-PMN enthielten, wurden aufgefangen, die Zahl der Zellen bestimmt (2.3.2) und danach die Zellkonzentration durch Zentrifugation (10 min, $400 \times g$, 4°C) und Resuspendieren in eiskaltem MACS-Puffer auf $30 \cdot 10^6/\text{ml}$ eingestellt.

Zur Isolierung gleich behandelter HD-PMN (HD-PMN MACS) wurde nach dem Verdünnen des Überstandes mit PBS, im Anschluss an die Sedimentation der Erythrozyten (2.3.3) die Zellkonzentration bestimmt. Die Zellkonzentration eines Aliquots wurde nach Zentrifugation (10 min, $400 \times g$, 4°C) mit eiskaltem MACS-Puffer auf $30 \cdot 10^6/\text{ml}$ eingestellt. Danach wurde dieses Aliquot zur Isolierung von HD-PMN MACS genauso behandelt, wie im Weiteren die Isolierung von hochreinen LD-PMN beschrieben ist. Aufgrund der Reinheit der HD-PMN (ca. 98 %) vor positiver Selektion mit Antikörper gegen CD66b war eine Depletion von Monozyten nicht nötig.

In die Zellsuspensionen der LD- und HD-PMN wurde jeweils 1 µg humanes IgG Fc-Fragment pro $30 \cdot 10^6$ Zellen gegeben und nach Mischen 1 µg Antikörper gegen CD66b pro $30 \cdot 10^6$ Zellen

zugemischt. Im Anschluss wurde erneut gemischt und 15 min inkubiert (6°-12°C). Danach wurde jeder Ansatz zum Waschen mit dem 20fachen Volumen eiskaltem MACS-Puffer aufgefüllt und 10 min (400 x g, 4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils abgesaugt und das Zellsediment in 80 µl eiskaltem MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen resuspendiert.

20 µl Ziege anti Maus-IgG-Beads pro 10⁷ MNC wurden in jede Zellsuspension gegeben, dann gemischt und 15 min inkubiert (6°-12°C). Danach wurde jeder Ansatz zum Waschen mit dem 20fachen Volumen eiskaltem MACS-Puffer aufgefüllt und 10 min (400 x g, 4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils abgesaugt und das Zellsediment in 500 µl eiskaltem MACS-Puffer resuspendiert (bis zu 10⁸ Zellen in 500 µl, größere Zellmengen in entsprechend größerem Volumen).

Die komplette Zellsuspension der Lymphozyten und LD-PMN bzw. HD-PMN wurde anschließend auf eine equilibrierte MS-Säule gegeben, die sich im Magnetfeld eines MACS-Separators befand. Nach Einlaufen der Zellsuspension in die Matrix der Säule wurde dreimal mit jeweils 2 ml MACS-Puffer gewaschen. Dann wurde die Säule mit den zurückgehaltenen Zellen aus dem Magnetfeld entfernt und 1 ml MACS-Puffer auf die Säule gegeben. Mit Hilfe eines Stempels wurden die Zellen dann auf eine zweite, equilibrierte, sich im Magnetfeld befindende MS-Säule eluiert. Nach Einlaufen der Zellsuspension in die Matrix der Säule wurde wieder dreimal mit jeweils 2 ml MACS-Puffer gewaschen. Die in dieser Säule zurückgehaltenen Zellen wurden danach außerhalb des Magnetfeldes mit 1 ml MACS-Puffer und Stempel eluiert.

Zur Isolierung von HD-PMN MACS war die Verwendung einer MS-Säule ausreichend, da ihre Reinheit bereits vor der positiven Selektion mit Antikörper gegen CD66b ca. 98 % betrug.

LD-PMN und HD-PMN (MACS) von ca. 20 Tumorpatienten wurden mit Hilfe von Yvonne Eckstein (Auszubildende der Laborgruppe Immuntherapie) isoliert.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Immunfluoreszenzfärbung für die Durchflusszytometrie

Um PMN aus Tumorpatienten immunphänotypisch zu charakterisieren, wurde die Expression von 10 verschiedenen Molekülen auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch analysiert.

Dazu lagen nach Isolierung Aliquots von 10⁶ MNC bzw. 0,3-10⁶ HD-PMN in jeweils 1 ml Azid-PBS in Kunststoffröhrchen (Falcon Tubes; Becton Dickinson, Heidelberg) vor. Nach Zentrifugation (10 min, 400 x g, 4°C) wurde das Zellsediment in 100 µl Azid-PBS mit 3 % Humanserum (v/v) resuspendiert, FITC- oder PE-konjugierte monoklonale Antikörper hinzugegeben und nach dem Mischen für 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit 1 ml Azid-PBS gewaschen und nach Zentrifugation (10 min, 400 x g, 4°C) das Zellsediment in 150 µl Azid-PBS resuspendiert. Zur abschließenden Fixierung der markierten Zellen wurde das gleiche Volumen 3 %iges para-Formaldehyd (v/v) unter Schütteln hinzugegeben und der Ansatz innerhalb von fünf Tagen in einem Durchflusszytometer (FACS Calibur; Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert. Die Spezifität der Bindung der monoklonalen Antikörper wurde im Vergleich zu unspezifischen Isotypen-Kontrollantikörpern als Negativkontrolle überprüft. Die Analyse und Quantifizierung der

Expression von Molekülen auf der Zelloberfläche erfolgte mit Hilfe der WinMDI 2.8 Software (J. Trotter; Scripps Institute, USA).

Zahlreiche Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit Hilfe von Yvonne Eckstein und Christyn Wildgrube, Auszubildenden der Laborgruppe Immuntherapie, durchgeführt.

2.4.2 Bestimmung der Viabilität durch Färbung mit Annexin V-PE und 7-AAD

Zu einem frühen Zeitpunkt während der Apoptose von Zellen wird das Membranphospholipid Phosphatidylserin (PS) von der Innenseite der Plasmamembran an die Außenseite transloziert, so dass PS extrazellulär exprimiert wird. Annexin V stellt ein Phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität für PS dar⁷². Auf diese Weise geht fortschreitende Apoptose mit gesteigerter Bindung von Annexin V einher. Zellen mit weit fortgeschrittener Apoptose, sowie tote Zellen weisen neben dem Verlust der Integrität ihrer Plasmamembran auch eine Fragmentierung ihrer DNA auf. Dadurch können Vitalfarbstoffe wie 7-AAD in die DNA interkalieren und bei Anregung fluoreszieren, so dass Zellen mit weit fortgeschrittener Apoptose und tote Zellen nachweisbar sind.

Zum Nachweis von apoptotischen bzw. toten Zellen wurde das „Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I“ von BD Pharmingen (Heidelberg) nach Herstellerangaben verwendet. Als Referenz für tote PMN dienten Gemcitabine (0,1 μM in Rxx10) behandelte (2 h, 37°C, 5 % CO_2) HD-PMN ($2 \cdot 10^6$ pro ml).

Zwei Viabilitätsbestimmungen wurden mit Hilfe der Technischen Assistentin Gabriele Steller aus der Laborgruppe Immuntherapie durchgeführt.

2.4.3 Panoptische Färbung von Zytospinpräparaten nach Pappenheim

Zur mikroskopischen Unterscheidung eosinophiler, basophiler und neutrophiler Granulozyten, sowie der Stadien ihrer Vorläuferzellen wurden Zytospinpräparate von LD- und HD-PMN hergestellt und nach Pappenheim gefärbt. Diese Färbung basiert auf der Affinität verschiedener basischer und saurer Farbstoffe für Makromoleküle der Zelle. Durch Besonderheiten in der Morphologie bezüglich der Form des Zellkerns, des Volumenverhältnisses zwischen Kern und Zytoplasma, sowie der Granularität können Subpopulationen der Granulozyten und ihre Vorläuferzellen identifiziert werden.

Zur Herstellung von Zytospinpräparaten wurden jeweils $0,1 \cdot 10^6$ PMN in 200 μl eiskaltem PBS mit 20 % FCS (v/v) bei $110 \times g$ für 7 min (RT) auf Objektträger zentrifugiert. Über Nacht wurden die Präparate bei RT getrocknet. Anschließend wurden die Präparate für 3 min mit May/Grünwald-Lsg. bedeckt, danach mit Aqua dest. gespült und für 3 min mit Aqua dest. bedeckt. Nach wiederholtem Spülen mit Aqua dest. wurde für 15 min mit Giemsa-Gebrauchslösung gefärbt. Zum Abschluss wurden die Präparate mit Aqua dest. gespült und an der Luft getrocknet.

Zur Analyse der HD- bzw. LD-PMN wurden jeweils pro Patient dreimal 100 Granulozyten gezählt und jeweils aus allen drei Zählergebnissen die Mittelwerte der Subpopulationen gebildet.

Die Färbungen nach Pappenheim wurden freundlicherweise in der Gruppe Immunzell-Analytik der Abteilung Immunologie und Zellbiologie des FZ Borstel durchgeführt.

2.4.4 Bestimmung der Konzentration von IL-8 mittels ELISA

Zur quantitativen Bestimmung der Konzentration von IL-8 in Kulturüberständen von HD- und LD-PMN wurde ein konventioneller ELISA (BD Pharmingen) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll, die Absorptionsmessung entwickelter ELISA wurde in einem ELX 800 Photometer (Biotek-Instruments; Winooski, USA) bei einer Wellenlänge von 450 nm mit Hilfe der Analysesoftware Mikrotek 2000 (Mikrotek; Overath) durchgeführt.

2.5 Experimente zur Funktion von PMN

2.5.1 Analyse der Adhäsion von PMN an Endothelzellen

Zur Analyse der Adhäsion von LD- und HD-PMN an Endothelzellen wurden HUVECs verwendet. Die Präparation und Kultivierung von HUVECs erfolgten nach Jaffe et al.⁷³ und Modifikationen nach Schönbeck et al.⁷⁴. Dabei wurden Endothelzellen aus der Vene humaner Nabelschnüre mittels Verdau durch Kollagenase mobilisiert und anschließend isoliert. Sowohl Präparation als auch Kultivierung der HUVECs wurden freundlicherweise in der LG Biochemische Immunologie des FZ Borstel durchgeführt. Die Nabelschnüre wurden von der Entbindungsstation des Kreiskrankenhauses Bad Segeberg zur Verfügung gestellt und in HBSS, supplementiert mit 50 µg/ml Heparin, bei 4°C bis zur Präparation (maximal 18 h) aufbewahrt.

Zur Bestimmung der Adhäsion von PMN an Endothelzellen wurden HUVECs 4 - 6 Tage in Flachboden-Mikrotiterplatten (Greiner, Frickenhausen) bis zur Konfluenz bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Unmittelbar vor dem Experiment wurde in jeder Vertiefung der Mikrotiterplatten die Zellschicht auf Konfluenz kontrolliert und dreimal mit warmem PBS (0.1 % BSA), supplementiert mit 0,9 mM CaCl₂ und 0,5 mM MgCl₂, gewaschen. In einer anderen, mit PBS (0,1 % BSA) vorbehandelten Rundboden-Mikrotiterplatte (1 h, 37°C) wurden pro Vertiefung 80 µl PBS (0,1 % BSA) vorgelegt, darin enthalten 8 µM PF4 (Endkonzentration 4 µM) zur Stimulation von HD-PMN in gewissen Ansätzen. Duplikate von jeweils 0,2·10⁶ PMN in 80 µl PBS (0,1 % BSA) mit 0,9 mM CaCl₂ und 0,5 mM MgCl₂ wurden dazugeben. Direkt im Anschluss wurden aus jeder Vertiefung 150 µl PMN entnommen, auf die vorbereiteten HUVECs gegeben und 25 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden nicht adhärenente PMN durch Zentrifugation (200 x g, RT, 1 min) im Winkel von 45° an eine Seite der Vertiefungen der Mikrotiterplatte sedimentiert und vorsichtig abgesaugt. Auf die adhärenenten PMN wurden 100 µl PBS (0,1 % BSA) gegeben und die Mikrotiterplatte 15 min auf Eis inkubiert. Aus jeder Vertiefung wurden nach dem Resuspendieren der Zellsuspension zweimal 40 µl zur Bestimmung der Zellzahl mit einem Zellcounter (2.2.2) entnommen. Aus den Mittelwerten dieser Doppelbestimmungen wurden die Mittelwerte innerhalb aller Duplikate gebildet und der Anteil adhärenenter PMN [%] in Relation zur Zahl der eingesetzten Zellen ermittelt.

2.5.2 Untersuchung der Chemotaxis von PMN

Zur Untersuchung der Chemotaxis von HD- und LD-PMN wurde ihre Migration durch eine Membran anhand radioaktiver Markierung der PMN gemessen.

Dazu wurden bis zu 10⁷ PMN in 200 µl Rxx10 mit 200 µCi Na₂[⁵¹Cr]O₄ (2 h, 37°C, 5 % CO₂) inkubiert. Danach wurden die PMN zweimal mit jeweils 10 ml RPMI gewaschen (275 x g, 3 min

Anlaufzeit bzw. Bremszeit, RT), in 350 µl Rxx10 resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (2.2.2). 100 µl der markierten LD-PMN wurden in 400 µl Rxx10, vorgelegt in eine Vertiefung einer 24er Transwell-Platte (Corning, New York), gegeben. Dieser Ansatz repräsentierte die maximal mögliche Zahl migrierter Zellen (maximale Migration). In eine weitere Vertiefung wurden 500 µl Rxx10 vorgelegt, ein Membraneinsatz mit Poren von 5 µm Durchmesser eingesetzt und 100 µl markierte LD-PMN in den Membraneinsatz gegeben. Dieser Ansatz diente der Quantifizierung spontan migrierter Zellen (spontane Migration). In eine dritte Vertiefung wurden 500 µl Monozyten-konditioniertes Medium bzw. Rxx10 mit 10 nM fMLP vorgelegt, ebenso ein Membraneinsatz mit Poren von 5 µm Durchmesser eingesetzt und 100 µl markierte LD-PMN in den Membraneinsatz gegeben. Dieser Ansatz diente der Quantifizierung migrierter Zellen bei Verwendung von Chemotaxinen (induzierte Migration). Es wurden, je nach vorliegender Zahl von LD-PMN, zwischen $20 \cdot 10^3$ und $500 \cdot 10^3$ PMN pro Ansatz eingesetzt, wobei die Zahl der eingesetzten HD-PMN der Zahl eingesetzter LD-PMN angepasst wurde.

Nach 1 h Inkubation (37°C, 5 % CO₂) wurden alle Membraneinsätze vorsichtig entfernt, wobei der Boden der Einsätze am Rand der Vertiefungen abgestrichen wurde, um das Medium in den Vertiefungen nicht unnötig zu reduzieren. Danach wurden 500 µl 0,1 % Triton X-100-Lsg. in die Vertiefungen gegeben und resuspendiert, um migrierte PMN zu lysieren, und danach Aliquots von 500 µl zur Analyse im γ-Counter (Berthold Detection Systems, Wildbad) entnommen.

Die so ermittelten Strahlungswerte der maximalen Migration wurden 100 % gleichgesetzt. In Relation dazu wurden anhand der jeweiligen Strahlungswerte die spontane und induzierte Migration [%] bestimmt. Die Stärke der durch Chemotaxine induzierten Migration wurde durch den Chemotaktischen Index dargestellt, welcher dem Faktor der Vervielfachung von spontaner Migration durch Chemotaxine entspricht und nach folgender Formel berechnet wurde.

$$\text{Chemotaktischer Index} = \frac{\text{Induzierte Migration [\%]}}{\text{Spontane Migration [\%]}}$$

Monozyten-konditioniertes Medium wurde hergestellt, indem 10^6 Monozyten pro ml mit 10 ng/ml LPS in Rxx10 stimuliert wurden (24h, 37°C, 5 % CO₂). Danach wurde der Kulturüberstand entnommen und zentrifugiert (400 x g, 4°C). Der zellfreie Überstand nach Zentrifugation wurde steril filtriert und anschließend bei -20°C gelagert.

Sowohl die Herstellung des Monozyten-konditionierten Mediums, als auch eine Untersuchung der Chemotaxis wurden von der Technischen Assistentin Gabriele Steller aus der Laborgruppe Immuntherapie durchgeführt.

2.5.3 Analyse der Produktion von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten (ROI)

Produktion von ROI wurde durch Quantifizierung von Chemilumineszenz analysiert. Chemilumineszenz beschreibt die Freisetzung von Licht bei chemischen Reaktionen, wie z.B. bei Oxidation von hier eingesetztem Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazindion) durch sezernierte ROI aus PMN. Die Zahl der entstehenden Photonen ist dabei proportional zur Menge der sezernierten ROI.

Chemilumineszenz wurde mit einem Luminometer (Biolumat LB 9505, Berthold, Wildbad) im Spektralbereich von 475 – 620 nm detektiert. Vor Messbeginn wurden die Ansätze mit $0,2 \cdot 10^6$ PMN in 300 μ l Chemilumineszenz-Medium zur Adaptation an das Medium 1 h (37°C , 5 % CO_2) inkubiert. Dann wurde jeder Ansatz mit 10 μ l Luminol-Lsg. (Stammlsg. 2 mg/ml) versetzt und weitere 10 min inkubiert. Danach begann die Bestimmung der konstitutiven Chemilumineszenz (15 min). Darauf folgte die Zugabe von fMLP (Endkonzentration 100 nM) und Messung der Chemilumineszenz über 15 min. Im Anschluss wurde erneut die konstitutive Chemilumineszenz derselben Ansätze gemessen (15 min). Als zweiter Stimulus wurden dann in dieselben Ansätze 10 μ l Zymosan (Stammlsg. 50 mg/ml) oder 2,5 μ l Latexpartikel (Latexp. : PMN = 10 : 1) gegeben. Die auf diese Weise bestimmte Chemilumineszenz wurde in relativen Lichteinheiten (RLU) angegeben.

Die Messungen mittels Luminometer wurden von Dr. Martin Ernst, Leiter der Gruppe Immunzell-Analytik aus der Abteilung Immunologie und Zellbiologie am FZ Borstel, durchgeführt.

2.5.4 Kultur und Stimulation von PMN

Zur Untersuchung der konstitutiven sowie stimulierten Produktion von IL-8 wurden LD- und HD-PMN (MACS) nach hochreiner Isolierung (2.3.7) mit einer Konzentration von $10^6/\text{ml}$ in Rxx10 kultiviert. In parallelen Ansätzen erfolgte die Kultivierung über 24 h ohne Stimulus bzw. mit 100 ng/ml LPS oder 10^6 Kolonie bildenden Einheiten BCG pro ml (Multiplizität der Infektion = 1).

2.5.5 Analyse des Einflusses von PMN auf die Proliferation von T-Zellen

Die Proliferation von T-Zellen wurde nach Fleischer et al.⁷⁵ durch quervernetzte Antikörper gegen CD3 und CD28 in An- und Abwesenheit von LD-PMN bzw. HD-PMN (MACS) induziert, um den Einfluss der PMN zu untersuchen. Ermittelt wurde die Proliferation durchflusszytometrisch anhand der abnehmenden Fluoreszenz des intrazellulären Farbstoffes CFSE, mit dem die T-Zellen zu Beginn markiert wurden. CFSE diffundiert passiv in Zellen und liegt nicht fluoreszierend vor, bis die Acetat-Gruppen durch intrazelluläre Esterasen entfernt worden sind (Abb 2.5.5). Der so entstandene, stark fluoreszierende Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester stellt sich Amin-reaktiv dar und bildet fluoreszierende Konjugate mit Proteinen. Diese verbleiben intrazellulär, werden nicht an angrenzende Zellen weitergegeben, aber bei Zellteilung unter Tochterzellen genau aufgeteilt, so dass jede Tochtergeneration halb soviel Fluoreszenz wie die Elterngeneration aufweist^{76,77}.

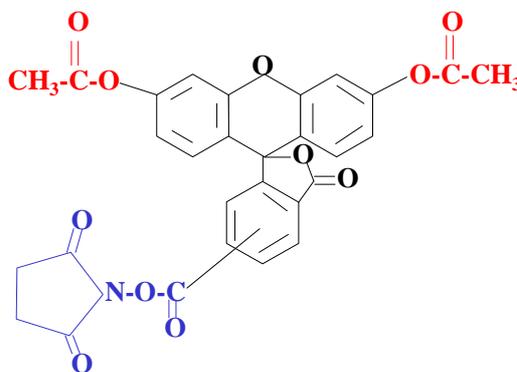


Abb. 2.5.5: Struktur von Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE)

Zur intrazellulären Markierung mit CFSE wurden nach Depletion der Monozyten aus MNC von Tumorpatienten (2.3.7) die Lymphozyten und LD-PMN 5 min bei 37°C (Wasserbad) in RPMI inkubiert ($20 \cdot 10^6$ Zellen pro ml). Parallel wurde RPMI mit 10 µM CFSE ebenfalls 5 min bei 37°C (Wasserbad) inkubiert. Dann wurde die CFSE-Lösung im Verhältnis 1:1 (v/v) zur Zellsuspension gegeben, gründlich gemischt und nochmals 5 min bei 37°C (Wasserbad) inkubiert, während parallel FCS auf 37°C erwärmt wurde. Danach wurde die mit CFSE versetzte Zellsuspension im Verhältnis 1:1 (v/v) gründlich mit FCS gemischt und mit Rxx10 auf das siebenfache Volumen aufgefüllt. Nach Zentrifugation (400 x g, 10 min, RT) wurde der Überstand abgesaugt und das Zellsediment in Rxx10 resuspendiert. Ein Aliquot der mit CFSE markierten Lymphozyten und LD-PMN wurde entnommen und nach erneutem Waschen mit Rxx10 zur Induktion von Proliferation in Gegenwart von LD-PMN verwendet. Die restlichen mit CFSE markierten Lymphozyten und LD-PMN wurden nach zweitem Waschen mit Rxx10 im entsprechenden Volumen MACS-Puffer resuspendiert, um die LD-PMN zu depletieren (2.3.7).

Ein Aliquot der so isolierten, mit CFSE markierten Lymphozyten ohne LD-PMN wurde mit HD-PMN (MACS) versetzt (Anteil der HD-PMN MACS = 5 – 50 %).

Auf diese Weise lagen folgende drei Ansätze vor:

- a) Lymphozyten
- b) Lymphozyten + LD-PMN
- c) Lymphozyten + HD-PMN (MACS)

Zur Induktion von Proliferation wurden 30 µl einer Lösung mit Antikörper gegen CD3 (1 µg/ml in PBS) in die Vertiefungen einer Flachboden-Mikrotiterplatte (Nunc, Wiesbaden) gegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Waschen der Mikrotiterplatte mit PBS wurden jeweils Triplikate von jedem der drei oben genannten Ansätze mit jeweils $0,2 \cdot 10^6$ Lymphozyten und Antikörper gegen CD28 (Endkonzentration = 1 µg/ml) in 200 µl Rxx10 auf die Vertiefungen verteilt. Lymphozyten und LD-PMN lassen sich mit der unter 2.3.2 genannten Methoden (Zellcounter) selektiv quantifizieren. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden in jede Vertiefung 10 µl Ziege anti Maus-Ig Antikörper (Endkonzentration = 1 µg/ml) zur Quervernetzung der Antikörper gegen CD3 und CD28 gegeben. Anschließend wurden die Ansätze über 7 Tage bei 37°C (5 % CO₂) kultiviert, dann Zellen nach Resuspendieren entnommen und durchflusszytometrisch analysiert.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden Granulozyten (*polymorphonuclear leukocytes*, PMN) aus dem peripheren Blut unbehandelter Tumorpatienten untersucht. Es konnten dabei PMN mit verringerter physikalischer Dichte (*Low Density PMN*, LD-PMN) nachgewiesen werden. Diese wurden immunphänotypisch charakterisiert und ein Protokoll zu ihrer hochreinen Isolierung entwickelt. Dadurch waren LD-PMN auch funktionellen Analysen zugänglich.

3.1 Identifizierung von LD-PMN im peripheren Blut von Tumorpatienten

PMN mit geringerer physikalischer Dichte können in typischen Dichtegradienten genauso wie mononukleäre Zellen (MNC) oberhalb des Separationsmediums sedimentieren, obwohl Dichtegradienten traditionell zur Trennung von MNC und PMN genutzt werden. So sedimentieren PMN von gesunden Spendern aufgrund ihrer höheren physikalischen Dichte unterhalb des Separationsmediums, während MNC oberhalb verbleiben (Abb. 3.1A). Doch eine Subpopulation der PMN kosedimentiert mit den MNC, wenn peripheres Blut von unbehandelten Patienten mit Karzinom des Magens, des Darms oder der Brust separiert wird⁶⁵. Diese PMN besitzen also eine verringerte physikalische Dichte und werden in der vorliegenden Arbeit LD-PMN genannt (Abb. 3.1B). Die unterhalb des Separationsmediums sedimentierenden PMN der Tumorpatienten werden als HD-PMN (*High Density PMN*) bezeichnet.

Ausgangspunkt dieser Arbeit war der Nachweis von LD-PMN im ausgewählten Tumorpatientenkollektiv (2.1.1). Im Weiteren wird ein Grund für die geringere Dichte dargestellt.

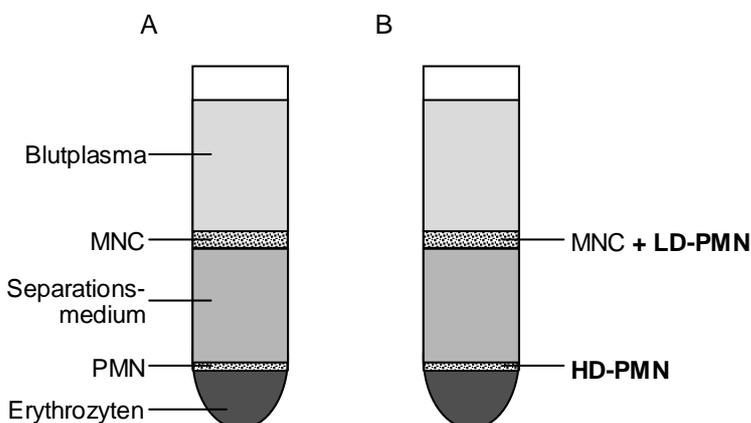


Abb. 3.1: Separation von peripherem Blut durch Dichtegradientenzentrifugation. Bei Auftrennung peripheren Blutes gesunder Spender (A) sedimentieren nur MNC oberhalb des Separationsmediums, während bei peripherem Blut von Tumorpatienten (B) LD-PMN mit den MNC kosedimentieren.

3.1.1 Nachweis von LD-PMN im peripheren Blut von Tumorpatienten

Für den Nachweis von LD-PMN wurden nach Dichtegradientenzentrifugation (2.2.1) die oberhalb des Separationsmediums sedimentierten Zellen isoliert. Wie bereits erwähnt, stellen sich diese Zellen üblicherweise als MNC dar, wenn peripheres Blut von gesunden Spendern separiert wird. Auch wenn im Gegensatz dazu bei peripherem Blut von Tumorpatienten polymorphkernige Zellen mit den MNC kosedimentieren, werden diese Zellen aus konventionellen Gründen in der vorliegenden Arbeit ebenfalls als MNC bezeichnet. Der Anteil der LD-PMN in den MNC wurde durch Immunfluoreszenzfärbung von CD66b und anschließende Analyse im Durchflusszytometer

bestimmt. CD66b ist ein Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankertes Membranprotein, das von PMN exprimiert wird und auf keiner anderen Leukozytenpopulation präsent ist⁷⁸.

LD-PMN wurden im peripheren Blut von allen ausgewählten 53 Patienten mit Lungenkarzinom, 37 Patienten mit urologischen Tumoren, einer Patientin mit Mammakarzinom, einer Patientin mit Non-Hodgkin-Lymphom und einem Patienten mit Pleurakarzinom nachgewiesen, während im Blut von gesunden Spendern keine LD-PMN identifiziert wurden (Abb. 3.1.1.1).

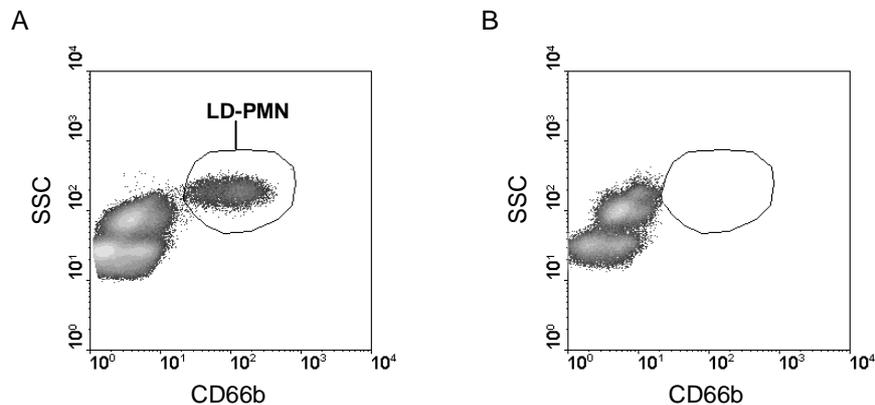


Abb. 3.1.1.1: Nachweis von LD-PMN in MNC von Tumorpacienten durch Immunfluoreszenzfärbung von CD66b. MNC von Tumorpacienten und von gesunden Spendern wurden nach Dichtegradientenzentrifugation isoliert (2.2.2), mit Fluorochrom-konjugiertem Antikörper gegen CD66b gefärbt (2.3.1) und im Durchflusszytometer analysiert. (A) Ergebnis eines repräsentativen Tumorpacienten mit 5 % CD66b-positiven Zellen (LD-PMN Region) in den MNC. (B) Ergebnis der MNC eines repräsentativen gesunden Spenders nach Immunfluoreszenzfärbung von CD66b. (Häufigkeitsdarstellung der im Durchflusszytometer gemessenen Ereignisse)

Der Anteil der LD-PMN in den untersuchten MNC von Tumorpacienten reichte von 0,03 bis 50,7%, während der Median 1 % betrug (Abb. 3.1.1.2).

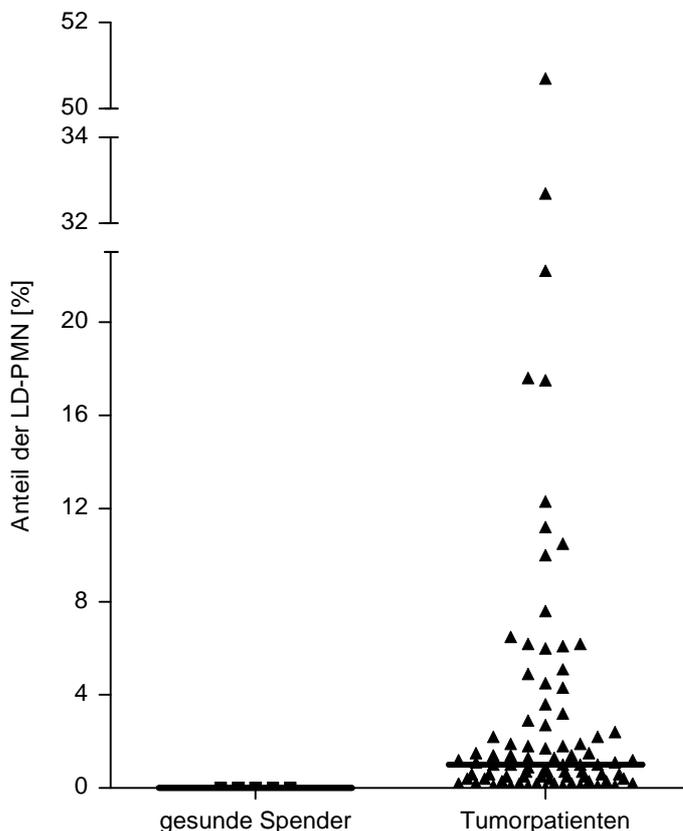


Abb. 3.1.1.2 Anteil der LD-PMN in den untersuchten MNC. MNC aus peripherem Blut von 5 gesunden Spendern und 85 Tumorpacienten wurden nach Dichtegradientenzentrifugation isoliert und mit Fluorochrom-konjugiertem Antikörper gegen CD66b gefärbt. Der Anteil der CD66b-positiven Zellen (LD-PMN) innerhalb der MNC wurde jeweils im Durchflusszytometer bestimmt. Abgebildet ist ein vertikales Streudiagramm mit dem Median (fett gedruckter Balken) des Anteils der LD-PMN.

Zur Validierung der verringerten physikalischen Dichte von LD-PMN wird im folgenden Abschnitt ein Grund für die unterschiedliche Dichte der LD- und HD-PMN gesucht.

3.1.2 Gesteigertes Zellvolumen stellt einen Grund für geringere Dichte der LD-PMN dar

Wenn Zellen eine geringere physikalische Dichte aufweisen, muss entweder ihr Gewicht vermindert oder ihr Volumen größer sein bzw. beide Parameter zusammen verändert.

Da im Durchflusszytometer die Vorwärts-Streuung (*forward scatter*, FSC) von fokussierten Lichtstrahlen durch Einzelzellen entlang der Achse des einfallenden Lichtes gemessen wird, ist der FSC-Wert proportional zur Zellgröße (Abb. 3.1.2.1).

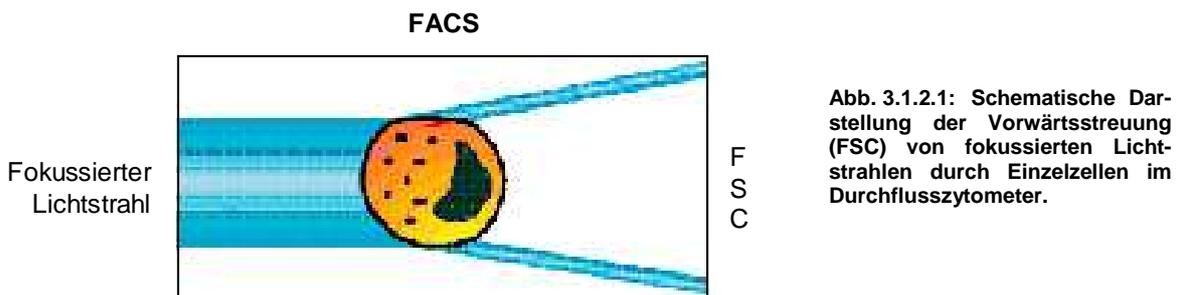


Abb. 3.1.2.1: Schematische Darstellung der Vorwärtsstreuung (FSC) von fokussierten Lichtstrahlen durch Einzelzellen im Durchflusszytometer.

Demnach kann der FSC-Wert zweier Zellen verglichen werden, um Unterschiede in ihrer Größe zu bestimmen.

Der Vergleich von HD- und LD-PMN aus 58 Tumorpatienten zeigt, dass LD-PMN einen signifikant (***) höheren FSC-Wert als HD-PMN aufwiesen (Abb. 3.1.2.2) und damit ein größeres Zellvolumen besaßen. Dieses Ergebnis stellt einen Grund für die geringere physikalische Dichte der LD-PMN dar. Die Masse von HD- und LD-PMN wurde nicht verglichen.

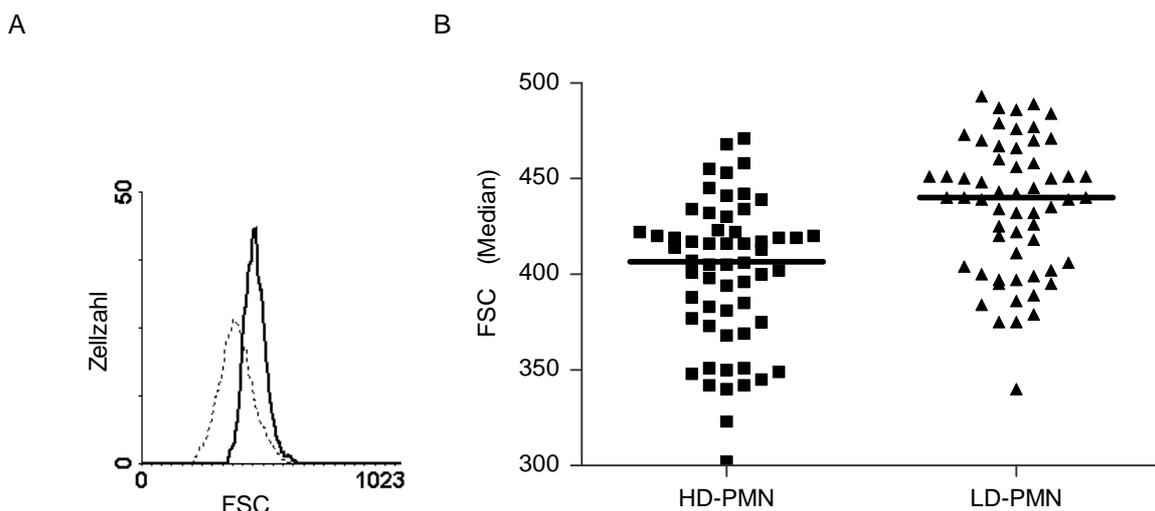


Abb. 3.1.2.2: Vergleich der Vorwärts-Streuung (FSC) von HD- und LD-PMN. MNC und HD-PMN von 58 Tumorpatienten wurden nach Dichtegradientenzentrifugation isoliert, mit Fluorochrom-konjugiertem Antikörper gegen CD66b gefärbt, im Durchflusszytometer analysiert und anschließend jeweils der Median des FSC der CD66b-positiven Zellen bestimmt. (A) Repräsentatives Histogramm mit Darstellung des FSC der HD-PMN (gepunktete Linie) und der LD-PMN (fett gedruckte Linie) desselben Tumorpatienten. (B) Verteilung der Medianwerte des FSC von HD- und LD-PMN aus 58 Tumorpatienten mit signifikant (***) höherem FSC der LD-PMN gegenüber den HD-PMN ($P < 0,0001$; Wilcoxon matched-pairs signed rank test). Abgebildet ist ein vertikales Streudiagramm mit dem Median (fett gedruckter Balken) jeweils aller FSC-Werte.

Zur genaueren Charakterisierung der LD-PMN folgt zunächst ihre phänotypische Analyse.

3.2 Immunphänotypische Charakterisierung der LD-PMN

Den Schwerpunkt der immunphänotypischen Untersuchungen bildeten extrazelluläre, Funktions-assoziierte Moleküle auf der Zelloberfläche der LD-PMN. Zu Beginn wurde die mit Aktivierung korrelierende^{79;80} Expression von CD66b analysiert. Darauf folgte die Untersuchung der Expressionen von CD11b, CD14, CD15, CD16, CD80, CD83, CD86, MHC Klasse I und II. Während CD15, auch Lewis X Antigen genannt, Bindung an das endotheliale Adhäsionsmolekül E-Selektin vermittelt⁸¹, ist CD11b durch Bindung an ICAM-1 ebenfalls an der Adhäsion beteiligt⁸². CD14 ist Teil des Rezeptorkomplexes zur Erkennung von Lipopolysaccharid (LPS)⁸³ und CD16 (auch Fc γ RIII) trägt als Rezeptor für die konstante Region von Antikörpern (Fc-Fragment) der Immunglobulin-Klasse G⁸⁴ zur Erkennung von Pathogenen bei. Dagegen spielen CD80, CD86 und MHC Klasse II eine essentielle Rolle im Antigen-Präsentationskomplex. CD83 stellt ein weiteres, wichtiges Glycoprotein auf Antigen-präsentierenden Zellen dar⁸⁵, während MHC Klasse I von allen kernhaltigen Zellen exprimiert wird.

3.2.1 LD-PMN unterscheiden sich von HD-PMN in der Expression Funktions-assoziiierter Moleküle

Mittels Immunfluoreszenzfärbung und Analyse im Durchflusszytometer wurde die Expressionsdichte von CD66b bestimmt. Der Vergleich der Δ Medianwerte (Differenz der Medianwerte der Fluoreszenzintensität von CD66b-markierten Zellen und mit dem Isotyp-Kontrollantikörper markierten Zellen) von HD- und LD-PMN aus 75 Tumorpatienten zeigt, dass CD66b signifikant (***) stärker von LD-PMN als von HD-PMN exprimiert wurde (Abb. 3.2.1.1).

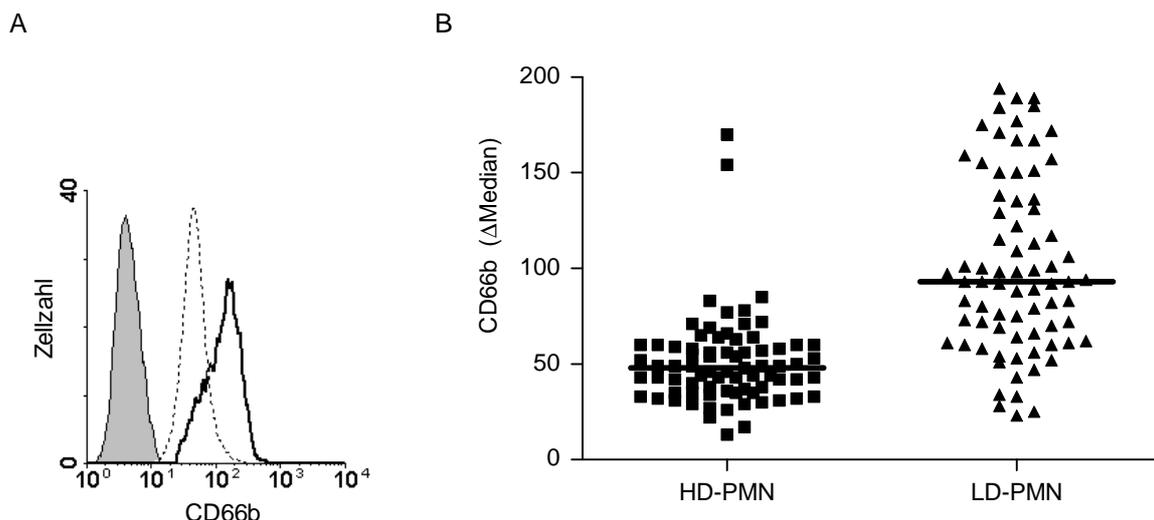


Abb. 3.2.1.1: Vergleich der Expression von CD66b auf HD- und LD-PMN. MNC und HD-PMN von Tumorpatienten wurden nach Dichtegradientenzentrifugation isoliert, mit Fluorochrom-konjugiertem Antikörper gegen CD66b bzw. Antikörper desselben Isotyps gefärbt, im Durchflusszytometer analysiert und anschließend jeweils der Δ Median der Expressionsdichte von CD66b bestimmt. (A) Repräsentatives Histogramm mit Darstellung der Expressionsdichte von CD66b auf HD-PMN (gepunktete Linie) und LD-PMN (fett gedruckte Linie) desselben Tumorpatienten (Isotypfärbung als grau gefülltes Histogramm). (B) Verteilung der Δ Medianwerte der Expressionsdichte von CD66b auf HD- und LD-PMN von 75 Tumorpatienten mit signifikant (***) stärkerer Expression auf LD-PMN ($P < 0,0001$; Wilcoxon matched-pairs signed rank test). Abgebildet ist ein vertikales Streudiagramm mit dem Median (fett gedruckter Balken) jeweils aller Werte.

Zur Bestimmung der Expressionsdichte von CD66b durch Immunfluoreszenzfärbung mussten HD-PMN und MNC lediglich aus dem in Abb. 3.1 beschriebenen Dichtegradienten isoliert werden (2.3.3; 2.3.2). Die Färbung der LD-PMN mit Fluorochrom-konjugiertem Antikörper gegen CD66b konnte ohne ihre weitere Isolierung aus den MNC durchgeführt werden, da der gegen CD66b gerichtete Antikörper nicht an andere Leukozytenpopulationen bindet⁷⁸. Aufgrund der höheren Seitwärtsstreuung (SSC) und Expression von CD66b konnten LD-PMN im Durchflusszytometer separat von Monozyten und Lymphozyten innerhalb der MNC analysiert werden (Abb. 3.1.1 A). Um die spezifische Bindung des Antikörpers von der Unspezifischen unterscheiden zu können, wurde jeweils parallel eine Färbung mit unspezifischem Antikörper desselben Isotyps durchgeführt (Isotypkontrolle). Die Färbungen mit unspezifischen Antikörpern aller verwendeten Immunglobulin-Klassen belegen, dass sich HD- und LD-PMN nicht signifikant in der Summe der Fluoreszenz aus unspezifischer Bindung von Antikörper und Autofluoreszenz unterschieden. Deshalb ist in den Histogrammen dieser Arbeit jeweils nur die Isotypkontrolle der HD-PMN abgebildet, die in größerer Zahl zur Verfügung standen.

Zur Untersuchung aller weiteren Oberflächenmoleküle waren Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit Antikörper gegen CD66b nötig, um LD-PMN sicher von Monozyten und Lymphozyten separieren zu können. Auf diese Weise wurde die Expression von CD15 analysiert. Der Vergleich der Δ Medianwerte von HD- und LD-PMN aus 48 Tumorpatienten zeigt, dass CD15 signifikant (***) stärker von LD-PMN als von HD-PMN exprimiert wurde (Abb. 3.2.1.2).

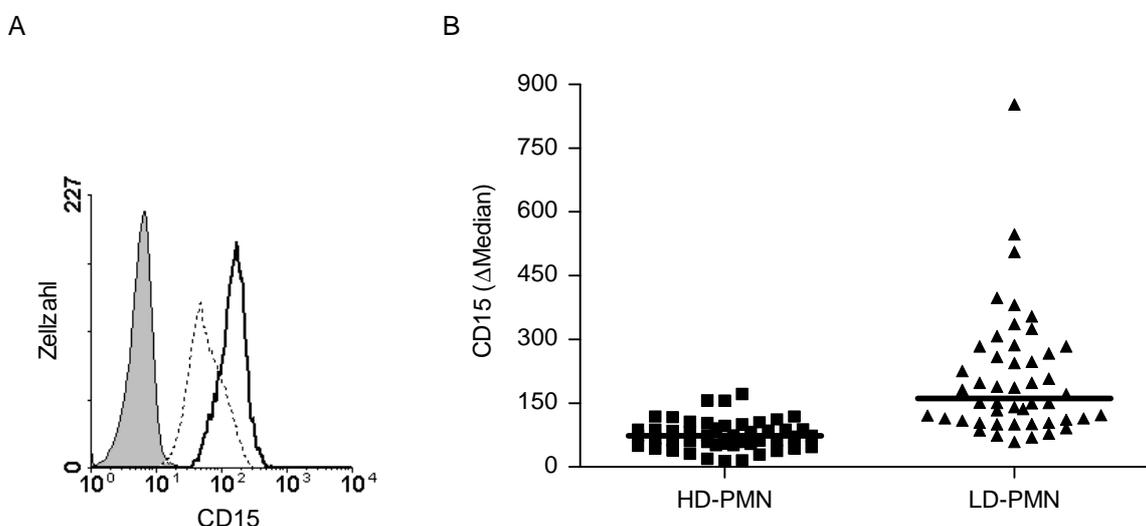


Abb. 3.2.1.2: Vergleich der Expression von CD15 auf HD- und LD-PMN. MNC und HD-PMN von Tumorpatienten wurden nach Dichtegradientenzentrifugation isoliert, mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen CD66b und CD15 bzw. Antikörper desselben Isotyps gefärbt, im Durchflusszytometer analysiert und anschließend jeweils der Δ Median der Expressionsdichte von CD15 auf CD66b-positiven Zellen bestimmt. (A) Repräsentatives Histogramm mit Darstellung der Expressionsdichte von CD15 auf HD-PMN (gepunktete Linie) und LD-PMN (fett gedruckte Linie) desselben Tumorpatienten (Isotypfärbung als grau gefülltes Histogramm). (B) Verteilung der Δ Medianwerte der Expressionsdichte von CD15 auf HD- und LD-PMN von 48 Tumorpatienten mit signifikant (***) stärkerer Expression auf LD-PMN ($P < 0,0001$; Wilcoxon matched-pairs signed rank test). Abgebildet ist ein vertikales Streudiagramm mit dem Median (fett gedruckter Balken) jeweils aller Werte.

Als nächstes wurde die Expression von CD80, CD83, CD86 und MHC Klasse II untersucht. Weder HD- noch LD-PMN von 4 Tumorpatienten exprimierten diese Moleküle (Abb. 3.2.1.3). Die Isotyp-Färbungen von HD- und LD-PMN in Abb. 3.2.1.3 bestätigen, dass sich beide Populationen

nicht signifikant in der Summe der Fluoreszenz aus unspezifischer Bindung von Antikörper und Autofluoreszenz unterschieden.

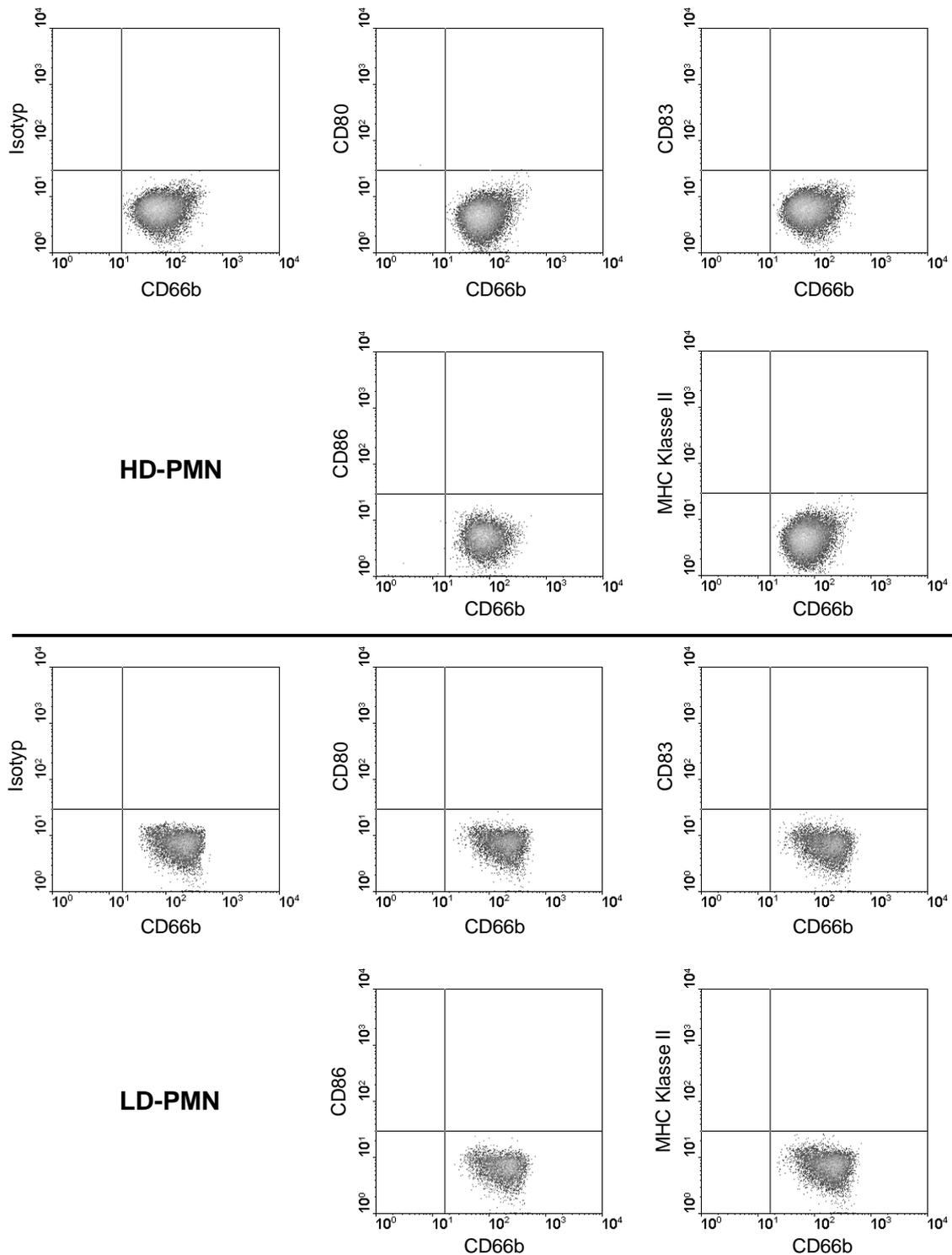


Abb. 3.2.1.3: Untersuchung der Expression von CD80, CD83, CD86 und MHC Klasse II auf HD- und LD-PMN. MNC und HD-PMN von 4 Tumorpatienten wurden nach Dichtegradientenzentrifugation isoliert, mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen CD66b und CD80 bzw. CD83, CD86, MHC Klasse II gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Zur Kontrolle der unspezifischen Bindung von Antikörper ist jeweils eine Färbung mit Antikörper desselben Isotyps abgebildet. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse der HD- und LD-PMN eines Tumorpatienten. Abgebildet sind Häufigkeitsdarstellungen der im Durchflusszytometer gemessenen Ereignisse.

Die folgende vergleichende Analyse der Expression von CD11b auf HD- und LD-PMN aus 15 Tumorpatienten zeigt, dass CD11b minimal, aber signifikant (*) schwächer von LD-PMN exprimiert wurde (Abb. 3.2.1.4).

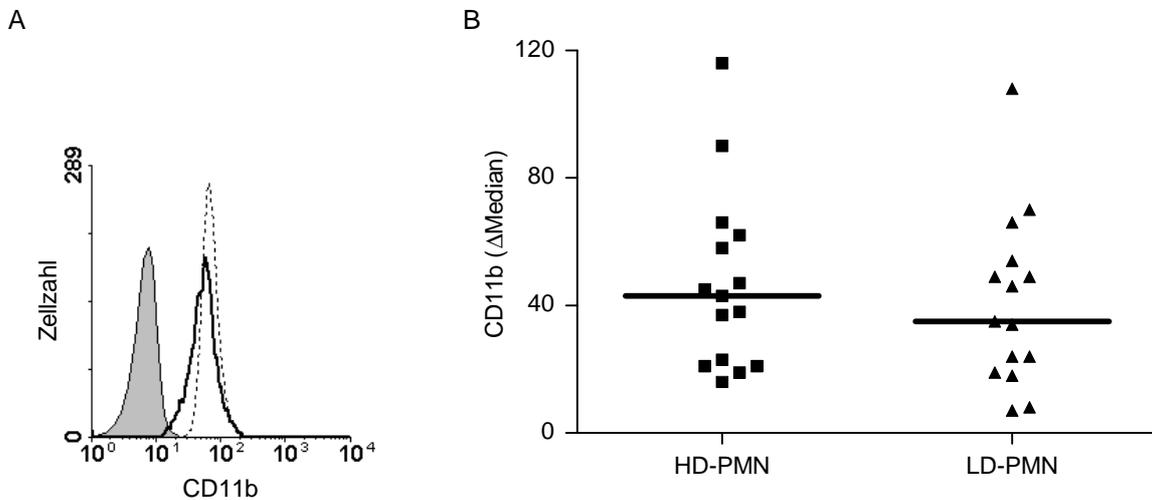


Abb. 3.2.1.4: Vergleich der Expression von CD11b auf HD- und LD-PMN. MNC und HD-PMN von Tumorpatienten wurden nach Dichtegradientenzentrifugation isoliert, mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen CD66b und CD11b bzw. Antikörper desselben Isotyps gefärbt, im Durchflusszytometer analysiert und anschließend jeweils der Δ Median der Expressionsdichte von CD11b auf CD66b-positiven Zellen bestimmt. (A) Repräsentatives Histogramm mit Darstellung der Expressionsdichte von CD11b auf HD-PMN (gepunktete Linie) und LD-PMN (fettgedruckte Linie) desselben Tumorpatienten (Isotypfärbung als grau gefülltes Histogramm). (B) Verteilung der Δ Medianwerte der Expressionsdichte von CD11b auf HD- und LD-PMN von 15 Tumorpatienten mit signifikant (*) schwächerer Expression auf LD-PMN ($P < 0,0245$; Wilcoxon matched-pairs signed rank test). Abgebildet ist ein vertikales Streudiagramm mit dem Median (fett gedruckter Balken) jeweils aller Werte.

Anschließend wurde die Expression von CD14 untersucht. Der Vergleich der Δ Medianwerte von HD- und LD-PMN aus 12 Tumorpatienten führt zu dem Ergebnis, dass CD14 ebenfalls minimal, aber signifikant (*) schwächer von LD-PMN exprimiert wurde (Abb. 3.2.1.5).

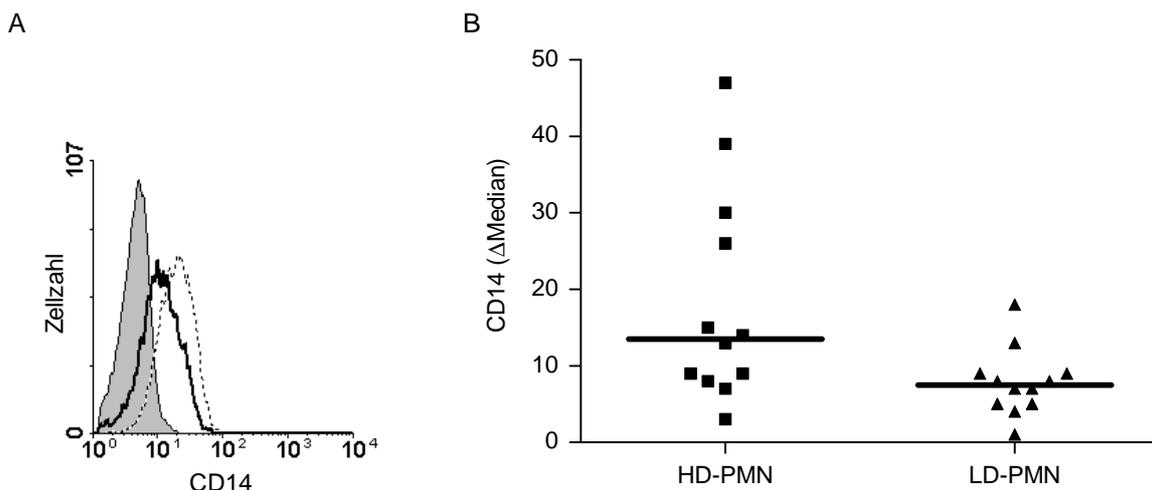


Abb. 3.2.1.5: Vergleich der Expression von CD14 auf HD- und LD-PMN. MNC und HD-PMN von Tumorpatienten wurden nach Dichtegradientenzentrifugation isoliert, mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen CD66b und CD14 bzw. Antikörper desselben Isotyps gefärbt, im Durchflusszytometer analysiert und anschließend jeweils der Δ Median der Expressionsdichte von CD14 auf CD66b-positiven Zellen bestimmt. (A) Repräsentatives Histogramm mit Darstellung der Expressionsdichte von CD14 auf HD-PMN (gepunktete Linie) und LD-PMN (fettgedruckte Linie) desselben Tumorpatienten (Isotypfärbung als grau gefülltes Histogramm). (B) Verteilung der Δ Medianwerte der Expressionsdichte von CD14 auf HD- und LD-PMN von 12 Tumorpatienten mit signifikant (*) schwächerer Expression auf LD-PMN ($P < 0,0137$; Wilcoxon matched-pairs signed rank test). Abgebildet ist ein vertikales Streudiagramm mit dem Median (fett gedruckter Balken) jeweils aller Werte.

Ebenso zeigt der Vergleich der Δ Medianwerte zur Expression von MHC Klasse I auf HD- und LD-PMN aus 11 Tumorpatienten, dass dieser Komplex minimal, aber signifikant (*) schwächer von LD-PMN exprimiert wurde (Abb. 3.2.1.6).

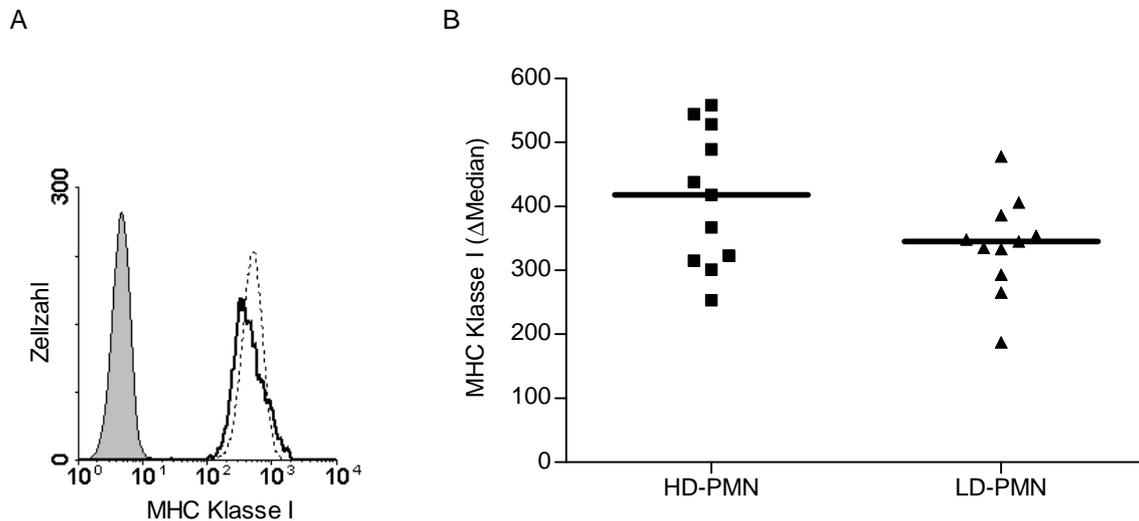


Abb. 3.2.1.6: Vergleich der Expression von MHC Klasse I auf HD- und LD-PMN. MNC und HD-PMN von Tumorpatienten wurden nach Dichtegradientenzentrifugation isoliert, mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen CD66b und MHC Klasse I bzw. Antikörper desselben Isotyps gefärbt, im Durchflusszytometer analysiert und anschließend jeweils der Δ Median der Expressionsdichte von MHC Klasse I auf CD66b-positiven Zellen bestimmt. (A) Repräsentatives Histogramm mit Darstellung der Expressionsdichte von MHC Klasse I auf HD-PMN (gepunktete Linie) und LD-PMN (fettgedruckte Linie) desselben Tumorpatienten (Isotypfärbung als grau gefülltes Histogramm). (B) Verteilung der Δ Medianwerte der Expressionsdichte von MHC Klasse I auf HD- und LD-PMN von 11 Tumorpatienten mit signifikant (*) schwächerer Expression auf LD-PMN ($P < 0,0420$; Wilcoxon matched-pairs signed rank test). Abgebildet ist ein vertikales Streudiagramm mit dem Median (fett gedruckter Balken) jeweils aller Werte.

Am Ende der immunphänotypischen Charakterisierung der LD-PMN stand die Analyse der Expression von CD16. LD-PMN stellten sich anhand der Expression dieses Rezeptors als heterogen dar, denn sie bestanden aus einer CD16 stark exprimierenden ($CD16^{high}$) und einer CD16 schwach exprimierenden ($CD16^{low}$) Subpopulation (Abb. 3.2.1.7A).

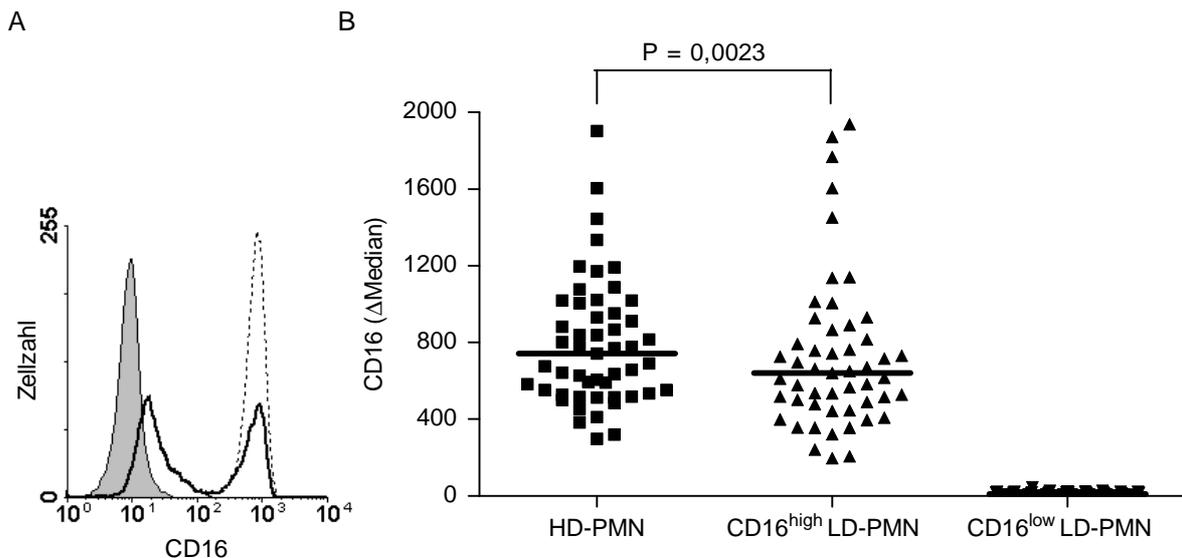


Abb. 3.2.1.7: Vergleich der Expression von CD16 auf HD- und LD-PMN. MNC und HD-PMN von Tumorpatienten wurden nach Dichtegradientenzentrifugation isoliert, mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen CD66b und CD16 bzw. Antikörper desselben Isotyps gefärbt, im Durchflusszytometer analysiert und anschließend jeweils der Δ Median der Expressionsdichte von CD16 auf CD66b-positiven Zellen bestimmt. (A) Repräsentatives Histogramm mit Darstellung der Expressionsdichte von CD16 auf HD-PMN (gepunktete Linie) und LD-PMN (fettgedruckte Linie) desselben Tumorpatienten (Isotypfärbung als grau gefülltes Histogramm). (B) Verteilung der Δ Medianwerte der Expressionsdichte von CD16 auf HD- und LD-PMN von 51 Tumorpatienten mit signifikant (**) schwächerer Expression auf CD16^{high} LD-PMN gegenüber HD-PMN ($P < 0,0023$; Wilcoxon matched-pairs signed rank test). Abgebildet ist ein vertikales Streudiagramm mit dem Median (fett gedruckter Balken) jeweils aller Werte.

Der Vergleich der Δ Medianwerte von HD- und LD-PMN aus 51 Tumorpatienten zeigt, dass CD16 auf CD16^{high} LD-PMN geringfügig, aber signifikant (**) schwächer exprimiert wurde als auf HD-PMN (Abb. 3.2.1.7B).

Der Median des Anteils der CD16 schwach exprimierenden Subpopulation innerhalb der LD-PMN von 54 Tumorpatienten beträgt 57,8 % (Abb. 3.2.1.8).

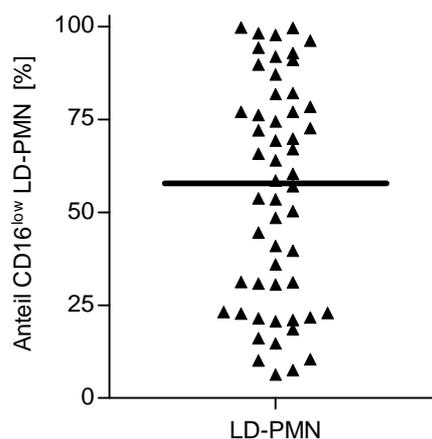


Abb. 3.2.1.8: Anteil der CD16^{low} LD-PMN innerhalb der LD-PMN. MNC von 54 Tumorpatienten wurden nach Dichtegradientenzentrifugation isoliert, mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen CD66b und CD16 gefärbt, im Durchflusszytometer analysiert und anschließend der Anteil der CD16-schwach exprimierenden Zellen innerhalb der LD-PMN bestimmt. Abgebildet ist ein vertikales Streudiagramm mit dem Median (fett gedruckter Balken) aller Werte.

Zusammengefasst haben die phänotypischen Untersuchungen mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbung gezeigt, dass CD14, MHC Klasse I und CD11b von LD-PMN schwächer exprimiert wurden als von HD-PMN, während CD80, CD83, CD86 und MHC Klasse II weder auf LD- noch

auf HD-PMN präsent waren. CD66b und CD15 wurden stärker von LD-PMN exprimiert. Anhand der Expression von CD16 zeigte sich, dass LD-PMN aus zwei Subpopulationen bestanden, einer stark und einer schwach CD16 exprimierenden Subpopulation.

Nach den immunphänotypischen Analysen war das nächste Ziel, wichtige immunologische Funktionen der LD-PMN zu untersuchen. Dazu war es jedoch nötig, LD-PMN hochrein aus MNC zu isolieren, denn sowohl Monozyten als auch Lymphozyten können Ergebnisse funktioneller Untersuchungen von PMN stark verfälschen. Monozyten produzieren z.B. um ein Vielfaches mehr IL-8 als PMN⁸⁶. Vor den funktionellen Analysen wurde deshalb ein Protokoll zur Isolierung hochreiner LD-PMN entwickelt, was im folgenden Abschnitt beschrieben wird.

3.3 Isolierung hochreiner LD-PMN aus dem peripheren Blut von Tumorpatienten

PMN von gesunden Spendern und HD-PMN von Tumorpatienten lassen sich durch Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll (2.3.1) und anschließender Lyse der Erythrozyten (2.2.3) mit einer Reinheit von ca 98 % isolieren, da sich ihre Dichte ausreichend von der Dichte der MNC unterscheidet. Subpopulationen von MNC wie z.B. Monozyten können unter anderem durch weitere diskontinuierliche Dichtegradienten isoliert werden⁶⁹. Da LD-PMN eine Subpopulation der MNC von Tumorpatienten repräsentierten, schien es möglich, diese Methode zur Isolierung von LD-PMN verwenden zu können.

Eine andere Methode zur Isolierung von Zellpopulationen stellt die magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS) dar. Man bedient sich dabei der spezifischen Expression von extrazellulären Molekülen auf der Membran der jeweiligen Zellen. Antikörper, die spezifisch an diese Membranmoleküle binden und mit magnetischen Mikropartikeln konjugiert sind, ermöglichen die selektive, magnetische Markierung von Zellen. Durch ein Magnetfeld können die markierten Zellen dann auf einer Säule zurückgehalten werden, um sie auf diese Weise entweder zu isolieren (positive Selektion) oder aus einer Zellsuspension zu entfernen (Depletion). Zur Isolierung von PMN sind gegen CD15 gerichtete Antikörper mit konjugierten Mikropartikeln (anti CD15-Beads) erhältlich⁷⁰.

Beide genannten Methoden wurden während der Entwicklung des Protokolls zur Isolierung hochreiner LD-PMN benutzt.

3.3.1 Unzureichende Isolierung von LD-PMN durch diskontinuierliche Dichtegradienten

Diskontinuierliche Dichtegradienten wurden aus Verdünnungen des Leukozyten-Separationsmediums Percoll hergestellt, um MNC von Tumorpatienten darauf zu schichten und durch Zentrifugation zu separieren (2.3.4). Nach Zentrifugation wurden von allen Interphasen Zellen isoliert und im Durchflusszytometer analysiert. Dabei ließen sich Lymphozyten, LD-PMN und Monozyten ausreichend gut anhand ihrer SSC und FSC Eigenschaften identifizieren. Der Gradient mit der stärksten Anreicherung von LD-PMN ist in Abb. 3.3.1 dargestellt. Monozyten als die größten Leukozyten sedimentierten in diesem Gradienten fast ausschließlich auf den 3 Verdünnungen mit den kleinsten Dichten. Lymphozyten und LD-PMN wurden dagegen kaum voneinander getrennt. Die Fraktion mit dem größten Anteil von LD-PMN befand sich auf der

Verdünnung mit 65 % Percoll. LD-PMN repräsentierten 58 % der Zellen dieser Interphase, während Lymphozyten die restlichen Zellen darstellten. Neben dieser unzureichenden Reinheit war ebenfalls ein beträchtlicher Verlust der LD-PMN zu beobachten, da sie deutlich auch auf anderen Interphasen sedimentierten.

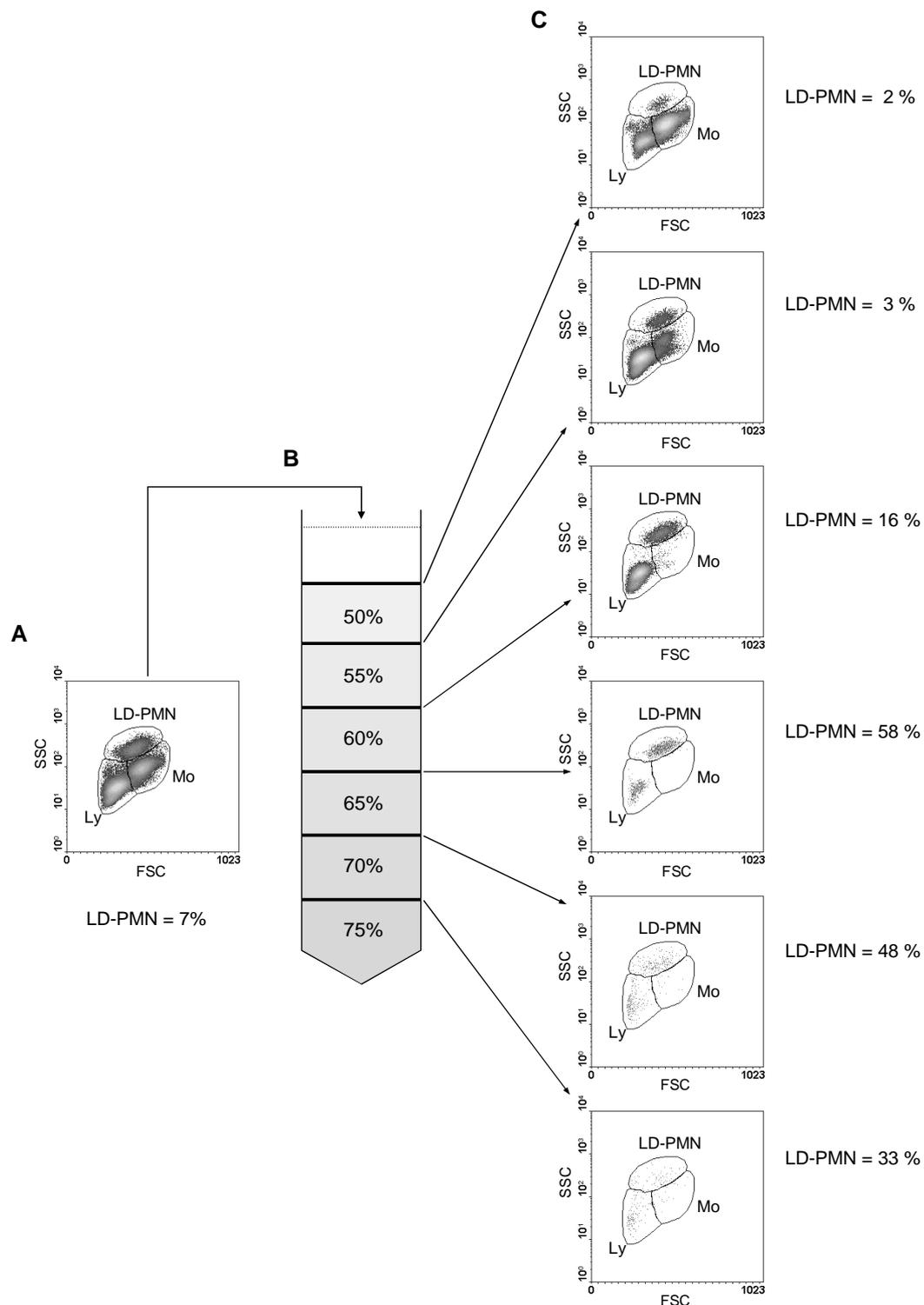


Abb. 3.3.1: Anreicherung von LD-PMN mittels diskontinuierlichem Dichtegradienten. MNC eines Tumorpatienten (A) wurden auf einen Gradienten aus 6 Verdünnungen von Percoll (B) geschichtet. Nach Zentrifugation wurden Zellen aller Interphasen isoliert und per Durchflusszytometer analysiert (C). Die Regionen für LD-PMN, Monozyten (Mo) und Lymphozyten (Ly) wurden anhand der Streulichteigenschaften der MNC vor Separation (A) festgelegt. Abgebildet sind Häufigkeitsdarstellungen der im Durchflusszytometer gemessenen Ereignisse.

Diese Ergebnisse zeigen, dass mittels Zentrifugation diskontinuierlicher Dichtegradienten keine ausreichende Isolierung von LD-PMN erreicht werden konnte. Als Alternative wurde daher MACS zur Isolierung von LD-PMN verwendet.

3.3.2 Verunreinigende Monozyten in LD-PMN nach positiver Selektion durch MACS

Zur Isolierung von LD-PMN durch MACS wurden anti CD15-Beads genutzt (2.2.5). MNC von Tumorpatienten wurden nach Inkubation mit anti CD15-Beads über zwei aufeinander folgende Säulen im magnetischen Feld separiert (Abb. 3.3.2). Von der ersten Säule wurden hauptsächlich Lymphozyten und Monozyten im Durchfluss und den Waschfraktionen gespült. Im Eluat waren kaum noch Lymphozyten, aber deutlich Monozyten enthalten. Von diesen restlichen, verunreinigenden Monozyten konnten LD-PMN durch die zweite Säule weiter separiert werden. Die Verwendung einer zweiten Säule steigerte klar die Reinheit der LD-PMN. Jedoch verblieben auch nach weiteren Versuchen mit größeren Waschvolumina stets ca. 10 % Monozyten in den LD-PMN.

Die Markierung von LD-PMN in MNC von Tumorpatienten mit aus der Maus stammendem Antikörper gegen humanes CD66b und Ziege anti Maus-Immunglobulin G-Beads führte nach Verwendung von zwei aufeinander folgenden Säulen ebenfalls zu einer Verunreinigung von etwa 10 % Monozyten.

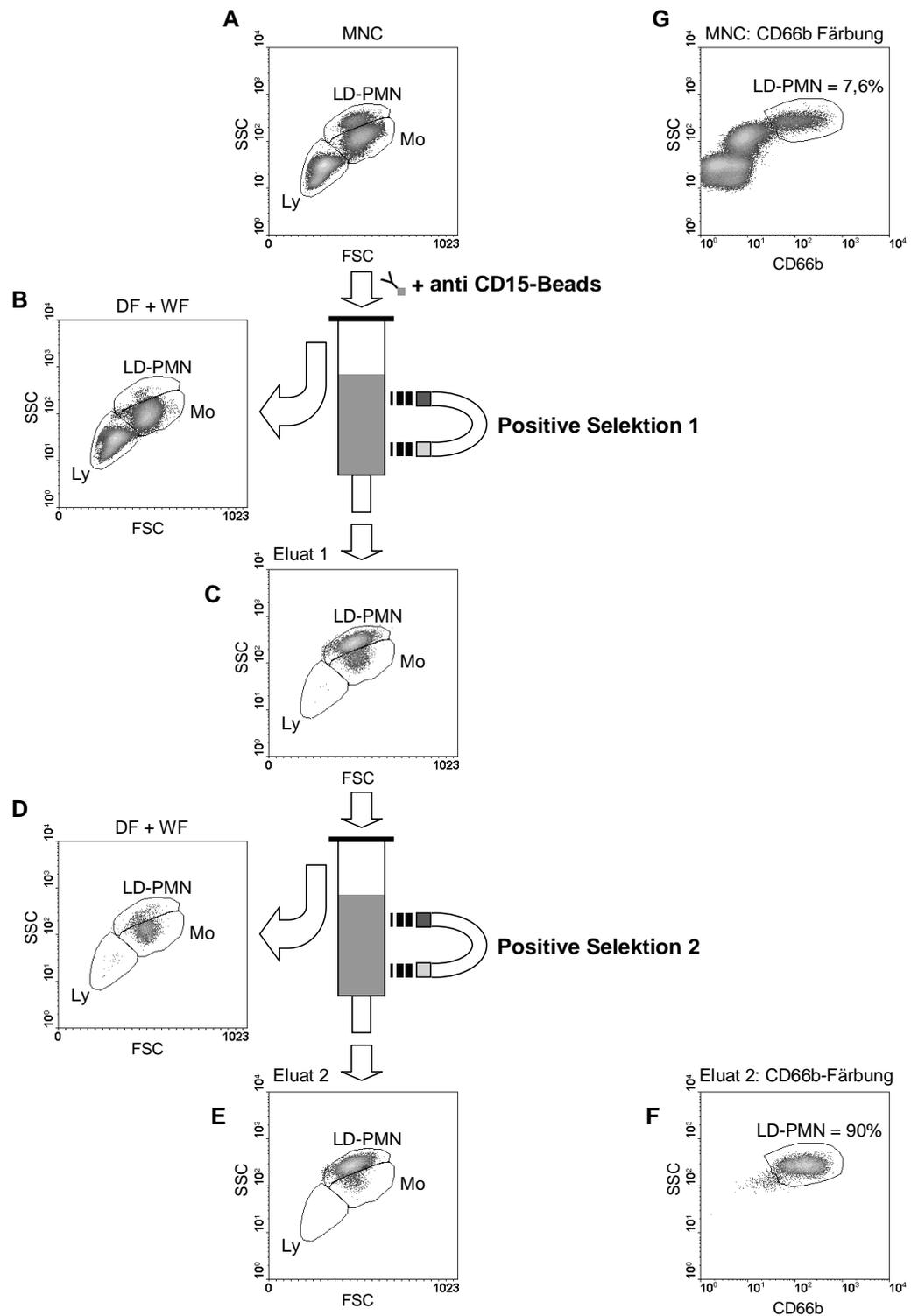


Abb. 3.3.2: Isolierung von LD-PMN durch MACS mit anti CD15-Beads. (A) MNC von Tumorpatienten wurden mit anti CD15-Beads inkubiert, dann über 2 aufeinander folgende Säulen im Magnetfeld LD-PMN positiv selektiert. Dabei wurden jeweils im Durchfluss (DF) und in den Waschfraktionen (WF) hauptsächlich Lymphozyten (Ly) und Monozyten (Mo) von den Säulen gespült (B, D). Die zurückgehaltenen Zellen wurden außerhalb des Magnetfeldes eluiert (C, E). Die von der zweiten Säule eluierten Zellen bestanden zu 90 % aus LD-PMN (F) mit verunreinigenden Monozyten, während vor Separation 7,6 % LD-PMN in den MNC nachgewiesen wurden (G). Abgebildet sind Häufigkeitsdarstellungen der im Durchflusszytometer gemessenen Ereignisse.

Durch diese Ergebnisse stellte sich heraus, dass die Depletion der Monozyten unabhängig von den Lymphozyten zu berücksichtigen war.

3.3.3 Isolierung hochreiner LD-PMN nach Depletion der Monozyten und positiver Selektion durch MACS

Basierend auf den in 3.3.1 und 3.3.2 gezeigten Ergebnissen wurde folgendes Protokoll zur Isolierung hochreiner LD-PMN erstellt:

- 1.) Dichtegradientenzentrifugation und Isolierung der MNC mit LD-PMN,
- 2.) Depletion der Monozyten durch MACS mit anti CD14-Beads,
- 3.) positive Selektion der LD-PMN mit Antikörper gegen CD66b und Ziege anti Maus-IgG-Beads über zwei MACS Säulen

(Abb. 3.3.3).

Mit diesem Protokoll wurden Monozyten durch Verwendung von anti CD14-Beads entfernt. Im Vergleich zum Anteil der LD-PMN in den MNC (Abb. 3.3.3 I) wurden dabei nur wenige LD-PMN verloren (Abb. 3.3.3 H). Die verbliebenen Lymphozyten in Durchfluss und Waschfraktionen nach Depletion der Monozyten (Abb. 3.3.3 B) wurden während der positiven Selektion der LD-PMN fast vollständig entfernt. Auch in diesem Schritt wurden kaum LD-PMN verloren (Abb. 3.3.3 G). Die isolierten LD-PMN im zweiten Eluat der positiven Selektion waren zu über 99 % rein und enthielten nur noch Spuren von Lymphozyten. Diese Effizienz war hoch reproduzierbar, wenn mindestens 2 % LD-PMN in den MNC enthalten waren.

Es sei hier erwähnt, dass die entwickelte Isolierung von Granulozyten durch MACS mit Antikörper gegen CD66b im Rahmen dieser Doktorarbeit ebenfalls erfolgreich zur Isolierung hochreiner Granulozyten aus dem Urin von Patienten mit BCG-Immuntherapie des Harnblasenkarzinoms verwendet wurde⁸⁷.

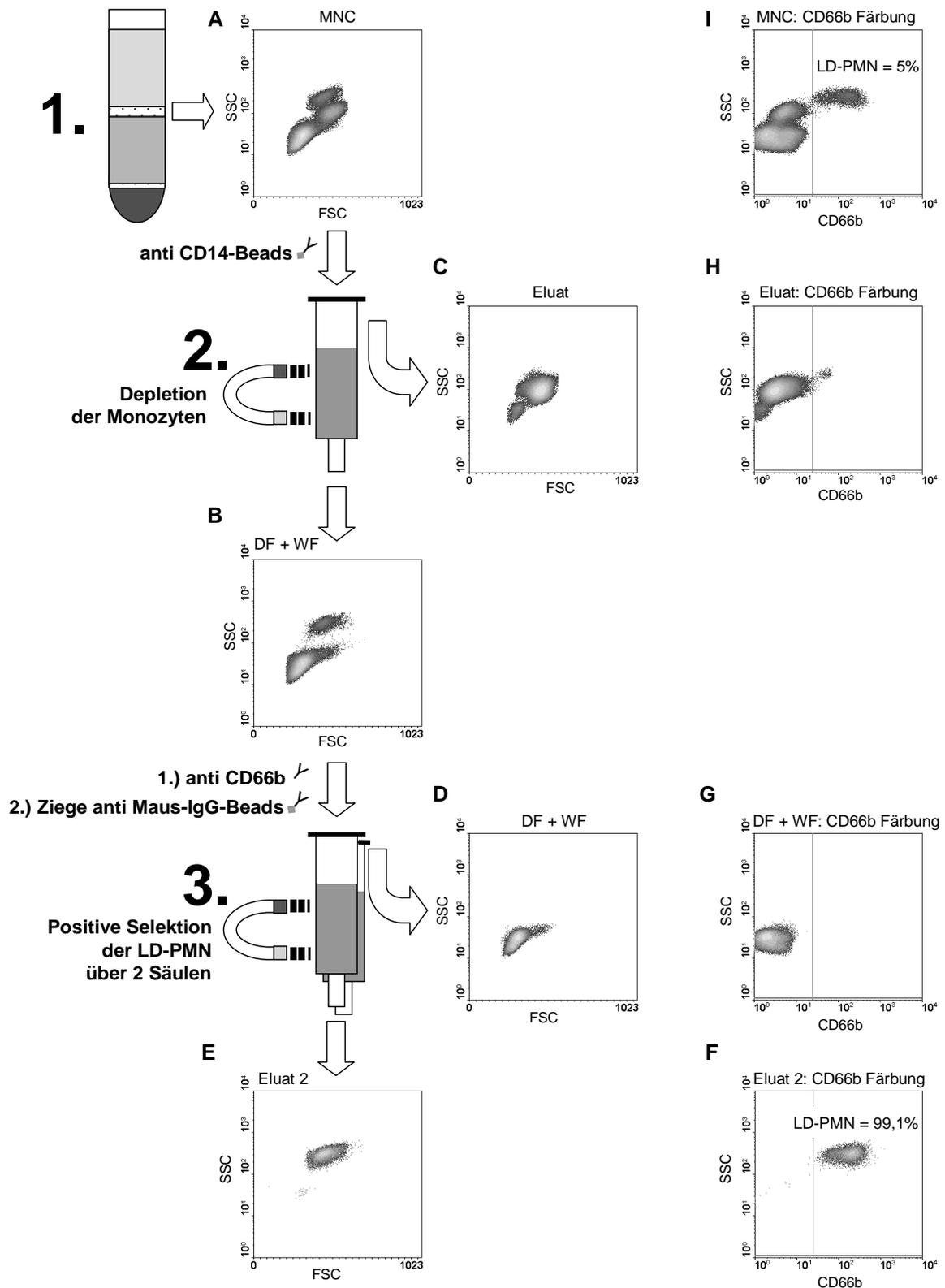


Abb. 3.3.3: Isolierung hochreiner LD-PMN (2.2.7). 1.) Nach Dichtegradientenzentrifugation wurden MNC (A) von Tumorpatienten isoliert und mit anti CD14-Beads inkubiert. 2.) Während der Separation im Magnetfeld wurden im Durchfluss (DF) und in den Waschfraktionen (WF) Lymphozyten und LD-PMN von der Säule gespült (B). Zurückgehalten wurden hauptsächlich Monozyten und außerhalb des Magnetfeldes eluiert (C). Lymphozyten und LD-PMN wurden mit Antikörpern gegen CD66b und Ziege anti Maus-Immunglobulin-Beads inkubiert. 3.) Durch 2 aufeinander folgende Säulen im Magnetfeld wurden LD-PMN positiv selektiert und Lymphozyten in den Durchflüssen und Waschfraktionen von den Säulen gespült (D). LD-PMN wurden außerhalb des Magnetfeldes eluiert (E). Die auf diese Weise isolierten LD-PMN waren zu über 99 % rein (F), während sowohl bei der positiven Selektion (G) als auch bei der Depletion der Monozyten (H) kaum LD-PMN verloren wurden. Ausgegangen wurde in diesem Fall von MNC mit 5 % LD-PMN (I). Abgebildet sind Häufigkeitsdarstellungen der im Durchflusssytometer gemessenen Ereignisse.

Rückblickend wurden durch direkte positive Selektion mittels MACS 90 % reine LD-PMN mit verunreinigenden Monozyten isoliert (3.3.2). Durch Depletion der Monozyten mit anti CD14-Beads vor positiver Selektion der LD-PMN mit Antikörper gegen CD66b wurden über 99 % reine LD-PMN isoliert (3.3.3). Die Verwendung von diskontinuierlichen Dichtegradienten führte vorher nur zu 58 % reinen LD-PMN bei großem Verlust von LD-PMN und unzureichender Separation von Lymphozyten und LD-PMN (3.3.1).

Zur Überprüfung des Zustands der LD-PMN nach Isolierung wird im folgenden Abschnitt ihre Viabilität und Heterogenität (Abb. 3.2.1.7A) analysiert.

3.4 Viabilität und Kernmorphologie isolierter LD-PMN

Durch die erfolgreiche Entwicklung eines Protokolls zur Isolierung hochreiner LD-PMN waren diese funktionellen Untersuchungen zugänglich. Doch bevor diese Analysen durchgeführt werden konnten, war es nötig, die Viabilität der LD-PMN nach Isolierung (2.2.7) zu überprüfen und ihre Heterogenität (Abb. 3.2.1.7A) aufzuklären.

3.4.1 LD-PMN sind nach Isolierung viabel

Die Viabilität der LD-PMN wurde durch Doppelfluoreszenzfärbungen mit 7-Amino Actinomycin D (7-AAD) und Annexin V-PE untersucht (2.4.2). HD- und LD-PMN von vier Tumorpatienten wurden nach Isolation (2.2.7) mit 7-AAD und Annexin V-PE gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert (Abb. 3.4.1 A,C). Als Referenz für tote PMN dienten Gemcitabine (0,1 μM) behandelte HD-PMN (Abb. 3.4.1 B). Gemcitabine ist ein fluoriertes Cytidin-Analogon, das Myelotoxizität aufweist⁸⁸.

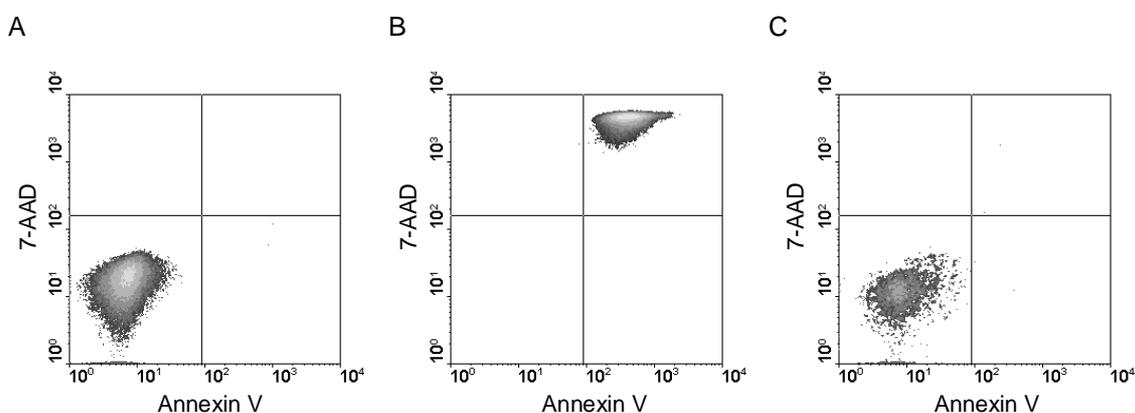


Abb. 3.4.1: Viabilität von HD- und LD-PMN nach Isolierung. Aus dem peripheren Blut von 4 Tumorpatienten wurden nach Dichtegradientenzentrifugation HD- und LD-PMN durch MACS isoliert (2.2.7), mit Annexin V-PE und 7-AAD gefärbt (2.3.2) und im Durchflusszytometer analysiert. Abgebildet ist das repräsentative Ergebnis der HD-PMN (A), Gemcitabine (0,1 μM) behandelten HD-PMN (B) und LD-PMN (C) eines Tumorpatienten. Weder in den isolierten, unbehandelten HD-PMN noch in den LD-PMN wurden signifikante Mengen apoptotischer Zellen identifiziert. Abgebildet sind Häufigkeitsdarstellungen der im Durchflusszytometer gemessenen Ereignisse.

Gemcitabine behandelte HD-PMN zeigten sowohl eine starke Fluoreszenz für 7-AAD als auch für Annexin V-PE. Sie konnten eindeutig als tote PMN identifiziert werden. Direkt nach der Isolierung untersuchte HD- und LD-PMN wiesen keine signifikanten Mengen toter oder apoptotischer Zellen auf. Demnach führte die Isolierung durch MACS (2.2.7) zu viablen Zellen.

Im folgenden Abschnitt wird nun die anhand der Expression von CD16 (Abb. 3.2.1.7A) festgestellte Heterogenität der LD-PMN analysiert.

3.4.2 Unreife Neutrophile stellen Subpopulation der LD-PMN dar

PMN bestehen aus den Subpopulationen der Neutrophilen, Eosinophilen und Basophilen. Um zwischen diesen Granulozytenpopulationen unterscheiden zu können, wurden HD- und LD-PMN von 10 Tumorpatienten nach Isolierung auf Objektträger zentrifugiert und nach Pappenheim gefärbt (Abb. 3.4.2).

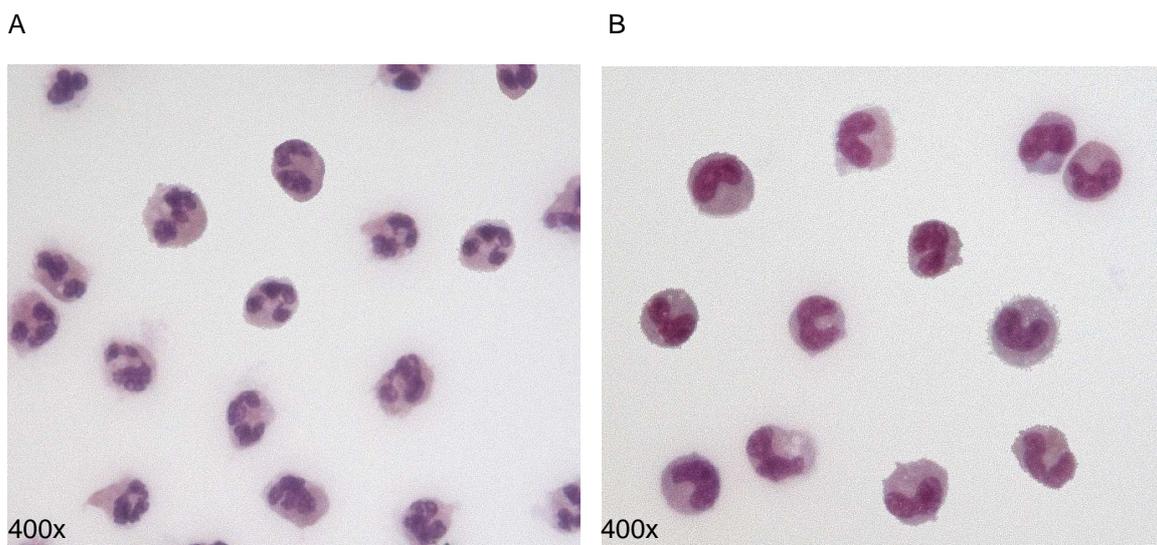


Abb. 3.4.2: Färbung von isolierten HD- und LD-PMN nach Pappenheim. Aus dem peripheren Blut von 10 Tumorpatienten wurden HD- und LD-PMN isoliert (2.2.3; 2.2.7), auf Objektträger zentrifugiert, nach Pappenheim gefärbt (2.3.3) und im Lichtmikroskop analysiert. Abgebildet sind repräsentative Färbungen der HD-PMN (A) und LD-PMN (B) eines Tumorpatienten (jeweils 400x vergrößert).

Weder in LD- noch in HD-PMN wurden Basophile identifiziert. Basophile Granulozyten weisen durch Färbung nach Pappenheim schwarze Granula auf. Eosinophile fallen in Färbungen nach Pappenheim durch ihr rötliches Zytoplasma auf. Während LD-PMN im Median 1 % Eosinophile enthielten, wurden in HD-PMN im Median 2 % Eosinophile nachgewiesen. Neutrophile weisen in Färbungen nach Pappenheim ein schwach violettes Zytoplasma auf. Sie stellten nahezu 100 % der LD-PMN dar, so dass LD-PMN Neutrophile mit geringerer Dichte repräsentierten.

Eosinophile sind daher anhand ihrer erhöhten Autofluoreszenz und fehlenden Expression von CD16⁸⁹ durch selektive Analyse der durchflusszytometrischen Daten aus allen in 3.1.2 und 3.2.1 gezeigten Untersuchungen von HD-PMN ausgeschlossen worden.

Überraschender Weise bestand ein wesentlicher Unterschied zwischen LD- und HD-PMN in der Kernmorphologie. Die Kerne der HD-PMN lagen segmentiert vor (Abb. 3.4.2 A), wie es für reife Neutrophile charakteristisch ist. Dahingegen wiesen 61 % (Median) der LD-PMN einen nicht-segmentierten Kern auf (Abb. 3.4.2 B). So genannte stabkernige Neutrophile stellen eine Vorstufe der reifen Neutrophilen dar. LD-PMN bestanden also aus Neutrophilen, die zum großen Teil unreif waren.

In welcher Beziehung die Subpopulation der unreifen Neutrophilen zu der Subpopulation der CD16^{low} LD-PMN steht, wird im nächsten Abschnitt untersucht.

3.4.3 Anteil der CD16^{low} LD-PMN korreliert signifikant mit dem Anteil unreifer LD-PMN

LD-PMN erwiesen sich sowohl in Bezug auf Expression von CD16 (3.2.1.7A) als auch anhand der Kernmorphologie als heterogen. Da der Anteil der CD16^{low} LD-PMN (ca. 58 %, Abb. 3.2.1.8) fast identisch mit dem Anteil der stabkernigen LD-PMN (61 %, 3.4.2) war, wurde ihre Korrelation überprüft (Abb. 3.4.3).

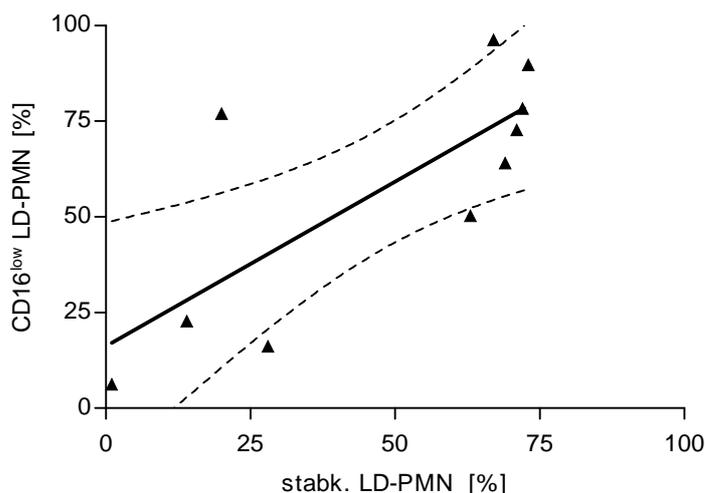


Abb. 3.4.3: Korrelation der Anteile von CD16^{low} LD-PMN und stabkernigen LD-PMN. Aufgetragen ist der Anteil der CD16^{low} LD-PMN gegen den jeweiligen Anteil stabkerniger LD-PMN von 10 Tumorpatienten. Beide phänotypischen Eigenschaften korrelieren signifikant (*, $P = 0,0268$, Spearman $r = 0,7091$). Eingezeichnet ist die lineare Regressionsgerade und die Grenzen des 95 % Vertrauensbereiches (gestrichelt).

Die Werte der LD-PMN von 10 Tumorpatienten zeigen, dass der Anteil der CD16^{low} LD-PMN signifikant (*) mit dem Anteil der stabkernigen LD-PMN korreliert. Die schwache Expression von CD16 auf LD-PMN schien demnach zum Teil in ihrem unreifen Zustand begründet zu sein.

LD-PMN von Tumorpatienten konnten also viabel (3.4.1) und hochrein (3.3.3) isoliert werden. Sie repräsentierten Neutrophile mit geringerer Dichte, die zum großen Teil in einem unreifen Differenzierungsstadium vorlagen (3.4.2) und CD16 schwach zu exprimieren schienen (3.4.3).

Dieser unreife Zustand wurde in den folgenden funktionellen Untersuchungen der LD-PMN berücksichtigt.

3.5 Funktionelle Eigenschaften der LD-PMN von Tumorpatienten

Zu den wichtigsten funktionellen Eigenschaften von Neutrophilen gehören die Fähigkeit zur Adhäsion an Endothelzellen und Chemotaxis, sowie die Produktion von ROI und IL-8. Neben diesen grundlegenden Funktionen wurde unter Berücksichtigung des unreifen Zustandes eines Teils der LD-PMN ebenfalls der Einfluss auf die Proliferation von T-Zellen untersucht.

Die erfolgreiche Entwicklung eines Protokolls zur Isolierung hochreiner, viabler LD-PMN ermöglichte zwar die Analyse der genannten Funktionen. Jedoch mussten Veränderungen der funktionellen Eigenschaften durch die Isolierung über drei MACS-Säulen berücksichtigt werden. Dazu wurden HD-PMN, die nach dem Protokoll zur Isolierung von LD-PMN (3.3.3) behandelt wurden, (HD-PMN (MACS)) mit HD-PMN verglichen, die nach Dichtegradientenzentrifugation durch Lyse der Erythrozyten (2.3.3) isoliert wurden (HD-PMN (ely)).

3.5.1 LD-PMN adhären verstärkt an Endothelzellen

Zur Analyse der Adhäsion von LD-PMN wurden humane Nabelschnur-Endothelzellen (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVECs) verwendet. Nach Inkubation der PMN mit konfluenten HUVECs wurden nicht-adhärenente PMN entfernt und die adhärenenten PMN quantifiziert (2.4.1).

Zuerst wurde die Adhäsion von HD-PMN (ely) und HD-PMN (MACS) aus drei Tumorpatienten verglichen (Abb. 3.5.1.1), um den Einfluss der Isolierung durch MACS zu überprüfen. Als Referenz für gesteigerte Adhäsion an HUVECs wurden HD-PMN mit Plättchenfaktor 4 (PF4) stimuliert⁹⁰.

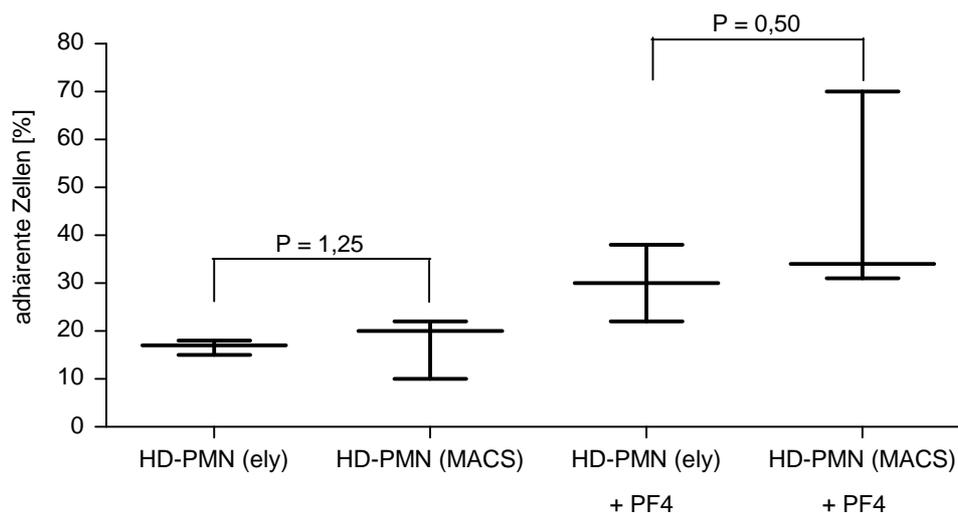


Abb. 3.5.1.1: Vergleich der Adhäsion von HD-PMN (MACS) und HD-PMN (ely) an HUVECs. Aus dem peripheren Blut von drei Tumorpatienten wurden jeweils HD-PMN (MACS) und HD-PMN (ely) isoliert. In unabhängigen Versuchen wurden anschließend HD-PMN (MACS) und HD-PMN (ely) jeweils als Duplikate mit konfluenten HUVECs in einer Flachboden-Mikrotiterplatte inkubiert (gekennzeichnete Ansätze mit 4 μ M PF4). Nach 25 min Inkubation wurden nicht-adhärenente PMN durch Zentrifugation der Platte im Winkel von 45° und anschließendem Absaugen des Zellsediments am Rand entfernt. Adhärenente PMN wurden nach weiteren 15 min Inkubation der Platte auf Eis und Resuspendieren der Zellen gezählt. HD-PMN (MACS) und HD-PMN (ely) unterschieden sich nicht signifikant in der basalen und durch PF4 gesteigerten Adhäsion an HUVECs (Wilcoxon matched-pairs signed rank test). Abgebildet ist die Zusammenfassung der Mittelwerte der jeweiligen Duplikate aus drei unabhängigen Versuchen in Form eines vertikalen Box-Whisker-Diagramms mit jeweils dem Median und der Streuung der Werte.

Der Vergleich der Adhäsion an HUVECs (Abb. 3.5.1.1) zeigt, dass sich HD-PMN (ely) und HD-PMN (MACS) aus 3 Tumorpatienten nicht signifikant in der basalen und durch PF4 gesteigerten Adhäsion unterschieden. Die Isolierung durch MACS (2.3.7) beeinflusste im Vergleich zur Isolierung durch Lyse der Erythrozyten (2.3.3) weder die basale noch die mittels PF4 gesteigerte Adhäsion von HD-PMN an HUVECs signifikant.

Daher konnten die Werte zur Adhäsion von HD-PMN (MACS) und HD-PMN (ely) der drei Tumorpatienten aus Abb. 3.5.1.1 zusammengefasst und mit den LD-PMN dieser Tumorpatienten verglichen werden (Abb. 3.5.1.2). Aus dem peripheren Blut eines weiteren Tumorpatienten wurden HD-PMN (ely) und LD-PMN isoliert und ebenfalls in der Adhäsion an HUVECs verglichen. Die Analyse der vier unabhängigen Versuche zeigt, dass LD-PMN basal in signifikant (*) höherem Anteil an HUVECs adhärenierten als unstimulierte HD-PMN. Im Median adhärenierten mehr als doppelt so viele LD-PMN wie unstimulierte HD-PMN. Der Anteil der adhärenenten LD-PMN lag im Bereich der HD-PMN nach Stimulation mit PF4.

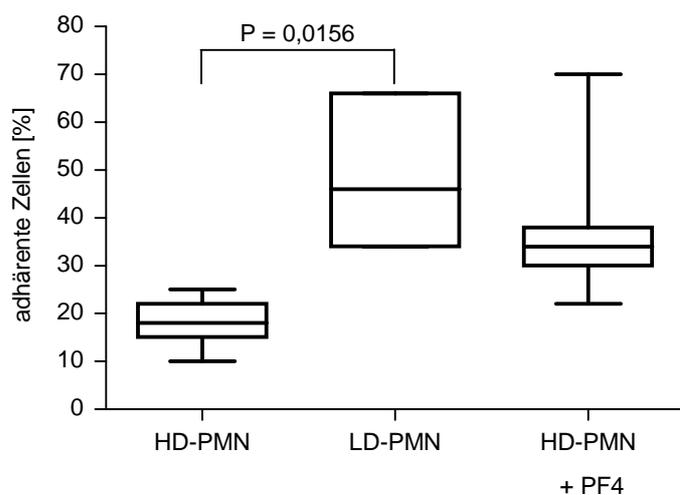


Abb. 3.5.1.2: Vergleich der Adhäsion von HD- und LD-PMN an HUVECs. Aus dem peripheren Blut von 3 Tumorpatienten wurden HD-PMN (ely), HD-PMN (MACS) und LD-PMN isoliert. Aus dem peripheren Blut eines weiteren Tumorpatienten wurden HD-PMN (ely) und LD-PMN isoliert. In 4 unabhängigen Versuchen wurden HD-PMN und LD-PMN jeweils als Duplikate mit HUVECs inkubiert (2.4.1). In diesen Versuchen adhärten LD-PMN basal in signifikant (*) größerem Anteil als unstimulierte HD-PMN (Wilcoxon matched-pairs signed rank test). Abgebildet ist die Zusammenfassung der Mittelwerte der jeweiligen Duplikate aus 4 unabhängigen Versuchen in Form eines vertikalen Box-Whisker-Diagramms mit jeweils dem Median, den Quartilen und den Extremwerten. Die Werte der HD-PMN (ely) und HD-PMN (MACS) sind zusammengefasst dargestellt.

Nachdem LD-PMN verstärkte Adhäsion an Endothelzellen aufwies, wurde als nächste wichtige Funktion von PMN die Chemotaxis untersucht.

3.5.2 LD-PMN weisen reduzierte Chemotaxis auf

Die Chemotaxis von LD-PMN wurde analysiert, indem Migration durch einen permeablen Membraneinsatz gemessen wurde (2.5.2). Unterhalb der Membran befand sich unbehandeltes Zellkulturmedium, um die spontane Migration zu bestimmen. Induzierte Migration wurde bei Verwendung von Monozyten-konditioniertem Medium oder fMLP-haltigem Medium untersucht. Der Quotient aus induzierter und spontaner Migration wurde gebildet, um den Chemotaktischen Index zu ermitteln, der die Vervielfachung der spontanen Migration durch Chemotaxine wiedergibt.

Zu Beginn wurde der Chemotaktische Index von HD-PMN (MACS) und HD-PMN (ely) aus dem peripheren Blut von zwei Tumorpatienten bestimmt, um den Einfluss der Isolierung durch MACS zu überprüfen (Abb. 3.5.2A). Der Mittelwert (5,2) des Chemotaktischen Index der HD-PMN (MACS) aus beiden Experimenten unterscheidet sich kaum vom Mittelwert (5,3) der HD-PMN (ely). Die Isolierung durch MACS (2.3.7) schien im Vergleich zur Isolierung durch Lyse der Erythrozyten (2.2.3) die Chemotaxis der HD-PMN nicht deutlich zu beeinflussen.

Aus diesem Grund wurden die Werte zum Chemotaktischen Index der beiden Experimente aus Abb. 3.5.2A mit den Werten der HD-PMN von zwei weiteren Tumorpatienten zusammengefasst und mit den LD-PMN der vier Tumorpatienten verglichen (Abb. 3.5.2 B). In den vier Versuchen wiesen LD-PMN signifikant (*) reduzierte Chemotaxis im Vergleich zu HD-PMN auf, unabhängig von den benutzten Chemotaxinen (Monozyten-konditioniertes Medium, 10 nM fMLP).

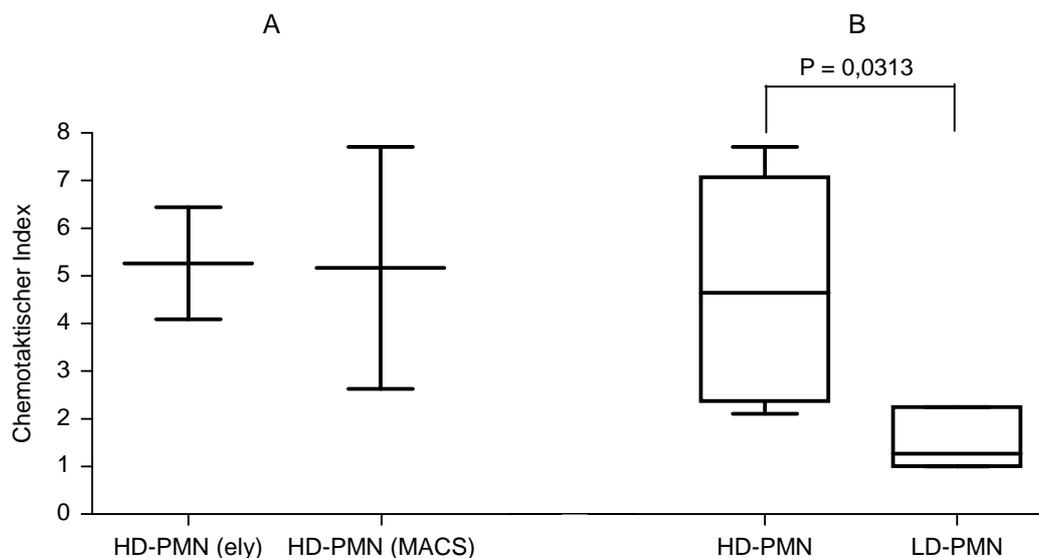


Abb. 3.5.2: Vergleich der Chemotaxis von HD-PMN (MACS), HD-PMN (ely) und LD-PMN. (A) Aus dem peripheren Blut von 2 Tumorpatienten wurden in unabhängigen Versuchen jeweils HD-PMN (MACS) und HD-PMN (ely) isoliert und mit $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ radioaktiv markiert. Nach vollständiger Lyse eines definierten Aliquots der markierten PMN wurde die γ -Strahlung in cpm (*counts per minute*) ermittelt. Der so erhaltene Wert diente als Maximalwert (100 %) für die jeweils zur Migration eingesetzten PMN. In Relation dazu wurden die Strahlungswerte der spontan durch einen permeablen Membraneinsatz migrierten PMN (spontane Migration) bzw. mittels Monozyten-konditioniertem Medium zur Migration stimulierten PMN gesetzt (induzierte Migration). Der Chemotaktische Index stellt den Quotienten aus induzierter und spontaner Migration dar. Der Mittelwert (5,2) des Chemotaktischen Index der HD-PMN (MACS) aus beiden Versuchen unterscheidet sich kaum vom Mittelwert (5,3) der HD-PMN (ely). Abgebildet ist jeweils der Mittelwert des Chemotaktischen Index aus beiden Versuchen, sowie die einzelnen Werte. (B) HD-PMN (ely) eines dritten Tumorpatienten und HD-PMN (MACS) eines vierten Tumorpatienten wurden in unabhängigen Versuchen isoliert und wie unter (A) beschrieben verwendet. Zur induzierten Migration der HD-PMN (ely) wurde Monozyten-konditioniertes Medium eingesetzt bzw. 10 nM fMLP für die HD-PMN (MACS). LD-PMN aller 4 Tumorpatienten wurden isoliert und in unabhängigen Versuchen mit den gleichen Chemotaxinen wie die jeweiligen HD-PMN stimuliert. Die Werte zum Chemotaktischen Index der HD-PMN (ely) und HD-PMN (MACS) aller 4 Tumorpatienten sind zusammengefasst dargestellt. In den 4 unabhängigen Versuchen wiesen LD-PMN eine signifikant (*) verminderte Chemotaxis im Vergleich zu HD-PMN auf (Wilcoxon matched-pairs signed rank test). Abgebildet ist ein vertikales Box-Whisker-Diagramm mit jeweils dem Median, den Quartilen und den Extremwerten

Nachdem LD-PMN zwar verstärkt an Endothelzellen adhärten, aber nur verminderte Chemotaxis aufwiesen, wurde im Folgenden die Produktion von ROI als eine Effektorfunktion untersucht.

3.5.3 LD-PMN sind in der Produktion von ROI stark eingeschränkt

Produktion von ROI kann im Luminometer nachgewiesen und quantifiziert werden (2.5.3). Dabei reagiert Luminol mit den sezernierten Radikalen unter Freisetzung von Licht, das in relativen Lichteinheiten (*Relative Light Units*, RLU) gemessen wird und proportional zur Menge der ausgeschütteten ROI ist.

Zuerst wurden HD-PMN (MACS) und HD-PMN (ely) von drei Tumorpatienten in der Produktion von ROI verglichen (Abb. 3.5.3.1). Weder in der konstitutiven Ausschüttung noch in der ersten und zweiten stimulierten Freisetzung von ROI unterschieden sich HD-PMN (MACS) und HD-PMN (ely) signifikant. Die Isolierung von HD-PMN durch MACS (2.3.7) hatte im Vergleich zur Isolierung durch Lyse der Erythrozyten (2.3.3) keinen signifikanten Einfluss auf die konstitutive und durch fMLP bzw. Zymosan induzierte Produktion von ROI.

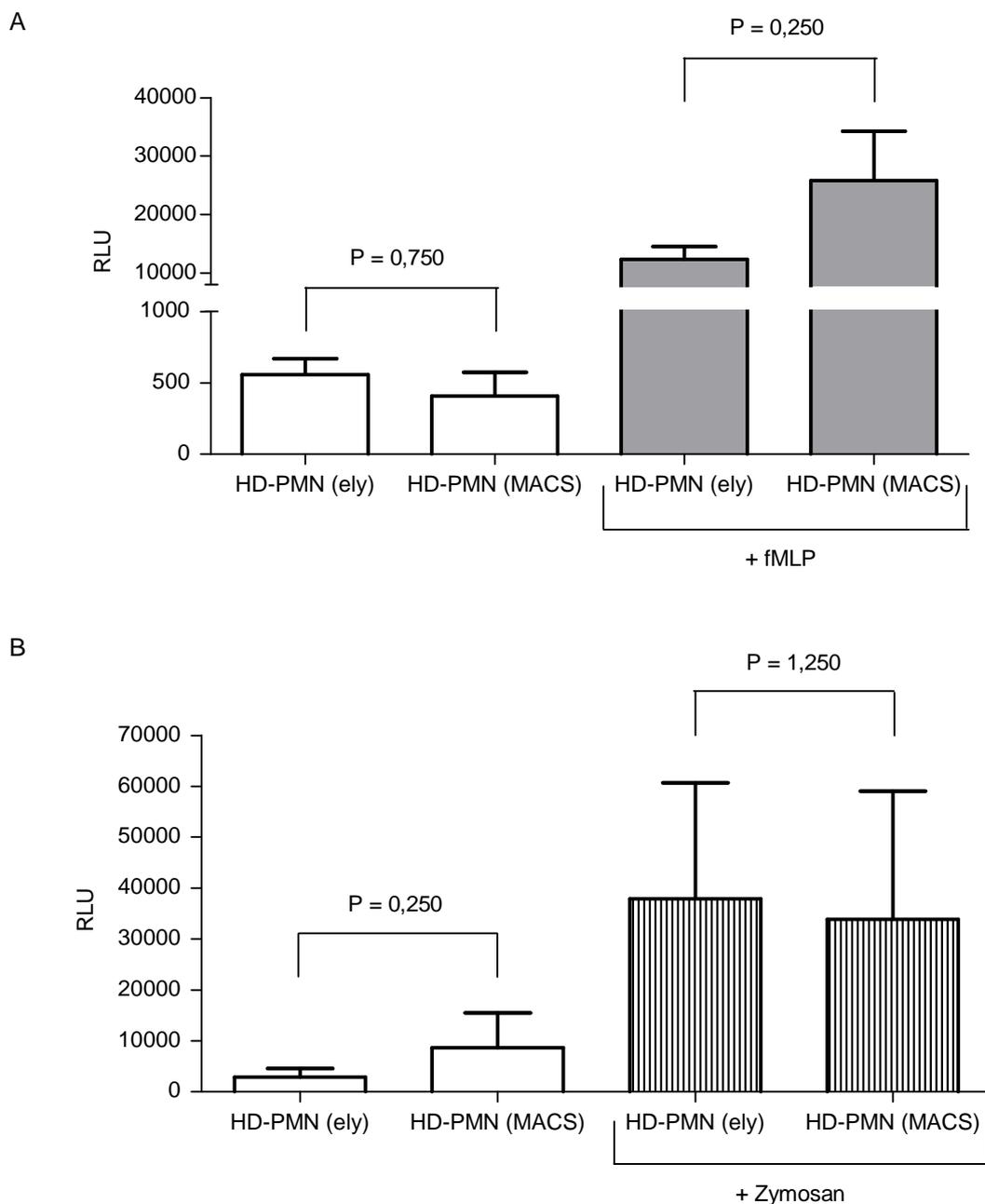


Abb. 3.5.3.1: Vergleich von HD-PMN (MACS) und HD-PMN (ely) in der Produktion von ROI. Aus dem peripheren Blut von drei Tumorpatienten wurden jeweils HD-PMN (MACS) und HD-PMN (ely) isoliert. **(A)** In unabhängigen Versuchen wurde die konstitutive Freisetzung von ROI (weiße Säulen) vor Stimulation mit 100 nM fMLP (graue Säulen) gemessen. HD-PMN (MACS) und HD-PMN (ely) unterschieden sich weder in der konstitutiven noch in der durch fMLP stimulierten Freisetzung von ROI signifikant (Wilcoxon matched-pairs signed rank test). **(B)** 15 min nach Zugabe des fMLP wurde die konstitutive Freisetzung (weiße Säulen) derselben HD-PMN wie in (A) gemessen und danach mit Zymosan die zweite stimulierte Freisetzung von ROI induziert (schraffierte Säulen). Sowohl in der konstitutiven Produktion nach erster stimulierter Freisetzung von ROI als auch in der durch Zymosan induzierten, zweiten Freisetzung von ROI unterschieden sich HD-PMN (MACS) und HD-PMN (ely) nicht signifikant (Wilcoxon matched-pairs signed rank test). In (A) und (B) sind die Werte der drei unabhängigen Versuche in Form eines vertikalen Säulendiagramms mit jeweils Mittelwert und Standardabweichung abgebildet.

Die Werte der HD-PMN (MACS) und HD-PMN (ely) aus Abb. 3.5.3.1 konnten zusammengefasst und mit den LD-PMN der Tumorpatienten verglichen werden. HD- und LD-PMN von zwei Tumorpatienten aus Abb. 3.5.3.1 wurden in parallelen Ansätzen nach fMLP ebenfalls mit Latexpartikeln stimuliert. Von zwei weiteren Tumorpatienten wurden LD- und HD-PMN isoliert und

die Produktion von ROI vor und nach Stimulation mit fMLP, sowie vor und nach zweiter Stimulation mit Latexpartikeln gemessen. Zusammengefasst ist der Vergleich der HD- und LD-PMN aus den fünf Tumorpatienten in Abb. 3.5.3.2 dargestellt.

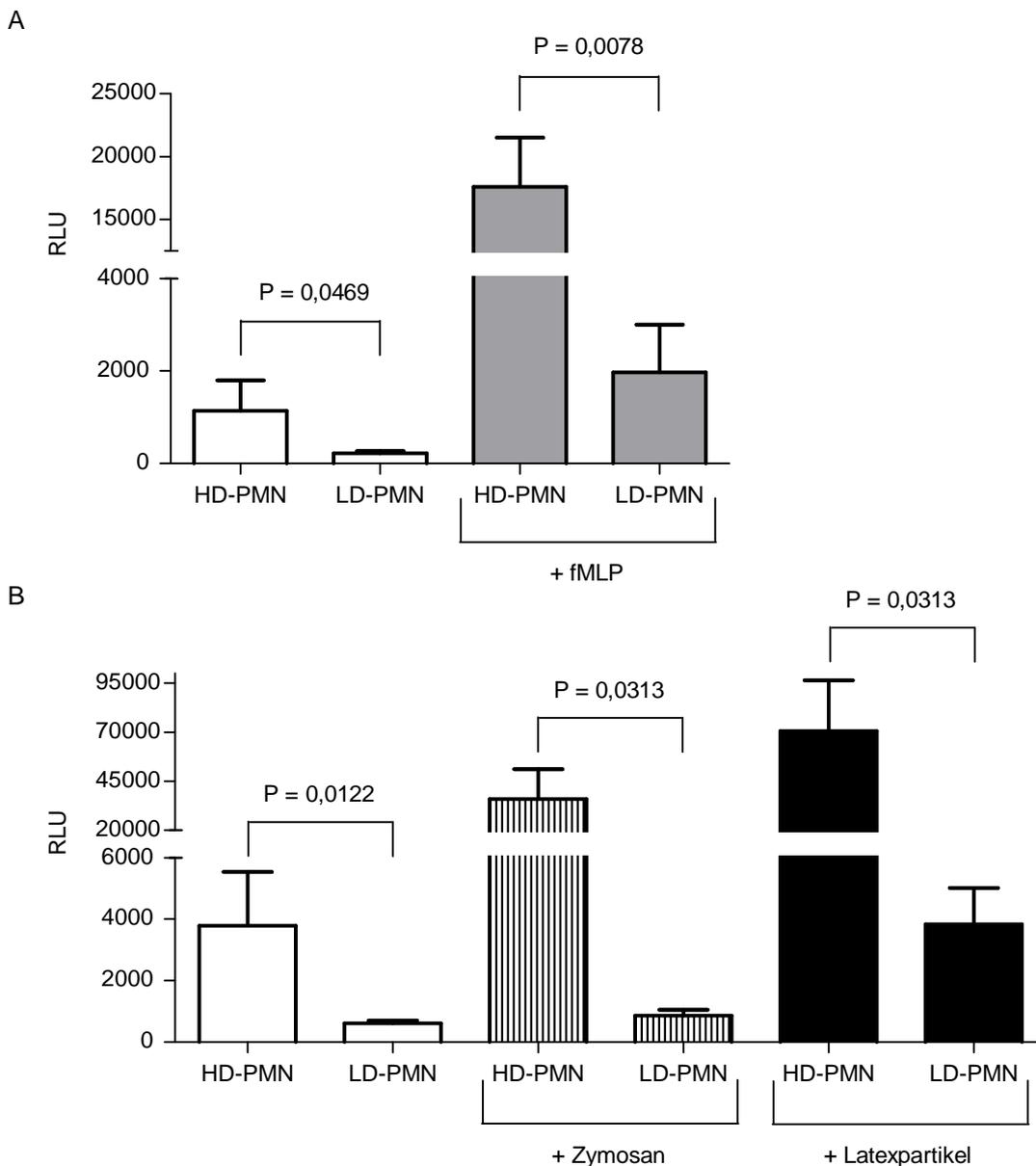


Abb. 3.5.3.2: Vergleich von LD- und HD-PMN in der Produktion von ROI. Aus dem peripheren Blut von fünf Tumorpatienten wurden HD-PMN (MACS), HD-PMN (ely) und LD-PMN isoliert. **(A)** Die konstitutive Freisetzung von ROI (weiße Säulen) vor Stimulation mit 100 nM fMLP (graue Säulen) wurde jeweils von HD-PMN und LD-PMN gemessen. LD-PMN setzten sowohl konstitutiv (*) als auch nach Stimulation mit fMLP (**) signifikant weniger ROI frei als HD-PMN (Wilcoxon matched-pairs signed rank test). **(B)** 15 min nach Zugabe des fMLP wurde die konstitutive Freisetzung (weiße Säulen) derselben PMN wie in (A) gemessen, danach bei den PMN von 3 Tumorpatienten mit Zyosan die zweite Freisetzung von ROI induziert (schraffierte Säulen) bzw. bei den PMN von 4 Tumorpatienten mit Latexpartikeln die zweite Freisetzung von ROI induziert (schwarze Säulen). LD-PMN setzten sowohl in der konstitutiven Produktion (*) nach erster Stimulation als auch in der durch Zyosan (*) bzw. Latexpartikel (*) induzierten, zweiten Produktion signifikant weniger ROI frei als HD-PMN (Wilcoxon matched-pairs signed rank test). In (A) und (B) sind die Werte der unabhängigen Versuche in Form eines vertikalen Säulendiagramms mit jeweils Mittelwert und Standardabweichung abgebildet.

LD-PMN setzten in den unabhängigen Versuchen von fünf Tumorpatienten sowohl konstitutiv (*) als auch nach erster Stimulation mit fMLP (**) und zweiter Stimulation mit Zyosan (*) bzw. Latexpartikeln (*) signifikant weniger ROI frei als HD-PMN.

Damit wiesen LD-PMN neben verminderter Chemotaxis ebenfalls stark reduzierte Freisetzung von ROI auf. Im Folgenden wurde als eine immunregulatorische Funktion die Produktion von IL-8 untersucht.

3.5.4 LD-PMN sezernieren vermindert IL-8

IL-8 wird von PMN *in vitro* sowohl nach Stimulation als auch konstitutiv sezerniert⁹¹. Zur Analyse der Freisetzung von IL-8 wurden LD-PMN und HD-PMN (MACS) mit einer Reinheit von über 99 % aus dem peripheren Blut von drei Tumorpatienten isoliert und für 24 h kultiviert (2.5.4). Anschließend wurde die Konzentration von IL-8 im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt (2.4.4). Der Vergleich von LD- und HD-PMN (MACS) zeigt (Abb. 3.5.4), dass sich LD-PMN nach Isolierung in ihrer konstitutiven Produktion von IL-8 nicht signifikant von HD-PMN (MACS) unterschieden. Nach Stimulation mit LPS setzten LD-PMN deutlich weniger IL-8 frei als HD-PMN (MACS). Die Sezernierung von IL-8 war bei den LD-PMN eines Tumorpatienten ebenfalls nach Stimulation mit Bacillus Calmette-Guérin (BCG) geringer als bei HD-PMN (MACS). HD-PMN (ely) wurden nicht in den Vergleich der Produktion von IL-8 einbezogen, da sie ohne Isolierung durch MACS nicht vollständig frei von Monozyten isoliert wurden. Außerdem gewährleisteten HD-PMN (MACS) den Vergleich von gleich behandelten PMN.

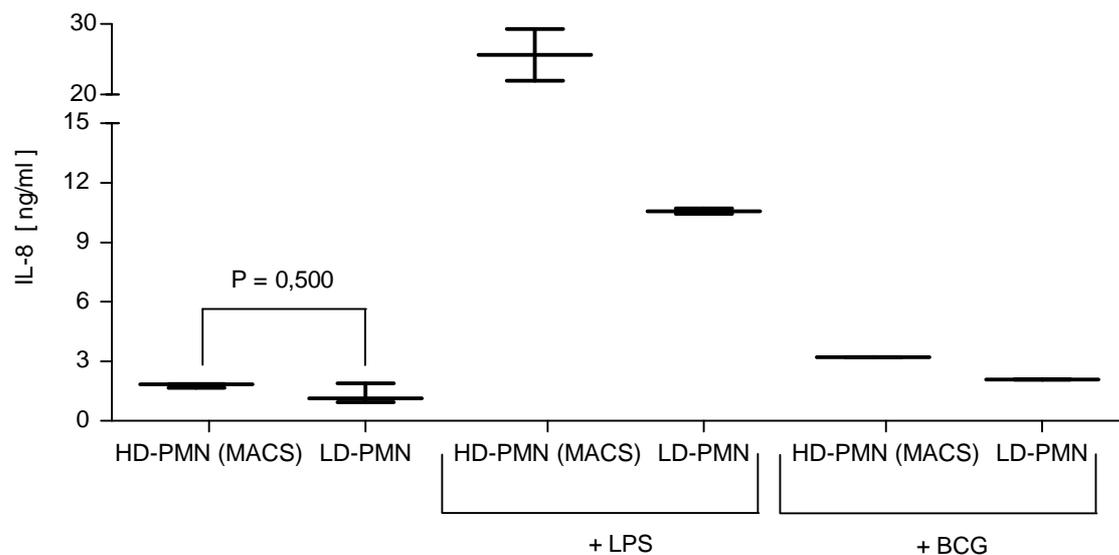


Abb. 3.5.4: Vergleich von LD- und HD-PMN (MACS) in der Produktion von IL-8. Aus dem peripheren Blut von drei Tumorpatienten wurden jeweils LD-PMN und HD-PMN (MACS) mit einer Reinheit von über 99 % isoliert und in unabhängigen Versuchen jeweils 10^6 PMN pro ml für 24 h unstimuliert kultiviert. Von 2 Tumorpatienten wurden LD- und HD-PMN (MACS) parallel mit 100 ng/ml LPS kultiviert. Vom dritten Tumorpatienten wurden LD- und HD-PMN (MACS) parallel mit BCG (Multiplizität der Infektion = 1) kultiviert. Die Konzentration von IL-8 im Kulturüberstand wurde durch ELISA ermittelt. LD-PMN unterschieden sich in der konstitutiven Produktion von IL-8 nicht signifikant von HD-PMN (MACS) (Wilcoxon matched-pairs signed rank test). Nach Stimulation mit LPS produzierten LD-PMN deutlich weniger IL-8 als HD-PMN (MACS). Nach Stimulation mit BCG setzten LD-PMN ebenfalls weniger IL-8 frei als HD-PMN (MACS). Abgebildet sind die Werte zur Konzentration von IL-8 aus drei unabhängigen Versuchen in Form eines vertikalen Box-Whisker-Diagramms mit jeweils dem Median und der Streuung der Werte.

Nachdem mit Adhäsion an Endothelzellen, Chemotaxis, Produktion von ROI und IL-8 wichtige, grundlegende Funktionen von LD-PMN untersucht wurden, wird im folgenden Abschnitt, aufgrund der unreifen Subpopulation von LD-PMN, der Einfluss auf die Proliferation von T-Zellen analysiert.

3.5.5 LD-PMN inhibieren die Proliferation von T-Zellen

Die Proliferation von T-Zellen kann *in vitro* durch Quervernetzung von Antikörpern gegen CD28 und CD3 ohne Monozyten induziert werden⁷⁵.

Aus den MNC von sechs Tumorpatienten wurden Monozyten mit anti CD14-Beads depletiert. Ein Aliquot der jeweils daraus resultierenden Lymphozyten mit LD-PMN wurde zur Proliferation mit Antikörpern gegen CD28 und CD3 eingesetzt (2.5.5), um den Einfluss der LD-PMN zu untersuchen (Abb. 3.5.5C). Aus dem Rest der Lymphozyten mit LD-PMN wurden durch MACS mit Antikörper gegen CD66b LD-PMN depletiert, um die Proliferation der T-Zellen ohne Einfluss von LD-PMN zu bestimmen (Abb. 3.5.5A). Parallel wurden zu Lymphozyten ohne LD-PMN definierte Mengen von HD-PMN (MACS) des jeweiligen Tumorpatienten gegeben und bei direkter Kokultur die Proliferation von T-Zellen induziert (Abb. 3.5.5B).

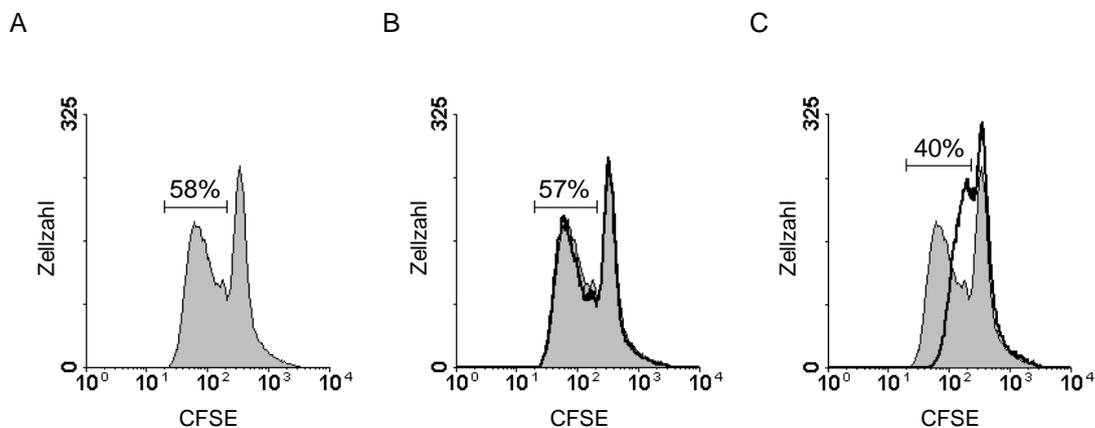


Abb. 3.5.5: Analyse des Einflusses von LD-PMN auf die Proliferation von T-Zellen. Aus MNC von 6 Tumorpatienten wurden jeweils Monozyten durch MACS mit anti CD14-Beads depletiert. Die daraus resultierenden Lymphozyten mit LD-PMN wurden mit Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE) markiert (2.5.5). Aus einem Aliquot der mit CFSE markierten Lymphozyten mit LD-PMN wurden jeweils durch MACS mit Antikörper gegen CD66b LD-PMN depletiert. Die so isolierten Lymphozyten ohne LD-PMN wurden mit quervernetzten Antikörpern gegen CD28 und CD3 für 7 Tage kultiviert und danach im Durchflusszytometer analysiert (A).

Weiter wurden zu CFSE-markierten Lymphozyten ohne LD-PMN jeweils definierte Mengen von HD-PMN (MACS) gegeben (5 % in B) und wie unter (A) beschrieben verfahren (B, fett gedrucktes Histogramm, auf grauem Histogramm aus A). Weiter wurden jeweils CFSE-markierte Lymphozyten mit LD-PMN (0,4 % in C) genauso für 7 Tage mit quervernetzten Antikörpern gegen CD28 und CD3 kultiviert und danach im Durchflusszytometer analysiert (C, fett gedrucktes Histogramm, auf grauem Histogramm aus A).

Abgebildet sind die repräsentativen Ergebnisse der Zellen eines Tumorpatienten. Bei der Auswertung der Daten wurden selektiv Lymphozyten analysiert und hier abgebildet. In Abwesenheit von LD-PMN kam es zu 2-3 Zellteilungen und 58 % Tochterzellen (A). Nach Zugabe von HD-PMN (MACS) war die Qualität der Zellteilungen nicht deutlich geändert und 57 % Tochterzellen entstanden (B). In Gegenwart von LD-PMN fanden qualitativ weniger Zellteilungen statt und es entstanden nur 40 % Tochterzellen.

Die Proliferation der T-Zellen aller untersuchten Tumorpatienten wurde weder qualitativ noch quantitativ deutlich durch HD-PMN (MACS) beeinflusst, wenn die Menge der zugegebenen HD-PMN unter 25 % blieb.

Überraschender Weise wurde die Proliferation von T-Zellen durch LD-PMN aus fünf der sechs ausgewählten Tumorpatienten inhibiert, so dass weniger Tochterzellen und weniger Tochtergenerationen der T-Zellen entstanden.

In den funktionellen Untersuchungen stellten sich LD-PMN als Neutrophile dar, die verstärkt an Endothelzellen adhärirten (3.5.1), aber reduzierte Chemotaxis aufwiesen (3.5.2). Neben der

stark eingeschränkten Produktion von ROI (3.5.3) sezernierten LD-PMN ebenfalls verminderte Mengen von IL-8 (3.5.4). Durch die Inhibition der Proliferation von autologen T-Zellen wurde die immunsuppressive Wirkung der LD-PMN demonstriert (3.5.5).

Zusammengefasst erwiesen sich LD-PMN als neutrophile Granulozyten in zum Teil unreifem Differenzierungsstadium. Besonders auffällig zeigten sie sich durch ihren immunsuppressiven Einfluss hinsichtlich der Inhibition von Proliferation autologer T-Zellen.

Der unreife Zustand aller LD-PMN und die potenzielle Unterstützung von Tumorprogression werden unter anderem im folgenden Kapitel diskutiert.

4 Diskussion

Neutrophile Granulozyten differenzieren im Knochenmark aus pluripotenten Stammzellen und werden nach abgeschlossener Reifung ins periphere Blut ausgeschüttet. Bei Entzündung werden Neutrophile als erste Zellen aus dem peripheren Blut ins Gewebe rekrutiert. Dort können sie Pathogene direkt durch Phagozytose und Produktion von ROI beseitigen, sowie als immunregulatorische Zellen fungieren¹¹. Mit Hilfe dieser Effektorfunktionen und immunregulatorischen Funktionen können Neutrophile auch an antitumoralen Immunantworten beteiligt sein. Jedoch können sie ebenso die Progression von neoplastischem Gewebe unterstützen. So wird zwar in verschiedenen Tiermodellen intratumorale Rekrutierung von Neutrophilen mit erniedrigter Tumorgenität assoziiert^{46;47}, doch wurde andererseits auch eine Förderung der Tumorprogression durch Neutrophile beobachtet^{44;54}. Tumor-assoziierte, unreife myeloide Zellen und damit auch potentielle Vorläufer von Granulozyten wurden in Tiermodellen als immunsuppressive Zellen identifiziert, die die Aktivierung von T-Zellen hemmen können^{59;60}. Jedoch ist der präzise Phänotyp solcher myeloiden Suppressorzellen in Tumorpatienten noch aufzuklären⁶⁴. In der vorliegenden Arbeit wurden Neutrophile im peripheren Blut von Tumorpatienten als unreife myeloide Suppressorzellen identifiziert und ihr Phänotyp charakterisiert.

4.1 Eindeutige Identifizierung von LD-PMN im peripheren Blut von Tumorpatienten

Granulozyten stellen mit ca. 60 % die größte Population der Leukozyten im peripheren Blut des Menschen dar. Sie werden in Neutrophile, Eosinophile und Basophile unterteilt, wobei Neutrophile mit einem Anteil von über 95 % die größte Subpopulation der Granulozyten im peripheren Blut bilden. Anhand der Expression von CD66b können Granulozyten eindeutig im Blut identifiziert werden, da keine andere Leukozytenpopulation dieses Molekül exprimiert⁷⁸. Des Weiteren unterscheiden sie sich von MNC durch ihre höhere physikalische Dichte. MNC verbleiben in typischen Dichtegradienten oberhalb des Separationsmediums, während Granulozyten unterhalb sedimentieren, wenn peripheres Blut von gesunden Spendern separiert wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden im peripheren Blut von Tumorpatienten Granulozyten nachgewiesen, die eine den MNC vergleichbare Dichte aufwiesen (3.1.1). Solche Granulozyten mit verringerter physikalischer Dichte wurden vorher nur von Schmielau und Finn im peripheren Blut von Patienten mit Karzinom des Pankreas, des Dickdarms und der Brust beschrieben⁶⁵. In dieser Arbeit wurden LD-PMN zum ersten Mal im peripheren Blut von Patienten mit urologischen Tumoren, Non-Hodgkin-Lymphom, Pleurakarzinom, Mammakarzinom und Lungenkarzinom identifiziert. Während hier LD-PMN durch Immunfluoreszenzfärbung von CD66b eindeutig nachgewiesen wurden, verwendeten Schmielau und Finn neben den Streulichteigenschaften im Durchflusszytometer die Expression von CD15. CD15 wird jedoch ebenfalls von einer Subpopulation der Monozyten exprimiert, die erhöhte Streulichtwerte aufweist⁹². Ohne Doppelimmunfluoreszenz-Färbung mit Antikörper gegen CD14 könnten daher CD15 exprimierende Monozyten mit LD-PMN verwechselt werden. Peripheres Blut von gesunden

Spendern enthält nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit keine LD-PMN. Die Arbeit von Schmielau und Finn bestätigt dieses Ergebnis und widerspricht damit der Verwechslung von CD15 exprimierenden Monozyten mit LD-PMN.

Der Unterschied zwischen Tumorpatienten und gesunden Spendern im Vorkommen von LD-PMN deutet auf Assoziation der LD-PMN mit Tumoren hin. Der Nachweis von LD-PMN im peripheren Blut von Patienten mit sieben verschiedenen Tumorentitäten spricht gegen einen für bestimmte Tumore spezifischen Effekt.

4.2 Erste erfolgreiche Isolierung hochreiner LD-PMN

Granulozyten gesunder Spender können aufgrund ihrer höheren Dichte effektiv von MNC separiert werden. Durch diskontinuierliche Dichtegradienten lassen sich auch Monozyten und Lymphozyten voneinander trennen⁶⁹, da sie sich ausreichend in ihrer Dichte unterscheiden.

Zur Isolierung von LD-PMN aus MNC von Tumorpatienten wurden in dieser Arbeit ebenfalls diskontinuierliche Dichtegradienten verwendet (3.3.1). Während Monozyten dadurch separiert werden konnten, was die Ergebnisse von Fluks⁶⁹ bestätigt, wurden LD-PMN und Lymphozyten nicht voneinander getrennt. Zellaggregate von LD-PMN und Lymphozyten haben den Analysen im Durchflusszytometer zufolge nicht vorgelegen. Die mangelnde Separation von LD-PMN und Lymphozyten legt einen zu geringen Unterschied in ihrer Dichte als einen Grund nahe, so dass diskontinuierliche Dichtegradienten, wie sie in dieser Arbeit hergestellt wurden, nicht zur Separation von Lymphozyten und LD-PMN ausreichen. Gradienten mit geringerer Differenz in der Dichte der einzelnen Phasen könnten möglicherweise Lymphozyten und LD-PMN effektiver separieren, jedoch ist durch das Sedimentieren der LD-PMN auf mehreren Interphasen mit deutlichem Verlust zu rechnen.

Eine andere oft genutzte Methode zur Tierung von Leukozyten stellt die magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS) dar. So können Granulozyten durch MACS mit anti CD15-Beads hochrein und viabel isoliert werden⁷⁰. Positive Selektion mittels anti CD15-Beads wurde in dieser Arbeit verwendet, um LD-PMN aus MNC zu isolieren (3.3.2). Dies führte zu einer Reinheit der LD-PMN von etwa 90 %, wobei Monozyten die kontaminierenden Zellen bildeten. Da, wie bereits erwähnt, eine Subpopulation der Monozyten CD15 exprimiert⁹², wurden daraufhin Antikörper gegen CD66b zur magnetischen Markierung der LD-PMN genutzt, was jedoch nicht zu einer verbesserten Reinheit der LD-PMN führte. Eine Optimierung der Isolierung von LD-PMN konnte erst nach vorhergehender Depletion der Monozyten erreicht werden (3.3.3).

Zur Depletion wurden anti CD14-Beads verwendet. Da LD-PMN CD14 (3.2.1) im Vergleich zu Monozyten sehr schwach exprimieren⁹³, werden nur in geringem Umfang LD-PMN verloren. Die darauf folgende positive Selektion der LD-PMN durch Antikörper gegen CD66b führt zu über 99 % reinen LD-PMN. Durch dieses Aufreinigungsprotokoll werden viable Zellen isoliert, Apoptose wird nicht induziert (3.4.1). Unter gleichen Bedingungen isolierte HD-PMN zeigen ebenfalls keine signifikanten Mengen apoptotischer Zellen und bestätigen damit das Ergebnis von Zahler et al.⁷⁰ zur Isolierung von Granulozyten durch MACS.

4.3 LD-PMN stellen unreife Neutrophile dar

Neutrophile Granulozyten differenzieren während der Hämatopoese durch den Wachstumsfaktor G-CSF aus Granulozyten/Monozyten-Kolonie bildenden Einheiten. Myeloblasten entwickeln sich dabei über mehrere, differenzierbare Zwischenstufen zu reifen segmentkernigen Neutrophilen, die ins periphere Blut ausgeschüttet werden. Unreifen Neutrophilen wurde bisher in der Immunologie nur wenig Beachtung geschenkt, so dass die Literatur zu ihrem Phänotyp sehr beschränkt ist. Im Gegensatz dazu sind reife Neutrophile und Veränderungen ihres Phänotyps durch Infektionen, Zytokine und zahlreiche bakterielle Stimuli vielseitig untersucht.

Unreife Neutrophile können im peripheren Blut in Form von Stabkernigen verstärkt bei Patienten mit Infektionen vorliegen⁹⁴. Des Weiteren werden durch Injektion von G-CSF oder GM-CSF vermehrt stabkernige Neutrophile ins periphere Blut freigesetzt⁹⁵. Beim Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit lag aber sowohl nach Analyse der Konzentration des C-reaktiven Proteins als auch nach Zahl der stabkernigen Neutrophilen im peripheren Blut in keinem Fall eine Infektion vor. Ebenso wurde kein Tumorpatient des ausgewählten Kollektivs vor Blutentnahme mit G-CSF oder GM-CSF behandelt.

Dennoch lagen die LD-PMN zum großen Teil stabkernig vor und erwiesen sich in Färbungen nach Pappenheim als Neutrophile (3.4.2). LD-PMN stellen also Neutrophile dar, die nach ihrer Kernmorphologie zum großen Teil als unreif einzustufen sind. Im Median über alle untersuchten Patienten betrug der Anteil der LD-PMN 1 % der MNC (3.1.1). Da MNC etwa 40 % aller Leukozyten im peripheren Blut repräsentieren, sind LD-PMN in ihrer geringen Zahl im Vergleich zu Neutrophilen (HD-PMN) bzw. Leukozyten in den klinischen Blutanalysen nicht als Population aufgefallen.

Der ausführlich untersuchte Phänotyp der LD- und HD-PMN bestätigt den Ausschluss von Infektionen oder Zytokinen als Ursache für das Vorkommen von unreifen Neutrophilen im peripheren Blut der hier analysierten Tumorpatienten. Expression von CD83⁹⁶ und deutlich gesteigerte Expression von CD14⁹⁷ wurden für Neutrophile im peripheren Blut von Patienten mit bakterieller Infektion beschrieben. LD- und HD-PMN der untersuchten Tumorpatienten exprimierten kein CD83 und keine erhöhten Mengen an CD14 (3.2.1), was die klinischen Befunde zur Abwesenheit von Infektionen belegt. Weiterhin wurde die Expression von CD80, CD86 und MHC Klasse II auf Neutrophilen aus dem peripheren Blut von Patienten mit chronischer Entzündung nachgewiesen^{96;98}. LD- und HD-PMN exprimierten jedoch keines dieser Moleküle, so dass eine chronische Entzündung in Form von primärer Vaskulitis bei den hier untersuchten Tumorpatienten ebenfalls ausgeschlossen werden kann. LD-PMN aus Tumorpatienten sind ohne Expression von CD80, CD86 und MHC Klasse II auch nicht mit Antigenpräsentation assoziiert wie beispielsweise Neutrophile aus Patienten mit Wegener-Granulomatose^{96;98}.

Neben diesen pathologischen Fällen wurde gesteigerte Expression von CD14⁹⁹ und CD11b¹⁰⁰ nach Injektion von GM-CSF beobachtet. Nach Injektion von IFN γ ¹⁰¹ oder GM-CSF¹⁰² wurde auch die Expression von MHC Klasse II auf Neutrophilen nachgewiesen. Die fehlende Expression von MHC Klasse II und nicht gesteigerte Expression von CD14 und CD11b (3.2.1) scheinen demnach Einfluss von GM-CSF und IFN γ auf LD- und HD-PMN auszuschließen. Zytokine wie TNF α , IL-6

und IL-8 regulieren *in vitro* die Expression von CD11b auf Neutrophilen hoch¹⁰³. Die unauffällige Expression von CD11b auf HD-PMN und die schwächere auf LD-PMN sprechen jedoch gegen eine Aktivierung dieser Zellen durch diese Zytokine.

Die Expression von CD66b wird sowohl *in vitro* durch TNF α ¹⁰³, GM-CSF¹⁰³, LPS⁸⁰ und fMLP⁷⁹, als auch *in vivo* durch GM-CSF¹⁰⁰ verstärkt. Dagegen scheint die erhöhte Expression von CD66b auf LD-PMN nach Ausschluss von Zytokineffekten und Infektionen mehr im Differenzierungsgrad begründet zu sein. So ist bekannt, dass während der Reifung von Neutrophilen aus dem Knochenmark gesunder Spender CD66b transient hochreguliert wird. Lund-Johansen und Terstappen beschrieben Promyelozyten und Myelozyten mit stärkerer Expression von CD66b als Metamyelozyten und Stabkernige, sowie weiterer Abnahme von CD66b auf reifen, segmentkernigen Neutrophilen¹⁰⁴. Ihre Ergebnisse bestätigen ebenfalls für die Zellen des Knochenmarks, dass CD66b nur von Granulozyten und ihren Vorläufern exprimiert wird. Weiter zeigten sie, dass CD66b nicht von CD34⁺-Vorläuferzellen und Myeloblasten exprimiert wird. Wenn der Vergleich von LD-PMN als unreife Neutrophile im peripheren Blut von Tumorpatienten mit Vorläuferzellen von Neutrophilen im Knochenmark gesunder Spender zulässig ist, sind LD-PMN weiter differenziert als Myeloblasten. Da CD66b homogen von LD-PMN stärker exprimiert wird als von HD-PMN, scheint nicht nur die stabkernige Subpopulation, sondern die Gesamtheit der LD-PMN unreif zu sein.

Dafür spricht ebenfalls ihre Expression von CD16 (3.2.1). Erst im Stadium der Metamyelozyten und Stabkernigen beginnt die Expression von CD16 und nimmt bis zum reifen Segmentkernigen kontinuierlich zu^{2;105;106}. Diese Beobachtungen werden durch die Korrelation des Anteils der CD16^{low} LD-PMN mit dem Anteil der stabkernigen LD-PMN (3.4.3) bestätigt. Auf der anderen Seite bedeutet diese Kinetik der Expression von CD16, dass neben den CD16^{low} auch die CD16^{high} LD-PMN unreif sein könnten, da sie eine signifikant schwächere Expression von CD16 als HD-PMN aufwiesen. Apoptose¹⁰⁷ ist als Grund für schwächere Expression von CD16 durch die Viabilität isolierter LD-PMN ausgeschlossen. Da Neutrophile bei Apoptose CD15 herunterregulieren¹⁰⁸, spricht auch die homogen erhöhte Expression von CD15 gegen apoptotische LD-PMN. Die Abspaltung von CD16 auf der Oberfläche¹⁰⁹ von LD-PMN könnte prinzipiell eine Erklärung sein und kann hier nicht ausgeschlossen werden.

CD15 wird von den unreifen Neutrophilenstadien der Promyelozyten, Myelozyten, Metamyelozyten und Stabkernigen stärker exprimiert als von reifen Neutrophilen². Die homogen erhöhte Expression von CD15 auf LD-PMN im Vergleich zu HD-PMN unterstreicht damit das unreife Differenzierungsstadium aller LD-PMN und belegt außerdem die Abwesenheit von Eosinophilen, die CD15 nicht exprimieren⁸¹. Expression von CD14 beginnt im Stadium der Stabkernigen¹¹⁰ und erreicht erst auf reifen Neutrophilen die maximal konstitutive Expressionsstärke. Folglich bestätigt die signifikant schwächere Expression von CD14 auf LD-PMN ihr unreifes Differenzierungsstadium. Über die Expression von MHC Klasse I auf Vorläufern von Neutrophilen ist bisher nichts bekannt. Unter Berücksichtigung des unreifen Differenzierungsstadiums der LD-PMN und der schwächeren Expression von MHC Klasse I im Vergleich zu reifen HD-PMN (3.2.1) scheint dieser Rezeptor während der Reifung von Neutrophilen zuzunehmen. Allerdings handelt es sich bei den unreifen Neutrophilen dieser Arbeit

um LD-PMN aus dem peripheren Blut von Tumorpatienten, so dass die Übereinstimmung mit Vorläufern von Neutrophilen aus gesunden Spendern noch geprüft werden muss. Die Expression von CD11b beginnt nach Terstappen et al. im Stadium der Promyelozyten und wird auf Myelozyten weiter hochreguliert bis nach den Stadien der Metamyelozyten und Stabkernigen eine maximale konstitutive Expression auf reifen Neutrophilen erreicht ist². Die signifikant schwächere Expression von CD11b auf LD-PMN im Vergleich zu HD-PMN bestätigt daher den unreifen Status aller LD-PMN.

Unreife Neutrophile gesunder Spender weisen in durchflusszytometrischen Analysen eine erhöhte Vorwärts-Streuung (FSC) von fokussierten Lichtstrahlen auf¹¹⁰. So wurden für Myeloblasten, Promyelozyten und Myelozyten gesteigerte FSC-Werte beobachtet². Den Stadien der Metamyelozyten und Stabkernigen wurden ebenfalls höhere FSC-Werte zugeordnet als segmentkernigen, reifen Neutrophilen². Der unreife Zustand aller LD-PMN spiegelt sich demnach auch in ihrem homogen erhöhten FSC-Wert wider (3.1.2). Erhöhte FSC-Werte werden durch gesteigertes Zellvolumen bedingt. Ob das gesteigerte Zellvolumen der einzige Grund für die verminderte Dichte der LD-PMN ist, kann anhand der erhobenen Daten nicht bestimmt werden.

Zusammengefasst weist die anhand der Expression von CD16 identifizierte Heterogenität der LD-PMN auf zwei verschiedene Reifungsstadien hin. Aufgrund der segmentierten Kernmorphologie, nur minimal schwächeren Expression von CD11b, CD14 und CD16, aber stärkeren Expression von CD66b und CD15 repräsentieren frühe segmentkernige Neutrophile eine unreife Subpopulation der LD-PMN. Stabkernige Neutrophile stellen der Kernmorphologie nach die zweite unreife Subpopulation dar, die der beginnenden Expression von CD16 zufolge auch Metamyelozyten einschließen kann. Dieses Ergebnis entkräftet klar die Hypothese von Schmielau und Finn⁶⁵, nach der LD-PMN aktivierte reife Neutrophile sind. Die schwächere Expression von CD11b, CD14 und CD16 widerspricht der Anwesenheit aktivierter Neutrophiler in der LD-PMN-Fraktion, da aktivierte reife Neutrophile für gewöhnlich gesteigerte Expression von CD11b^{100;103}, CD14^{97;99} und CD16¹⁰⁰ aufweisen.

Eine Ursache für die Präsenz unreifer Neutrophiler im peripheren Blut von Tumorpatienten und nicht im Blut gesunder Spender könnte die massive Infiltration von Tumoren durch Neutrophile sein. Die damit verbundene, verstärkte Ausschüttung von Neutrophilen aus dem Knochenmark könnte eine erhöhte Freisetzung von Stabkernigen hervorrufen. Eine andere Möglichkeit ist, dass in Tumorpatienten die neutrophile Granulopoese beeinträchtigt ist und nicht alle Neutrophilen vollständig ausreifen, bevor sie ins periphere Blut ausgeschüttet werden. Tumore produzieren z.B. G-CSF^{111;112} und GM-CSF¹¹², was zur vermehrten Ausschüttung von unreifen Neutrophilen führen kann⁹⁹. Darüber hinaus könnte auch ein anderer, von Tumoren freigesetzter Faktor direkt oder indirekt die Anzahl der LD-PMN im peripheren Blut beeinflussen.

Die Expressionsverhältnisse von CD16, CD14 und CD11b auf LD- und HD-PMN müssen nicht zwangsläufig gegen tumoral gebildetes G-CSF als Grund für unreife Neutrophile im peripheren Blut von Tumorpatienten sprechen. In den zitierten Arbeiten von de Haas et al.¹⁰⁰ und Carulli⁹⁹ zur gesteigerten Expression von CD11b, CD16 und CD14 auf Neutrophilen (S. 48-50) nach Injektion von G-CSF wurden Dosen injiziert, die nicht der Menge von tumoral freigesetztem G-CSF entsprechen müssen. Unabhängig davon könnte die Wirkung von tumoralem G-CSF auf das

Knochenmark einem anderen Mechanismus folgen als subkutan injiziertes G-CSF. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse zu den funktionellen Eigenschaften von LD-PMN analysiert und dabei die Diskussion zu aktivierten Neutrophilen in der LD-PMN-Fraktion fortgesetzt.

4.4 Funktionelle Eigenschaften von LD-PMN

Aktivierte reife Neutrophile weisen neben Veränderungen im Phänotyp auch modifizierte Funktionen auf. So zeigen beispielsweise durch IL-8 voraktivierte Neutrophile eine gesteigerte Produktion von ROI nach Stimulation mit bakteriellen Faktoren^{103;113}. Weitere Funktionen wie Adhäsion und Produktion von Zytokinen können ebenfalls durch Voraktivierung verstärkt werden¹⁴.

Interessanterweise wiesen LD-PMN eine verstärkte Adhäsion an Endothelzellen auf (3.5.1). Ursache dafür könnte Aktivierung durch Entzündungsmediatoren sein, wie HD-PMN nach Stimulation mit PF4 zeigen. Unter Berücksichtigung der LD-PMN als unreife Neutrophile scheint ihre erhöhte Adhäsion jedoch in der gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen infolge ihres Differenzierungsgrades begründet zu sein¹⁰⁴. So vermittelt das Selektin CD15 Adhärenz an Endothelzellen¹¹⁴ und auch CD66b ist als Adhäsionsmolekül beschrieben¹¹⁵. Hetherington und Quie berichteten über stabkernige Neutrophile, dass sie in größerer Zahl als segmentkernige Neutrophile an Nylon-Wollfasern adhäreren¹¹⁶. Dies ist zwar nicht mit der Adhärenz an Endothelzellen vergleichbar, spricht aber für eine konstitutiv verstärkte Adhäsivität von späten, unreifen Neutrophilen. Ob die gesteigerte Adhärenz von LD-PMN nur aus dem Differenzierungsgrad und der spezifischen Expression resultiert oder durch Stimulation *in vivo* induziert wird, kann hier nicht geklärt werden. Dessen ungeachtet könnten LD-PMN aufgrund ihrer verstärkten Adhäsivität an Endothelzellen in viel größerer Zahl im peripheren Blut vorliegen, als in dieser Arbeit anhand der frei zirkulierenden LD-PMN bestimmt wurde.

Wichtig für die Analyse der Adhäsion von LD-PMN war, den Einfluss der Isolierung durch MACS zu überprüfen. Jedoch hatten sowohl der Einsatz von MACS-Säulen, als auch der in dieser Arbeit genutzte Antikörper gegen CD66b keinen Einfluss auf die Adhäsion. Im Gegensatz dazu beschrieben Skubitz et al.⁷⁸ und Ruchaud-Saragano et al.¹¹⁷ verstärkte Adhäsion von Granulozyten an Endothelzellen durch Antikörper gegen CD66b. Sie verwendeten zwar denselben Antikörperklon wie in der vorliegenden Arbeit, aber in zehnfach höherer Konzentration und direkt in den Adhäsionsansätzen mit Endothelzellen und Granulozyten.

Die Isolierung von Granulozyten durch MACS mit Antikörper gegen CD66b verändert der vorliegenden Arbeit zufolge ebenfalls nicht die Chemotaxis (3.5.2). LD-PMN wiesen gegenüber HD-PMN eine deutlich verminderte Chemotaxis auf. Dies bestätigte sich sowohl bei Verwendung von fMLP als auch bei Monozyten-konditioniertem Medium, welches IL-8 enthielt. Dabei sollte über zwei verschiedene Rezeptoren Chemotaxis induziert werden, doch LD-PMN migrierten kaum, was auf allgemein reduzierte Chemotaxis hinweist. Nach Glasser et al. erwerben Neutrophile die Fähigkeit zur Chemotaxis erst im Stadium der Stabkernigen. Darüber hinaus beobachteten sie für Stabkernige nur 50 % der chemotaktischen Aktivität von Segmentkernigen¹¹⁸. Dies wird von Carulli bestätigt, der über reduzierte Migration von unreifen Neutrophilen in entzündetes Gewebe berichtete⁹⁹. Da es sich bei den untersuchten LD-PMN

jedoch um unreife Neutrophile aus Tumorpatienten handelt, ist ein Vergleich mit unreifen Neutrophilen aus Tumorfreen Spendern nicht ohne weiteres möglich. Doch scheinen sich LD-PMN in ihrer Chemotaxis nicht wesentlich von unreifen Neutrophilen aus gesunden Spendern zu unterscheiden. Die reduzierte Chemotaxis von LD-PMN könnte bedeuten, dass sie *in vivo* kaum aus dem Blut rekrutiert werden. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass hier *in vitro* nur proinflammatorische Chemotaxine als Stimuli verwendet wurden. *In vivo* können andere Chemotaxine freigesetzt werden, durch die LD-PMN rekrutiert werden.

Hinsichtlich der Kapazität unreifer Neutrophiler zur Produktion von IL-8 ist bisher nichts bekannt. LD-PMN unterschieden sich in der konstitutiven Freisetzung von IL-8 nicht signifikant von HD-PMN, während sie nach Stimulation mit LPS oder BCG weniger IL-8 produzierten (3.5.4). Dieses Ergebnis scheint dem Bild der sukzessiven Entwicklung von Funktionen während der neutrophilen Granulopoese in dem Sinne zu entsprechen, dass die Fähigkeit zur Produktion von IL-8 erst in reifen Neutrophilen vollständig induzierbar ist. Die verminderte Freisetzung von IL-8 spricht ebenfalls gegen die Hypothese von Schmielau und Finn, nach der es sich bei LD-PMN um aktivierte reife Granulozyten handeln soll⁶⁵. Aktivierte Neutrophile weisen eine gesteigerte Freisetzung von IL-8 auf⁷. Einem solchen aktivierten Status der LD-PMN widerspricht ebenfalls ihre stark eingeschränkte Produktion von ROI (3.5.3).

Auch diese funktionelle Eigenschaft wurde nicht durch die Isolierung mittels Antikörper gegen CD66b beeinflusst. Im Gegensatz dazu berichteten Lund-Johansen¹¹⁹ und Ruchaud-Sparagano¹¹⁷ über gesteigerte Freisetzung von ROI durch Antikörper gegen CD66b nach Stimulation mit fMLP. Sie verwendeten zwar denselben Antikörperklon wie in der vorliegenden Arbeit, aber die doppelte bis 50fache Konzentration. Bestätigt wird das Ergebnis zur Isolierung durch MACS von Zahler et al.⁷⁰, die nach Verwendung von anti CD15-Beads ebenfalls keinen Einfluss auf die Produktion von ROI fanden.

Unter Berücksichtigung der LD-PMN als unreife Neutrophile aus Tumorpatienten bestätigt ihre drastisch reduzierte Produktion von ROI die Beobachtungen von Glasser et al.¹¹⁸ und Zakhireh et al.¹²⁰. Sie stellten fest, dass sich die Fähigkeit zur Produktion von ROI erst ab dem Stadium der Metamyelozyten entwickelt, die sich minimal zur Freisetzung von ROI stimulieren lassen. Zwar beschrieben sie im Vergleich zu Metamyelozyten gesteigerte Freisetzung von ROI bei Stabkernigen und frühen Segmentkernigen des Knochenmarks, doch betrug der Umfang der Produktion von ROI weniger als 50 % der Freisetzung durch reife Neutrophile aus dem peripheren Blut. Damit entsprechen LD-PMN auch in dieser Funktion unreifen Neutrophilen aus dem Knochenmark gesunder Spender.

Die stark eingeschränkte Produktion von ROI widerlegt eine weitere Darstellung von Schmielau und Finn⁶⁵. In ihren Ansätzen wurde peripheres Blut gesunder Spender mit fMLP stimuliert und es konnten nach Dichtegradientenzentrifugation Granulozyten in der MNC-Fraktion nachgewiesen werden. Aus diesem Modellversuch schlossen sie, dass Granulozyten geringerer Dichte in den MNC von Tumorpatienten aktiviert seien. Weiter stimulierten sie T-Zellen gesunder Spender mit Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) und Ionomycin in Kokultur mit Granulozyten. Diese Stimulation führte zur Produktion von IFN γ bei T-Zellen und zur Freisetzung von ROI bei Granulozyten. Durch die freigesetzten ROI der Granulozyten beobachteten sie eine Verminderung der Zahl IFN γ -

produzierender T-Zellen. Sie schlossen daraus, dass aktivierte Granulozyten in Form von LD-PMN ROI freisetzen und auf diese Weise T-Zellen im peripheren Blut von Tumorpatienten supprimieren würden. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zum Phänotyp (4.3) und den funktionellen Eigenschaften (4.4) sind LD-PMN aus Tumorpatienten weder aktivierte Granulozyten, noch produzieren sie ROI in vergleichbarem Umfang wie HD-PMN. LD-PMN repräsentieren unreife Neutrophile, die eine stark eingeschränkte Kapazität zur Generierung von ROI aufweisen.

Physiologische Konsequenzen der LD-PMN werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

4.5 LD-PMN supprimieren die Proliferation von T-Zellen

T-Zellen aus Tumorgewebe sowie aus peripherem Blut von Tumorpatienten lassen sich *in vitro* nur vermindert zu Proliferation stimulieren^{28;121}. Als mögliche Ursachen wurden unter anderem induzierte Apoptose in T-Zellen^{30;122} und reduzierte Expression der CD3 ζ -Kette³³⁻³⁹ bei Patienten mit verschiedensten Tumorentitäten beschrieben. Als Auslöser derartiger Suppression von T-Zellen wurden unter anderem unreife myeloide Suppressorzellen in Tumor-tragenden Mäusen⁵⁹ und Tumorpatienten⁶¹ identifiziert.

Zur Evaluierung des suppressiven Charakters von LD-PMN wurden in der vorliegenden Arbeit Lymphozyten aus dem peripheren Blut von Tumorpatienten isoliert und die Proliferation der T-Zellen durch Antikörper gegen CD3 und CD28 induziert (3.5.5). In allen untersuchten Fällen wurde eine im Vergleich zu T-Zellen von gesunden Spendern reduzierte Proliferation beobachtet, was die bereits erwähnten Beobachtungen von Miescher et al.²⁸ und Whiteside et al.¹²¹ bestätigt.

Die Proliferation der T-Zellen von Tumorpatienten änderte sich durch direkte Kokultur mit autologen HD-PMN weder in der Zahl der Tochtergenerationen, noch im Anteil der Tochterzellen. Im Gegensatz dazu bildeten sich bei direkter Kokultur mit LD-PMN weniger Tochtergenerationen und insgesamt weniger Tochterzellen. Das heißt, LD-PMN aus Tumorpatienten supprimieren die *in vitro* induzierte Proliferation von T-Zellen und sie stellen unreife Neutrophile dar (4.3). Die Beobachtungen von Gabrilovich et al.⁵⁹ und Melani et al.⁶⁰ zu unreifen myeloiden Suppressorzellen in Tumor-tragenden Mäusen wurden somit durch die vorliegende Arbeit auf Tumorpatienten übertragen.

Kusmartsev und Gabrilovich beschrieben unreife myeloide Suppressorzellen aus Tumor-tragenden Mäusen als eine heterogene Population, bestehend aus dendritischen Zellen, Makrophagen und Granulozyten¹²³. Almand et al. wiesen ebenfalls Makrophagen und dendritische Zellen als unreife myeloide Suppressorzellen in Patienten mit Karzinomen der Lunge, der Brust, des Kopfes und des Halses nach⁶¹, während Young et al. unreife myeloide Suppressorzellen aus den letztgenannten Tumorpatienten zu Monozyten differenzieren konnten⁶³. Zea et al. wiesen myeloide Suppressorzellen in Patienten mit Nierenkarzinom nach und spekulierten über unreife dendritische Zellen, Promonozyten, sowie Myelozyten und Metamyelozyten⁶². In der vorliegenden Arbeit wurden eindeutig unreife Neutrophile als myeloide Suppressorzellen aus Tumorpatienten identifiziert. Inwieweit andere myeloide Suppressorzellen, wie dendritische Zellen oder Monozyten eine Rolle spielen, bleibt nach den Ergebnissen meiner Arbeit offen.

Weiter beobachteten Schmielau und Finn im Blut von Tumorpatienten T-Zellen mit reduzierter Expression der CD3 ζ -Kette und verminderter Produktion von Zytokinen nach Stimulation mit PMA und Ionomycin⁶⁵. Die Ursache für diese Suppression von T-Zellen ordneten sie, wie schon erwähnt, der Freisetzung von ROI aus LD-PMN zu. Diese Vermutung wurde jedoch bereits in 4.4 mit dem unreifen Differenzierungsstadium der LD-PMN (4.3) und ihrer stark eingeschränkten Produktion von ROI (3.5.3) widerlegt. Young et al. bestimmten den Transformierenden Wachstumsfaktor- β (TGF- β) als Mediator der Suppression von T-Zellen durch unreife myeloide Suppressorzellen⁶³, was für LD-PMN im Rahmen dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden kann, aber aufgrund des unreifen Differenzierungsstadiums unwahrscheinlich erscheint. Zea et al. fanden neben reduzierter Expression der CD3 ζ -Kette, sowie verminderter Proliferation und Produktion von Zytokinen, ebenfalls erhöhte Aktivität von Arginase in den MNC von Tumorpatienten und wiesen Arginase I in unreifen myeloiden Suppressorzellen nach⁶². Arginase I wird konstitutiv von Granulozyten exprimiert und hydrolysiert Arginin zu Ornithin und Harnstoff¹²⁴. Arginin ist eine essentielle Aminosäure für den Expressionszyklus der CD3 ζ -Kette¹²⁵. Nach Bindung von Antigen oder Antikörper gegen CD3 wird die CD3 ζ -Kette internalisiert, degradiert, neu synthetisiert und reexprimiert. Bei Arginin-Mangel nimmt die Expression der CD3 ζ -Kette ab, was zu verminderter Proliferation und reduzierter Produktion von Zytokinen führt. Zea et al. legten deshalb Depletion von Arginin durch unreife myeloide Suppressorzellen der Suppression von T-Zellen in Tumorpatienten zugrunde. Dieser Mechanismus scheint ebenso für die Suppression der Proliferation von T-Zellen durch LD-PMN aus Tumorpatienten möglich. Die Beschreibung der unreifen myeloiden Suppressorzellen von Zea et al.⁶² als polymorphkernige Zellen in den MNC von Tumorpatienten mit Expression von CD15 und Abwesenheit von CD14 trifft auf die in der vorliegenden Arbeit charakterisierten LD-PMN zu.

Von Schmielau und Finn wurde des Weiteren gezeigt, dass ein erhöhter Anteil von LD-PMN mit dem verminderten Anteil IFN γ -produzierender T-Zellen korreliert⁶⁵. Diese Korrelation sowie die in 3.5.5 nachgewiesene immunsuppressive Funktion der LD-PMN unterstreichen die erforderliche Berücksichtigung unreifer immunsuppressiver Neutrophiler im peripheren Blut von Tumorpatienten bei der immuntherapeutischen Behandlung, welche T-Zellen zur spezifischen Bekämpfung von Tumorzellen instrumentalisieren will.

Abschließend ist festzuhalten, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit eindeutig unreife Neutrophile im peripheren Blut von Tumorpatienten mit fünf verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen wurden und erstmals ein Protokoll zu ihrer hochreinen Isolierung erfolgreich entwickelt wurde. Ihr immunsuppressiver Charakter wurde anhand der Inhibition der Proliferation von T-Zellen demonstriert und beruht nicht auf Freisetzung von ROI.

Ein zukünftiges Ziel besteht in der Aufklärung des suppressiven Mechanismus der in dieser Arbeit charakterisierten unreifen Neutrophilen in Form von LD-PMN aus dem Blut von Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen. Die Gabe von Pharmaka zur spezifischen Induktion weiterer Reifung der unreifen Neutrophilen könnte immuntherapeutische Behandlungen unterstützen. Denkbar ist die Anwendung von Retinolsäure oder entsprechender Derivate, welche

die Differenzierung von unreifen myeloiden Zellen zu reifen Neutrophilen induzieren¹²⁶ und bereits klinisch genutzt werden¹²⁷.

Literatur

Reference List

1. Di Carlo, E., G. Forni, P. Lollini, M. P. Colombo, A. Modesti, and P. Musiani. 2001. The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. *Blood* 97:339-345.
2. Terstappen, L. W., M. Safford, and M. R. Loken. 1990. Flow cytometric analysis of human bone marrow. III. Neutrophil maturation. *Leukemia* 4:657-663.
3. Borregaard, N. and J. B. Cowland. 1997. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89:3503-3521.
4. Patel, K. D., S. L. Cuvelier, and S. Wiehler. 2002. Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment. *Semin. Immunol.* 14:73-81.
5. Albelda, S. M., C. W. Smith, and P. A. Ward. 1994. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J.* 8:504-512.
6. Matsumoto, T., K. Yokoi, N. Mukaida, A. Harada, J. Yamashita, Y. Watanabe, and K. Matsushima. 1997. Pivotal role of interleukin-8 in the acute respiratory distress syndrome and cerebral reperfusion injury. *J. Leukoc. Biol.* 62:581-587.
7. Witko-Sarsat, V., P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre, and L. Halbwachs-Mecarelli. 2000. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80:617-653.
8. Dalpiaz, A., S. Spisani, C. Biondi, E. Fabbri, M. Nalli, and M. E. Ferretti. 2003. Studies on human neutrophil biological functions by means of formyl-peptide receptor agonists and antagonists. *Curr. Drug Targets. Immune. Endocr. Metabol. Disord.* 3:33-42.
9. Levy, O. 1996. Antibiotic proteins of polymorphonuclear leukocytes. *Eur. J. Haematol.* 56:263-277.
10. Clark, R. A. 1999. Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J. Infect. Dis.* 179 Suppl 2:S309-S317.
11. Nathan, C. 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6:173-182.
12. Kasama, T., R. M. Strieter, T. J. Standiford, M. D. Burdick, and S. L. Kunkel. 1993. Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha. *J. Exp. Med.* 178:63-72.
13. Lapinet, J. A., P. Scapini, F. Calzetti, O. Perez, and M. A. Cassatella. 2000. Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta (IL-1beta), IL-8, macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and gamma interferon-inducible protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococcal outer membrane vesicles. *Infect. Immun.* 68:6917-6923.

14. Yamashiro,S., H.Kamohara, J.M.Wang, D.Yang, W.H.Gong, and T.Yoshimura. 2001. Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *J.Leukoc.Biol.* 69:698-704.
15. Chertov,O., D.F.Michiel, L.Xu, J.M.Wang, K.Tani, W.J.Murphy, D.L.Longo, D.D.Taub, and J.J.Oppenheim. 1996. Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J.Biol.Chem.* 271:2935-2940.
16. Yang,D., O.Chertov, S.N.Bykovskaia, Q.Chen, M.J.Buffo, J.Shogan, M.Anderson, J.M.Schroder, J.M.Wang, O.M.Howard, and J.J.Oppenheim. 1999. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286:525-528.
17. Yang,D., Q.Chen, O.Chertov, and J.J.Oppenheim. 2000. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J.Leukoc.Biol.* 68:9-14.
18. Cassatella,M.A., L.Meda, S.Gasperini, A.D'Andrea, X.Ma, and G.Trinchieri. 1995. Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes. *Eur.J.Immunol.* 25:1-5.
19. Gately,M.K., L.M.Renzetti, J.Magram, A.S.Stern, L.Adorini, U.Gubler, and D.H.Presky. 1998. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* 16:495-521.
20. Dunican,A., P.Grutkoski, S.Leuenroth, A.Ayala, and H.H.Simms. 2000. Neutrophils regulate their own apoptosis via preservation of CXC receptors. *J.Surg.Res.* 90:32-38.
21. Dunican,A.L., S.J.Leuenroth, P.Grutkoski, A.Ayala, and H.H.Simms. 2000. TNFalpha-induced suppression of PMN apoptosis is mediated through interleukin-8 production. *Shock* 14:284-288.
22. PREHN,R.T. and J.M.MAIN. 1957. Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J.Natl.Cancer Inst.* 18:769-778.
23. Rodriguez,P.C., A.H.Zea, and A.C.Ochoa. 2003. Mechanisms of tumor evasion from the immune response. *Cancer Chemother.Biol.Response Modif.* 21:351-364.
24. Dye,E.S. and R.J.North. 1984. Specificity of the T cells that mediate and suppress adoptive immunotherapy of established tumors. *J.Leukoc.Biol.* 36:27-37.
25. Mills,C.D. and R.J.North. 1985. Ly-1+2- suppressor T cells inhibit the expression of passively transferred antitumor immunity by suppressing the generation of cytolytic T cells. *Transplantation* 39:202-208.
26. North,R.J. 1985. Down-regulation of the antitumor immune response. *Adv.Cancer Res.* 45:1-43.
27. North,R.J. and I.Bursuker. 1984. Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. I. Ly-1+2- suppressor T cells down-regulate the generation of Ly-1-2+ effector T cells. *J.Exp.Med.* 159:1295-1311.

28. Miescher, S., M. Stoeck, L. Qiao, C. Barras, L. Barrelet, and F. von, V. 1988. Preferential clonogenic deficit of CD8-positive T-lymphocytes infiltrating human solid tumors. *Cancer Res.* 48:6992-6998.
29. Miescher, S., T.L. Whiteside, S. Carrel, and F. von, V. 1986. Functional properties of tumor-infiltrating and blood lymphocytes in patients with solid tumors: effects of tumor cells and their supernatants on proliferative responses of lymphocytes. *J. Immunol.* 136:1899-1907.
30. Saito, T., I. Kuss, G. Dworacki, W. Gooding, J.T. Johnson, and T.L. Whiteside. 1999. Spontaneous ex vivo apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with head and neck cancer. *Clin. Cancer Res.* 5:1263-1273.
31. Hersey, P. 1999. Impediments to successful immunotherapy. *Pharmacol. Ther.* 81:111-119.
32. Mizoguchi, H., J.J. O'Shea, D.L. Longo, C.M. Loeffler, D.W. McVicar, and A.C. Ochoa. 1992. Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice. *Science* 258:1795-1798.
33. Buggins, A.G., W.J. Hirst, A. Pagliuca, and G.J. Mufti. 1998. Variable expression of CD3-zeta and associated protein tyrosine kinases in lymphocytes from patients with myeloid malignancies. *Br. J. Haematol.* 100:784-792.
34. Finke, J.H., A.H. Zea, J. Stanley, D.L. Longo, H. Mizoguchi, R.R. Tubbs, R.H. Wiltrout, J.J. O'Shea, S. Kudoh, E. Klein, and . 1993. Loss of T-cell receptor zeta chain and p56lck in T-cells infiltrating human renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 53:5613-5616.
35. Gunji, Y., S. Hori, T. Aoe, T. Asano, T. Ochiai, K. Isono, and T. Saito. 1994. High frequency of cancer patients with abnormal assembly of the T cell receptor-CD3 complex in peripheral blood T lymphocytes. *Jpn. J. Cancer Res.* 85:1189-1192.
36. Rabinowich, H., Y. Suminami, T.E. Reichert, P. Crowley-Nowick, M. Bell, R. Edwards, and T.L. Whiteside. 1996. Expression of cytokine genes or proteins and signaling molecules in lymphocytes associated with human ovarian carcinoma. *Int. J. Cancer* 68:276-284.
37. Rossi, E., E. Matutes, R. Morilla, K. Owusu-Ankomah, A.M. Heffernan, and D. Catovsky. 1996. Zeta chain and CD28 are poorly expressed on T lymphocytes from chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 10:494-497.
38. Ungefroren, H., M. Voss, W.V. Bernstorff, A. Schmid, B. Kremer, and H. Kalthoff. 1999. Immunological escape mechanisms in pancreatic carcinoma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 880:243-251.
39. Kono, K., M.E. Rensing, R.M. Brandt, C.J. Melief, R.K. Potkul, B. Andersson, M. Petersson, W.M. Kast, and R. Kiessling. 1996. Decreased expression of signal-transducing zeta chain in peripheral T cells and natural killer cells in patients with cervical cancer. *Clin. Cancer Res.* 2:1825-1828.
40. Kono, K., F. Salazar-Onfray, M. Petersson, J. Hansson, G. Masucci, K. Wasserman, T. Nakazawa, P. Anderson, and R. Kiessling. 1996. Hydrogen peroxide secreted by tumor-derived macrophages down-modulates signal-transducing zeta molecules and inhibits tumor-specific T cell- and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 26:1308-1313.

41. Otsuji,M., Y.Kimura, T.Aoe, Y.Okamoto, and T.Saito. 1996. Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3 zeta chain of T-cell receptor complex and antigen-specific T-cell responses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:13119-13124.
42. Coussens,L.M. and Z.Werb. 2001. Inflammatory cells and cancer: think different! *J.Exp.Med.* 193:F23-F26.
43. Aoyagi,Y., T.Oda, T.Kinoshita, C.Nakahashi, T.Hasebe, N.Ohkohchi, and A.Ochiai. 2004. Overexpression of TGF-beta by infiltrated granulocytes correlates with the expression of collagen mRNA in pancreatic cancer. *Br.J.Cancer* 91:1316-1326.
44. Queen,M.M., R.E.Ryan, R.G.Holzer, C.R.Keller-Peck, and C.L.Jorcyk. 2005. Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression. *Cancer Res.* 65:8896-8904.
45. Jablonska,E., L.Piotrowski, J.Jablonski, and Z.Grabowska. 2002. VEGF in the culture of PMN and the serum in oral cavity cancer patients. *Oral Oncol.* 38:605-609.
46. Hirose,K., M.Hakozaki, Y.Nyunoya, Y.Kobayashi, K.Matsushita, T.Takenouchi, A.Mikata, N.Mukaida, and K.Matsushima. 1995. Chemokine gene transfection into tumour cells reduced tumorigenicity in nude mice in association with neutrophilic infiltration. *Br.J.Cancer* 72:708-714.
47. Stoppacciaro,A., C.Melani, M.Parenza, A.Mastracchio, C.Bassi, C.Baroni, G.Parmiani, and M.P.Colombo. 1993. Regression of an established tumor genetically modified to release granulocyte colony-stimulating factor requires granulocyte-T cell cooperation and T cell-produced interferon gamma. *J.Exp.Med.* 178:151-161.
48. Lichtenstein,A., T.Ganz, M.E.Selsted, and R.I.Lehrer. 1986. In vitro tumor cell cytolysis mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes. *Blood* 68:1407-1410.
49. Dallegri,F., L.Ottonello, A.Ballestrero, P.Dapino, F.Ferrando, F.Patrone, and C.Sacchetti. 1991. Tumor cell lysis by activated human neutrophils: analysis of neutrophil-delivered oxidative attack and role of leukocyte function-associated antigen 1. *Inflammation* 15:15-30.
50. Koga,Y., A.Matsuzaki, A.Suminoe, H.Hattori, and T.Hara. 2004. Neutrophil-derived TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a novel mechanism of antitumor effect by neutrophils. *Cancer Res.* 64:1037-1043.
51. Secchiero,P., M.Vaccarezza, A.Gonelli, and G.Zauli. 2004. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a potential candidate for combined treatment of hematological malignancies. *Curr.Pharm.Des* 10:3673-3681.
52. Smyth,M.J., K.Takeda, Y.Hayakawa, J.J.Peschon, M.R.van den Brink, and H.Yagita. 2003. Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy. *Immunity.* 18:1-6.
53. Balkwill,F. and A.Mantovani. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357:539-545.

54. Pekarek,L.A., B.A.Starr, A.Y.Toledano, and H.Schreiber. 1995. Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. *J.Exp.Med.* 181:435-440.
55. Oberley,T.D. 2002. Oxidative damage and cancer. *Am.J.Pathol.* 160:403-408.
56. London,S.J., T.A.Lehman, and J.A.Taylor. 1997. Myeloperoxidase genetic polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Res.* 57:5001-5003.
57. Malmberg,K.J., V.Arulampalam, F.Ichihara, M.Petersson, K.Seki, T.Andersson, R.Lenkei, G.Masucci, S.Pettersson, and R.Kiessling. 2001. Inhibition of activated/memory (CD45RO(+)) T cells by oxidative stress associated with block of NF-kappaB activation. *J.Immunol.* 167:2595-2601.
58. Serafini,P., C.De Santo, I.Marigo, S.Cingarlini, L.Dolcetti, G.Gallina, P.Zanovello, and V.Bronte. 2004. Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells. *Cancer Immunol.Immunother.* 53:64-72.
59. Gabrilovich,D.I., M.P.Velders, E.M.Sotomayor, and W.M.Kast. 2001. Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *J.Immunol.* 166:5398-5406.
60. Melani,C., C.Chiodoni, G.Forni, and M.P.Colombo. 2003. Myeloid cell expansion elicited by the progression of spontaneous mammary carcinomas in c-erbB-2 transgenic BALB/c mice suppresses immune reactivity. *Blood* 102:2138-2145.
61. Almand,B., J.I.Clark, E.Nikitina, J.van Beynen, N.R.English, S.C.Knight, D.P.Carbone, and D.I.Gabrilovich. 2001. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J.Immunol.* 166:678-689.
62. Zea,A.H., P.C.Rodriguez, M.B.Atkins, C.Hernandez, S.Signoretti, J.Zabaleta, D.McDermott, D.Quiceno, A.Youmans, A.O'Neill, J.Mier, and A.C.Ochoa. 2005. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res.* 65:3044-3048.
63. Young,M.R., M.A.Wright, and R.Pandit. 1997. Myeloid differentiation treatment to diminish the presence of immune-suppressive CD34+ cells within human head and neck squamous cell carcinomas. *J.Immunol.* 159:990-996.
64. Bronte,V. and P.Zanovello. 2005. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat.Rev.Immunol.* 5:641-654.
65. Schmielau,J. and O.J.Finn. 2001. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res.* 61:4756-4760.
66. Petersen,F., A.Ludwig, H.D.Flad, and E.Brandt. 1996. TNF-alpha renders human neutrophils responsive to platelet factor 4. Comparison of PF-4 and IL-8 reveals different activity profiles of the two chemokines. *J.Immunol.* 156:1954-1962.

67. Boyum,A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand.J.Clin.Lab Invest Suppl* 97:77-89.
68. Haynes,A.P. and J.Fletcher. 1990. Neutrophil function tests. *Baillieres Clin.Haematol.* 3:871-887.
69. Fluks,A.J. 1981. Three-step isolation of human blood monocytes using discontinuous density gradients of Percoll. *J.Immunol.Methods* 41:225-233.
70. Zahler,S., C.Kowalski, A.Brosig, C.Kupatt, B.F.Becker, and E.Gerlach. 1997. The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method. *J.Immunol.Methods* 200:173-179.
71. Sleasman,J.W., B.H.Leon, L.F.Aleixo, M.Rojas, and M.M.Goodenow. 1997. Immunomagnetic selection of purified monocyte and lymphocyte populations from peripheral blood mononuclear cells following cryopreservation. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 4:653-658.
72. Vermes,I., C.Haanen, H.Steffens-Nakken, and C.Reutelingsperger. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J.Immunol.Methods* 184:39-51.
73. Jaffe,E.A., D.Armellino, G.Lam, C.Cordon-Cardo, H.W.Murray, and R.L.Evans. 1989. IFN-gamma and IFN-alpha induce the expression and synthesis of Leu 13 antigen by cultured human endothelial cells. *J.Immunol.* 143:3961-3966.
74. Schonbeck,U., E.Brandt, F.Petersen, H.D.Flad, and H.Loppnow. 1995. IL-8 specifically binds to endothelial but not to smooth muscle cells. *J.Immunol.* 154:2375-2383.
75. Fleischer,J., E.Grage-Griebenow, B.Kasper, H.Heine, M.Ernst, E.Brandt, H.D.Flad, and F.Petersen. 2002. Platelet factor 4 inhibits proliferation and cytokine release of activated human T cells. *J.Immunol.* 169:770-777.
76. Lyons,A.B. and C.R.Parish. 1994. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J.Immunol.Methods* 171:131-137.
77. Hodgkin,P.D., J.H.Lee, and A.B.Lyons. 1996. B cell differentiation and isotype switching is related to division cycle number. *J.Exp.Med.* 184:277-281.
78. Skubitz,K.M., K.D.Campbell, and A.P.Skubitz. 1996. CD66a, CD66b, CD66c, and CD66d each independently stimulate neutrophils. *J.Leukoc.Biol.* 60:106-117.
79. Mattsson,E., T.Persson, P.Andersson, J.Rollof, and A.Egesten. 2003. Peptidoglycan induces mobilization of the surface marker for activation marker CD66b in human neutrophils but not in eosinophils. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 10:485-488.
80. Choi,K.S., D.J.Grab, and J.S.Dumler. 2004. Anaplasma phagocytophilum infection induces protracted neutrophil degranulation. *Infect.Immun.* 72:3680-3683.

81. Bochner, B.S., S.A. Sterbinsky, C.A. Bickel, S. Werfel, M. Wein, and W. Newman. 1994. Differences between human eosinophils and neutrophils in the function and expression of sialic acid-containing counterligands for E-selectin. *J. Immunol.* 152:774-782.
82. Elangbam, C.S., C.W. Qualls, Jr., and R.R. Dahlgren. 1997. Cell adhesion molecules--update. *Vet. Pathol.* 34:61-73.
83. Triantafilou, M. and K. Triantafilou. 2005. The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. *J. Endotoxin. Res.* 11:5-11.
84. Edberg, J.C., J.E. Salmon, and R.P. Kimberly. 1992. Functional capacity of Fc gamma receptor III (CD16) on human neutrophils. *Immunol. Res.* 11:239-251.
85. Lechmann, M., E. Zinser, A. Golka, and A. Steinkasserer. 2002. Role of CD83 in the immunomodulation of dendritic cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 129:113-118.
86. Takahashi, G.W., D.F. Andrews, III, M.B. Lilly, J.W. Singer, and M.R. Alderson. 1993. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on interleukin-8 production by human neutrophils and monocytes. *Blood* 81:357-364.
87. Suttman, H., J. Riemensberger, G. Bentien, D. Schmaltz, M. Stockle, D. Jocham, A. Bohle, and S. Brandau. 2006. Neutrophil granulocytes are required for effective bacillus calmette-guerin immunotherapy of bladder cancer and orchestrate local immune responses. *Cancer Res.* 66:8250-8257.
88. Locker, G.J., C. Wenzel, M. Schmidinger, M.F. Gnant, C. Marosi, R. Jakesz, C.C. Zielinski, and G.G. Steger. 2001. Unexpected severe myelotoxicity of gemcitabine in pretreated breast cancer patients. *Anticancer Drugs* 12:209-212.
89. Thureau, A.M., U. Schylz, V. Wolf, N. Krug, and U. Schauer. 1996. Identification of eosinophils by flow cytometry. *Cytometry* 23:150-158.
90. Petersen, F., L. Bock, H.D. Flad, and E. Brandt. 1999. Platelet factor 4-induced neutrophil-endothelial cell interaction: involvement of mechanisms and functional consequences different from those elicited by interleukin-8. *Blood* 94:4020-4028.
91. Scapini, P., J.A. Lapinet-Vera, S. Gasperini, F. Calzetti, F. Bazzoni, and M.A. Cassatella. 2000. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol. Rev.* 177:195-203.
92. Elbim, C., J. Hakim, and M.A. Gougerot-Pocidalo. 1998. Heterogeneity in Lewis-X and sialyl-Lewis-X antigen expression on monocytes in whole blood: relation to stimulus-induced oxidative burst. *Am. J. Pathol.* 152:1081-1090.
93. Antal-Szalmas, P., J.A. Strijp, A.J. Weersink, J. Verhoef, and K.P. Van Kessel. 1997. Quantitation of surface CD14 on human monocytes and neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 61:721-728.

94. Seebach, J.D., R. Morant, R. Ruegg, B. Seifert, and J. Fehr. 1997. The diagnostic value of the neutrophil left shift in predicting inflammatory and infectious disease. *Am. J. Clin. Pathol.* 107:582-591.
95. Schmitz, L.L., J.S. McClure, C.E. Litz, V. Dayton, D.J. Weisdorf, J.L. Parkin, and R.D. Brunning. 1994. Morphologic and quantitative changes in blood and marrow cells following growth factor therapy. *Am. J. Clin. Pathol.* 101:67-75.
96. Iking-Konert, C., C. Wagner, B. Deneffle, F. Hug, M. Schneider, K. Andrassy, and G.M. Hansch. 2002. Up-regulation of the dendritic cell marker CD83 on polymorphonuclear neutrophils (PMN): divergent expression in acute bacterial infections and chronic inflammatory disease. *Clin. Exp. Immunol.* 130:501-508.
97. Wagner, C., R. Deppisch, B. Deneffle, F. Hug, K. Andrassy, and G.M. Hansch. 2003. Expression patterns of the lipopolysaccharide receptor CD14, and the Fc γ receptors CD16 and CD64 on polymorphonuclear neutrophils: data from patients with severe bacterial infections and lipopolysaccharide-exposed cells. *Shock* 19:5-12.
98. Hansch, G.M., M. Radsak, C. Wagner, B. Reis, A. Koch, A. Breitbart, and K. Andrassy. 1999. Expression of major histocompatibility class II antigens on polymorphonuclear neutrophils in patients with Wegener's granulomatosis. *Kidney Int.* 55:1811-1818.
99. Carulli, G. 1997. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor administration on neutrophil phenotype and functions. *Haematologica* 82:606-616.
100. de Haas, M., J.M. Kerst, C.E. van der Schoot, J. Calafat, C.E. Hack, J.H. Nuijens, D. Roos, R.H. van Oers, and A.E. de Borne. 1994. Granulocyte colony-stimulating factor administration to healthy volunteers: analysis of the immediate activating effects on circulating neutrophils. *Blood* 84:3885-3894.
101. Reinisch, W., W. Tillinger, C. Lichtenberger, A. Gangl, M. Willheim, O. Scheiner, and G. Steger. 1996. In vivo induction of HLA-DR on human neutrophils in patients treated with interferon-gamma. *Blood* 87:3068.
102. Spagnoli, G.C., A. Juretic, R. Rosso, J. Van Bree, F. Harder, and M. Heberer. 1995. Expression of HLA-DR in granulocytes of polytraumatized patients treated with recombinant human granulocyte macrophage-colony-stimulating factor. *Hum. Immunol.* 43:45-50.
103. Wittmann, S., G. Rothe, G. Schmitz, and D. Frohlich. 2004. Cytokine upregulation of surface antigens correlates to the priming of the neutrophil oxidative burst response. *Cytometry A* 57:53-62.
104. Lund-Johansen, F. and L.W. Terstappen. 1993. Differential surface expression of cell adhesion molecules during granulocyte maturation. *J. Leukoc. Biol.* 54:47-55.
105. Fleit, H.B., S.D. Wright, C.J. Durie, J.E. Valinsky, and J.C. Unkeless. 1984. Ontogeny of Fc receptors and complement receptor (CR3) during human myeloid differentiation. *J. Clin. Invest* 73:516-525.

106. Fujimoto,H., T.Sakata, Y.Hamaguchi, S.Shiga, K.Tohyama, S.Ichihama, F.S.Wang, and B.Houwen. 2000. Flow cytometric method for enumeration and classification of reactive immature granulocyte populations. *Cytometry* 42:371-378.
107. Dransfield,I., A.M.Buckle, J.S.Savill, A.McDowall, C.Haslett, and N.Hogg. 1994. Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc gamma RIII) expression. *J.Immunol.* 153:1254-1263.
108. Hart,S.P., J.A.Ross, K.Ross, C.Haslett, and I.Dransfield. 2000. Molecular characterization of the surface of apoptotic neutrophils: implications for functional downregulation and recognition by phagocytes. *Cell Death.Differ.* 7:493-503.
109. Moldovan,I., J.Galon, I.Maridonneau-Parini, R.S.Roman, C.Mathiot, W.H.Fridman, and C.Sautes-Fridman. 1999. Regulation of production of soluble Fc gamma receptors type III in normal and pathological conditions. *Immunol.Lett.* 68:125-134.
110. Kansas,G.S., M.J.Muirhead, and M.O.Dailey. 1990. Expression of the CD11/CD18, leukocyte adhesion molecule 1, and CD44 adhesion molecules during normal myeloid and erythroid differentiation in humans. *Blood* 76:2483-2492.
111. Ohsaka,A., K.Saionji, K.Endo, M.Kikuchi, A.Takahashi, S.Hagiwara, Y.Itoh, and J.Igari. 1995. Alterations of effector cell molecule expression on neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor-producing tumour. *Br.J.Haematol.* 91:571-574.
112. Wislez,M., J.Fleury-Feith, N.Rabbe, J.Moreau, D.Cesari, B.Milleron, C.Mayaud, M.Antoine, P.Soler, and J.Cadranel. 2001. Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor prolong the survival of neutrophils infiltrating bronchoalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma. *Am.J.Pathol.* 159:1423-1433.
113. Jones,S.A., M.Wolf, S.Qin, C.R.Mackay, and M.Baggiolini. 1996. Different functions for the interleukin 8 receptors (IL-8R) of human neutrophil leukocytes: NADPH oxidase and phospholipase D are activated through IL-8R1 but not IL-8R2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:6682-6686.
114. von Andrian,U.H., J.D.Chambers, E.L.Berg, S.A.Michie, D.A.Brown, D.Karolak, L.Ramezani, E.M.Berger, K.E.Arfor, and E.C.Butcher. 1993. L-selectin mediates neutrophil rolling in inflamed venules through sialyl LewisX-dependent and -independent recognition pathways. *Blood* 82:182-191.
115. Nair,K.S. and S.M.Zingde. 2001. Adhesion of neutrophils to fibronectin: role of the cd66 antigens. *Cell Immunol.* 208:96-106.
116. Hetherington,S.V. and P.G.Quie. 1985. Human polymorphonuclear leukocytes of the bone marrow, circulation, and marginated pool: function and granule protein content. *Am.J.Hematol.* 20:235-246.
117. Ruchaud-Sparagano,M.H., S.C.Stocks, H.Turley, and I.Dransfield. 1997. Activation of neutrophil function via CD66: differential effects upon beta 2 integrin mediated adhesion. *Br.J.Haematol.* 98:612-620.

118. Glasser,L. and R.L.Fiederlein. 1987. Functional differentiation of normal human neutrophils. *Blood* 69:937-944.
119. Lund-Johansen,F., J.Olweus, F.W.Symington, A.Arli, J.S.Thompson, R.Vilella, K.Skubitz, and V.Horejsi. 1993. Activation of human monocytes and granulocytes by monoclonal antibodies to glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens. *Eur.J.Immunol.* 23:2782-2791.
120. Zakhireh,B. and R.K.Root. 1979. Development of Oxidase activity by human bone marrow granulocytes. *Blood* 54:429-439.
121. Whiteside,T.L. and H.Rabinowich. 1998. The role of Fas/FasL in immunosuppression induced by human tumors. *Cancer Immunol.Immunother.* 46:175-184.
122. O'Connell,J., M.W.Bennett, G.C.O'Sullivan, J.K.Collins, and F.Shanahan. 1999. The Fas counterattack: cancer as a site of immune privilege. *Immunol.Today* 20:46-52.
123. Kusmartsev,S. and D.I.Gabrilovich. 2003. Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species. *J.Leukoc.Biol.* 74:186-196.
124. Munder,M., F.Mollinedo, J.Calafat, J.Canchado, C.Gil-Lamagnere, J.M.Fuentes, C.Luckner, G.Doschko, G.Soler, K.Eichmann, F.M.Muller, A.D.Ho, M.Goerner, and M.Modolell. 2005. Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood* 105:2549-2556.
125. Zea,A.H., P.C.Rodriguez, K.S.Culotta, C.P.Hernandez, J.DeSalvo, J.B.Ochoa, H.J.Park, J.Zabaleta, and A.C.Ochoa. 2004. L-Arginine modulates CD3zeta expression and T cell function in activated human T lymphocytes. *Cell Immunol.* 232:21-31.
126. Mehta,K. 2002. Retinoic acid--a player that rules the game of life and death in neutrophils. *Indian J.Exp.Biol.* 40:874-881.
127. Tallman,M.S. 1996. Differentiating therapy in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 10:1262-1268.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Schematische Darstellung der Hämatopoese (verkürzt) mit Schwerpunkt auf der neutrophilen Granulopoese.....	14
Abb. 2.5.5	Struktur von Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE).....	30
Abb. 3.1	Separation von peripherem Blut durch Dichtegradientenzentrifugation.....	32
Abb. 3.1.1.1	Nachweis von LD-PMN in MNC von Tumorpatienten durch Immunfluoreszenzfärbung von CD66b.....	33
Abb. 3.1.1.2	Anteil der LD-PMN in den untersuchten MNC.....	33
Abb. 3.1.2.1	Schematische Darstellung der Vorwärtsstreuung (FSC) von fokussierten Lichtstrahlen durch Einzelzellen im Durchflusszytometer.....	34
Abb. 3.1.2.2	Vergleich der Vorwärts-Streuung (FSC) von HD- und LD-PMN.....	34
Abb. 3.2.1.1	Vergleich der Expression von CD66b auf HD- und LD-PMN.....	35
Abb. 3.2.1.2	Vergleich der Expression von CD15 auf HD- und LD-PMN.....	36
Abb. 3.2.1.3	Untersuchung der Expression von CD80, CD83, CD86 und MHC Klasse II auf HD- und LD-PMN.....	37
Abb. 3.2.1.4	Vergleich der Expression von CD11b auf HD- und LD-PMN.....	38
Abb. 3.2.1.5	Vergleich der Expression von CD14 auf HD- und LD-PMN.....	38
Abb. 3.2.1.6	Vergleich der Expression von MHC Klasse I auf HD- und LD-PMN.....	39
Abb. 3.2.1.7	Vergleich der Expression von CD16 auf HD- und LD-PMN.....	40
Abb. 3.2.1.8	Anteil der CD16 ^{low} LD-PMN innerhalb der LD-PMN.....	40
Abb. 3.3.1	Anreicherung von LD-PMN mittels diskontinuierlichem Dichtegradienten.....	42
Abb. 3.3.2	Isolierung von LD-PMN durch MACS mit anti CD15-Beads.....	44
Abb. 3.3.3	Isolierung hochreiner LD-PMN.....	46
Abb. 3.4.1	Viabilität von HD- und LD-PMN nach Isolierung.....	47
Abb. 3.4.2	Färbung von isolierten HD- und LD-PMN nach Pappenheim.....	48
Abb. 3.4.3	Korrelation der Anteile von CD16 ^{low} LD-PMN und stabkernigen LD-PMN.....	49
Abb. 3.5.1.1	Vergleich der Adhäsion von HD-PMN (MACS) und HD-PMN (ely) an HUVECs.....	50
Abb. 3.5.1.2	Vergleich der Adhäsion von HD- und LD-PMN an HUVECs.....	51
Abb. 3.5.2	Vergleich der Chemotaxis von HD-PMN (MACS), HD-PMN (ely) und LD-PMN.....	52
Abb. 3.5.3.1	Vergleich von HD-PMN (MACS) und HD-PMN (ely) in der Produktion von ROI.....	53
Abb. 3.5.3.2	Vergleich von LD- und HD-PMN in der Produktion von ROI.....	54
Abb. 3.5.4	Vergleich von LD- und HD-PMN (MACS) in der Produktion von IL-8.....	55
Abb. 3.5.5	Analyse des Einflusses von LD-PMN auf die Proliferation von T-Zellen.....	56

Veröffentlichungen

Originalpublikationen

- **Suttman H, Riemensberger J, Bentien G, Schmaltz D, Stöckle M, Jocham D, Böhle A, Brandau S.** *Neutrophil granulocytes are required for effective bacillus calmette-guerin immunotherapy of bladder cancer and orchestrate local immune response.* (2006) *Cancer Res.* 66 (16): 8250-7
- **Jankowski J, Stephan N, Knobloch M, Fischer S, Schmaltz D, Zidek W, Schlüter H.** *Mass-spectrometry-linked screening of protein fractions for enzymatic activities — a tool for functional genomics.* (2001) *Anal Biochem.* 290 (2): 324-9

Vorträge

- **16th Symposium of Experimental Urology.** Lübeck, Deutschland
Stimulation of human neutrophils with Bacillus Calmette-Guérin; possible implications for immunotherapy of superficial bladder cancer. (2004)
- **34th Meeting of the German Society of Immunology (DGFI).** Berlin, Deutschland
Stimulation of neutrophil granulocytes with Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin induces changes in phenotype and gene expression and inhibits spontaneous apoptosis. (2003)

Kongressbeiträge (gedruckte abstracts)

- **Suttman H, Riemensberger J, Bentien G, Schmaltz D, Stöckle M, Jocham D, Böhle A, Brandau S.** *Neutrophil granulocytes are required for effective BCG-immunotherapy of bladder cancer and orchestrate local immune response.* (2006) 16th European Congress of Immunology. Paris, Frankreich
- **Hoffmann J, Werner M, Schmaltz D, Jeromin M, Morth T, Hollmann M.** *Covalently linked AMPA receptor heterodimers are functional and potentiated by stargazing.* (2006) FENS Abstracts, vol. 3, A184.4 ; Forum of European Neuroscience 2006, Wien, Österreich
- **Schmaltz D, Suttman H, Welling J, Ernst M, Brandau S.** *Isolation and first functional characterisation of potentially disarmed neutrophils in the peripheral blood of cancer patients.* (2005) *Immunobiol.* vol. 210, No. 6-8 ; 36th Meeting of the German Society of Immunology (DGFI). Kiel, Deutschland (2005)

- **Schmaltz D, Böhle A, Brandau S.** *Stimulation of human neutrophils with Bacillus Calmette-Guérin; possible implications for immunotherapy of superficial bladder cancer.* (2004) EXPU ; 16th Symposium of Experimental Urology. Lübeck, Deutschland (2004)
- **Suttman H, Schmaltz D, Lehan N, Böhle A, Brandau S.** *Stimulation of neutrophil granulocytes with Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin induces changes in phenotype and gene expression and inhibits spontaneous apoptosis.* (2003) Immunobiol. vol. 208, No.1-3 ; 34th Meeting of the German Society of Immunology (DGFI). Berlin, Deutschland (2003)

Danksagung

Herrn **Prof. Dr. Bernd Otto** danke ich für die Betreuung dieser Arbeit, die Unterstützung und das Verständnis.

Herrn **PD Dr. Sven Brandau** sei gedankt für die Zuweisung des Stipendiums, die Herstellung der Kontakte in die Kliniken, für die Betreuung dieser Arbeit und Durchsicht der Dissertation.

Dem Mitbetreuer dieser Arbeit, Herrn **Dr. Martin Ernst**, danke ich für die Durchführung der Chemilumineszenz-Bestimmungen, die Bereitstellung unzähliger Antikörper, die Hilfe am Durchflusszytometer, die stete Ansprechbarkeit, die vielen hilfreichen Diskussionen, das Verständnis, die moralische Unterstützung und für die vorbildliche Überprüfung dieser Dissertation.

Herrn **PD Dr. Frank Petersen** danke ich für die Einführung in die Adhäsionsversuche, die moralische Unterstützung, die entscheidende Hilfe bei der Finanzierung der zweimonatigen Verlängerung und für die sehr schnelle Durchsicht der Diskussion dieser Arbeit.

Herrn **PD Dr. Torsten Goldmann** danke ich für seine durchweg positive Einstellung, die Unterstützung bei allen immunhistologischen Untersuchungen und die Durchsicht der Einleitung.

Frau **Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus** und Herrn **Prof. Dr. Ernst Brandt** danke ich für die Finanzierung der zweimonatigen Verlängerung.

Frau **Yvonne Eckstein** danke ich für die große Unterstützung im Labor und ihre entgegenkommende, herzliche Art.

Frau **Katja Landgraf** danke ich für die Hilfe im Labor und ihre erfrischende Art.

Frau **Gabriele Steller** sei gedankt für die stete Bereitstellung von Puffern, Zellkulturmedien, BCG und Zelllinien, sowie für die Durchführung von zwei Viabilitätsbestimmungen und einer Chemotaxis-Untersuchung.

Frau **Christyn Wildgrube** sei gedankt für ihre Ausdauer bei den Immunfluoreszenzfärbungen und ELISAs.

Mein Dank gilt weiter allen Mitgliedern der Laborgruppe Immuntherapie für die sehr, sehr kollegiale Zusammenarbeit. Herauszuheben sind Herr **Dr. Andreas Busche** und Herr **Dr. Daniell Mitchell** aufgrund ihrer Offenheit für Diskussionen und Sorgen, sowie für ihre Konstruktivität, Ehrlichkeit und Unterstützung.

Herrn **Dr. Jürgen Welling** und Herrn **Dr. Henrik Suttman** danke ich für die Organisation der Blutproben von Tumorpatienten und das Interesse an dieser Arbeit.

Herrn **Dr. Jan Schmielau** und Frau **Prof. Dr. Olivera Finn** sei gedankt für die Grundlage des Themas dieser Arbeit.

Frau **Diana Heinrich** und Frau **Geske Woller** danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Adhäsionsversuche.

Herrn **Rainer Reichenbach** danke ich für die Durchführung der Färbungen nach Pappenheim.

Frau **Heike Kühn** sei gedankt für ihre Hilfe bei den immunhistologischen Färbungen.

Frau **Dr. Kathleen Marienfeld** danke ich für die Einführung und Hilfe am Durchflusszytometer.

Herrn **Prof. Dr. Jelkmann** und Herrn **PD Dr. Helmut Haas** sowie der **DFG** sei gedankt für die sehr vielseitigen und ausgesprochen lehrreichen Veranstaltungen zur Weiterbildung im Rahmen des GRK 288 und für die Finanzierung dieser Arbeit.

Herrn **Prof. Dr. Walter Müller** und Herrn **Prof. Dr. Bernd Otto** sei ebenfalls gedankt für die Begutachtung dieser Dissertation.

Meiner Tochter, **Luise Dossdahl**, danke ich für die unerschütterliche Unterstützung, die Erholung und Ablenkung und jeden Tag.

Kirstine Dossdahl danke ich herzlich für die fundamentale Unterstützung und das Verständnis, für den großen Anteil an dieser Arbeit und den Fleiß, sowie für die schönen Jahre.

Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name	Schmaltz
Vorname	Dominik
Geburtsdatum	28. Dezember 1976
Geburtsort	Hagenow
Familienstand	unverheiratet eine Tochter, geboren am 12. August 2005
Staatsangehörigkeit	deutsch
Erreichbar unter	Dominik.Schmaltz@web.de

Schulbildung:

1983 - 1991	Polytechnische Oberschule, Neuhaus / Elbe
1991 - 1996	Gymnasium, Scharnebeck; Abschluss: Abitur

Wehrdienst:

Sept. 1996 - Juli 1997	Fallschirmjäger Bataillon, Henning-von-Treskow-Kaserne Oldenburg, Wittekind-Kaserne Wildeshausen
------------------------	---

Studium:

Aug. 1997 - Nov. 2002	Studium der Biochemie an der Ruhr-Universität Bochum, Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biochemie I – Rezeptorbiochemie bei Herrn Prof. Dr. Michael Hollmann zum Thema: <i>Konstruktion und funktionelle Analyse von Glutamatrezeptor-Konkatemeren</i> , Abschluss: Diplom-Biochemiker
-----------------------	---

Promotion:

Seit Mai 2003	Dissertation am Forschungszentrum Borstel, Leibniz - Zentrum für Medizin und Biowissenschaften Abteilung Immunologie und Zellbiologie Laborgruppe Immuntherapie
---------------	--

Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation „Isolierung und Charakterisierung unreifer immunsuppressiver Neutrophiler im peripheren Blut von Tumorpatienten“ selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 02.11.2006

Dominik Schmaltz