

Aus dem Lehrstuhl für Anästhesiologie
Prof. Dr. med. Bernhard M. Graf, MSc.
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

DER EINFLUSS DES NEUTROPHILEN-GELATINASE-ASSOZIIERTEN
LIPOCALINS AUF DIE FUNKTION UND DIFFERENZIERUNG
NEUTROPHILER GRANULOZYTEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Alicia Lydia Böhm

Aus dem Lehrstuhl für Anästhesiologie
Prof. Dr. med. Bernhard M. Graf, MSc.
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

DER EINFLUSS DES NEUTROPHILEN-GELATINASE-ASSOZIIERTEN
LIPOCALINS AUF DIE FUNKTION UND DIFFERENZIERUNG
NEUTROPHILER GRANULOZYTEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Alicia Lydia Böhm

Dekan:	Prof. Dr. med. Dirk Hellwig
1. Berichterstatterin:	Prof. Dr. med. Sigrid Wittmann
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Helmut Schweikl
Tag der mündlichen Prüfung:	29.06.2026

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	7
2	Einleitung	11
2.1	Immunsystem.....	11
2.2	Funktionen und Merkmale neutrophiler Granulozyten	12
2.2.1	Entwicklung im Knochenmark und Migration zum Zielgewebe	12
2.2.2	Abwehr von Pathogenen	13
2.3	Interaktionen zwischen Tumoren und dem Immunsystem	14
2.3.1	Tumormikromilieu	14
2.3.2	Tumorassoziierte neutrophile Granulozyten	14
2.4	Aufbau und Wirkung des Proteins NGAL.....	16
2.4.1	Einfluss auf das Mammakarzinom	17
2.4.2	Einfluss auf das Pankreaskarzinom.....	18
2.5	Fragestellung der Arbeit.....	18
2.6	Projektplanung	19
3	Materialien und Methoden	21
3.1	Materialliste.....	21
3.2	Votum der Ethikkommission.....	26
3.3	Vorversuche.....	26
3.3.1	Kultivierung der Tumorzellen	26
3.3.2	Vorbereitung der Zellüberstände	27
3.3.3	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)	27
3.4	Blutentnahme.....	28
3.5	Granulozytenisolierung und Serumgewinnung	28
3.5.1	Dichtegradientenzentrifugation	28
3.5.2	Sedimentieren.....	29

3.5.3	Ficoll	29
3.5.4	Gelafundin	29
3.5.5	Gewinnung von autologem Serum.....	29
3.6	Durchflusszytometrie	30
3.6.1	Oxidativer BURST	31
3.6.2	Bestimmung der Oberflächenepitope	33
3.6.3	Annexin V-Test	33
3.7	Vorbereitung der Mikroskopie und Ablauf der Messung	34
3.7.1	Gelmatrix und Kanäle	34
3.7.2	Rechte Reservoir	35
3.7.3	Linke Reservoir	35
3.7.4	Mikroskopie-Einstellungen	36
3.8	Auswertung der Daten der Durchflusszytometrie	37
3.9	Auswertung der Mikroskopie-Aufnahmen	40
3.9.1	Datenverarbeitung mit der Software Imaris	40
3.9.2	Migration	41
3.9.3	Rhodamin 123	41
3.9.4	NETose und MPO-Produktion	41
3.10	Statistische Analyse	42
4	Ergebnisse	43
4.1	Daten zu den Probandinnen und Probanden	43
4.2	NGAL-Konzentrationen in Tumorzellüberständen.....	43
4.3	Ergebnisse aus den durchflusszytometrischen Versuchen	44
4.3.1	Inkubation mit Tumorzellüberständen	44
4.3.2	Inkubation mit NGAL.....	46
4.3.3	Einfluss des Caspase-Inhibitors Q-VD-Oph	48
4.3.4	Inkubation zur TAN-Differenzierung.....	51

4.3.5 Vergleich der verschiedenen Isolationsmethoden	53
4.4 Live Cell Imaging	54
4.4.1 Migrationsanalyse	54
4.4.2 Vergleich der verschiedenen Isolationsmethoden	63
4.4.3 Analyse der MPO-Produktion, NETose und des oxidativen Bursts.....	64
5 Diskussion	65
5.1 Auswahl und Eigenschaften der Tumorzelllinien.....	65
5.2 Isolationsmethoden.....	66
5.3 Einfluss von Inkubationszeit und Stimulus	67
5.4 Bewertung des Live Cell Imaging Systems	68
5.5 Effekte von NGAL und Tumorzellüberständen.....	70
6 Zusammenfassung	73
7 Ausblick.....	75
8 Literatur	76
9 Anhang	86
9.1 Abbildungsverzeichnis	86
9.2 Tabellenverzeichnis	87
9.3 Danksagung.....	89
9.4 Erklärung zum Promotionsverfahren.....	90

1 Abkürzungsverzeichnis

µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
AFU	Artificial Fluorescence Unit
AK	Antikörper
ANCA	Anti-Neutrophilen-zytoplasmatische Antikörper
APC	Allophycocyanin
C	Komplementfaktor
c	Konzentration
CD	Cluster of Differentiation
CXCL	CXC-Motiv-Chemokinligand
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DHR	Dihydrorhodamin-123
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase
EZM	Extrazellulärmatrix
Fe	Eisen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum

fMLP	N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HOCl	Hypochlorige Säure
ICAM-1/2	Intracellular Adhesion Molecule 1/2
IFN-β	Interferon beta
IL	Interleukin
IQR	Interquartilsabstand
kDa	Kilodalton
LFA-1	Lymphocyte Function-associated Antigen 1
LOX-1	Lectin-like Oxidized Low-density Lipoprotein Receptor-1
LW	Leerwert
MAC-1	Makrophagen-1 Antigen
MEM	Minimal Essential Medium
min	Minuten
mL	Milliliter
MMP9	Matrixmetalloproteinase 9
MPO	Myeloperoxidase
MW	Mittelwert
n	Stichprobenanzahl
N1	Neutrophile mit Differenzierung in N1-Richtung, tumorhemmend
N2	Neutrophile mit Differenzierung in N2-Richtung, tumorfördernd
NaHCO ₃	Natriumbicarbonat
NETose	Freisetzung von NETs
NETs	Neutrophil Extracellular Traps

NGAL	Neutrophilen-Gelatinase assoziiertes Lipocalin, Lcn2, Lipocalin-2
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
O ₂ ⁻	Superoxidanion
OH•	Hydroxylradikal
p	Signifikanzwert
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMN	Polymorphnukleäre Zellen, Granulozyten
Q-VD-OPh	Caspase-Inhibitor, Quinolin-Val-Asp-Difluorophenoxymethylketon
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 (Zellmedium)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
Sig.	Signifikanz
siRNA	Small Interfering Ribonukleinsäure
SNARF	Carboxy-Seminaphthorhodafluor-1-Acetoxymethylester
TANs	Tumor-assoziierte Neutrophile
TDx	Track Displacement in X-Richtung
TGF-β	Tumor Growth Factor beta
TL	Track Length
TME	Tumor Microenvironment, Tumormikroumgebung
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
TRPM2	Transient Receptor Potential Melastatin

ÜS

Überstand

VEGF

Vascular Endothelial Growth Factor

2 Einleitung

2.1 Immunsystem

Neoplasien sind nach kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Europa (1). Trotz zahlreicher Behandlungsstrategien ist es nach wie vor nicht möglich, in allen Fällen eine vollständige Remission zu ermöglichen. Ein vielversprechender Ansatz zur Bekämpfung von Tumoren ist die gezielte Modifikation des Immunsystems, da es im Laufe der Evolution die Fähigkeit entwickelt hat, Bedrohungen wie Krankheitserreger und mutierte Zellen zu erkennen und zu bekämpfen.

Das Immunsystem wird in zwei Hauptsysteme unterteilt: das angeborene und das erworbene Immunsystem. Ersteres erkennt die Gefahren anhand konservierter pathogenassoziierter, molekularer Muster (PAMPs), wie beispielsweise dem Aufbau der Zellwände von Bakterien oder von ihnen produzierter Proteine. Diese Mechanismen ermöglichen eine schnelle, wenn auch unspezifische Abwehrreaktion. Das Komplementsystem ist in der Lage, den Eindringling selbst durch den membranattackierenden Komplex zu lysieren oder für Phagozyten zu markieren. Letztere können Zellen und Gewebeteile aufnehmen und in Phagosomen abbauen. Das erworbene Immunsystem, bestehend aus B- und T-Lymphozyten, reagiert spezifisch auf präsentierte Antigene und bildet passende Antikörper, die eine gezielte Eliminierung der Erreger ermöglichen (2).

Das Zusammenspiel der verschiedenen Mechanismen bietet eine sehr breite, zeitlich versetzte Immunantwort, die einen effizienten Schutz unseres Körpers ermöglicht. Dennoch ist eine strikte Regulierung dieses Systems notwendig, um unerwünschte Reaktionen zu vermeiden. Als Beispiel soll die ANCA-assoziierte Vaskulitis genannt sein, bei der unter anderem aufgrund einer abnormen Granulozytenaktivität anti-MPO-Antikörper gebildet werden (3).

An der Regulation des Immunsystems ist eine Vielzahl unterschiedlicher Signale beteiligt, die hemmend oder aktivierend auf die Immunzellen einwirken können (2). Diverse Tumorentitäten produzieren das Neutrophilen-Gelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL) (4). In dieser Arbeit wird untersucht, welchen Einfluss dieses Protein auf die Funktion neutrophiler Granulozyten hat

2.2 Funktionen und Merkmale neutrophiler Granulozyten

2.2.1 Entwicklung im Knochenmark und Migration zum Zielgewebe

Granulozyten sind Teil des angeborenen Immunsystems und bilden die größte Population der Leukozyten. Mithilfe der Pappenheim-Färbung werden diese weiter in eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten unterteilt (2).

Neutrophile Granulozyten, aufgrund ihres segmentierten Zellkerns auch als polymorphkernige Leukozyten (PMNs) bezeichnet, stellen mit 50-70 % die größte Population der Leukozyten dar. Sie sind vor allem an der Immunmodulation und der Abwehr pathogener Mikroorganismen beteiligt (2).

Die Mobilisation der ausgereiften PMNs aus dem Knochenmark erfolgt als Antwort auf ein koordiniertes Zusammenspiel von G-CSF und CXCL1 und -2, verbunden mit einer Abnahme von CXCR4 (5–7). Im Inflammationsareal werden vermehrt Zytokine, wie z.B. IL-1 oder TNF α , u.a. von ansässigen Makrophagen synthetisiert. Dies regt nahegelegene Endothelzellen an, Adhäsionsmoleküle zu präsentieren (7). Die Interaktion zwischen L-Selektin (CD62L) auf den Granulozyten und E-/P-Selektin auf den Endothelzellen führt zu einem Leukozyten-Rolling entlang der Gefäßwand. Die Zell-Zell-Verbindung ist jedoch noch nicht ausreichend stark, um eine feste Anheftung zu gewährleisten. Diese wird über die Expression und Aktivierung der Integrine MAC-1 (CD11b/CD18) bzw. LFA-1 (CD11a/CD18) an ICAM-1/-2 (CD54/CD102) erreicht (8). Das α V β 3-Integrin (CD51) wird für eine gerichtete Bewegung benötigt und hat ebenso einen Einfluss auf die Rate der Adhäsion und Transmigration (9). Eine stabile Adhäsion der Granulozyten ist die Grundlage für die Transmigration und die daran anschließende Diapedese, d.h. das Durchdringen des Endothels und der Basalmembran (2, 8).

Im Gewebe bewegen sich die Granulozyten aufgrund der Konzentrationsgradienten verschiedener Chemokine, die u.a. an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren an der Zelloberfläche binden und eine Zellpolarisation auslösen. Wichtige Vertreter sind Leukotrien B₄, die Komplementfaktoren C3a/C5a sowie CXCL-8, welche endogen bei Entzündungen gebildet werden. Daneben werden PMNs auch durch Peptide bakteriellen Ursprungs, wie N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP), angelockt (10, 11).

2.2.2 Abwehr von Pathogenen

Die Hauptaufgabe neutrophiler Granulozyten besteht in der Phagozytose von Pathogenen sowie von apoptotischen Körperzellen. Granulozyten können diese in sogenannten Phagolysosomen aufnehmen, die durch das Verschmelzen des Phagosoms mit primären und sekundären Granula entstehen (2).

Durch die Aktivität der NADPH-Oxidase werden Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) produziert, welche mithilfe der Superoxid-Dismutase in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt werden. Die Freisetzung dieser Produkte wird als oxidativer Burst bezeichnet (2). Phagozyten nutzen diese Radikale, um internalisierte Pathogene abzutöten (2, 12). Werden die Moleküle in den Extrazellularraum freigegeben, kommt es durch die Aktivierung des TRPM2-Kanals in den Zielzellen zu einem toxischen Kalziumioneneinstrom, der eine Apoptose induziert (13). In Anwesenheit von Fe^{2+} kann aus H_2O_2 weiter das Hydroxylradikal $OH^{\cdot}$ entstehen. Die Myeloperoxidase (MPO) katalysiert die Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Chloridionen zu hypochloriger Säure (HOCl), die Zellmembranen und -wände schädigen kann (2).

Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ist auch beteiligt an der Initiierung der NETose (14, 15). Bei dieser Form des Zelltods wird DNA aus dem Zellkern in den Extrazellularraum freigesetzt und dort netzartig organisiert. In die Stränge werden Proteasen, Histone und andere antimikrobielle Proteine eingelagert, um Pathogene einzufangen und anschließend abtöten zu können (15, 16).

Einen dritten Abwehrmechanismus neben der Phagozytose und der NETose stellen die Enzyme und Proteine dar, die bei der Degranulation ausgeschüttet werden. Je nach Entstehungszeitpunkt in der Granulopoese werden die Proteine in drei Granulatypen eingeteilt. In den primären Granula befinden sich antimikrobielle Enzyme wie die MPO und Defensine. Lactoferrin und NGAL aus den sekundären Granula binden extrazelluläres Eisen, welches dadurch nicht mehr für Bakterien zur Verfügung steht. Zudem sind dort Rezeptoren zu finden, die für die Phagozytose notwendig sind. Aus den tertiären Granula werden Enzyme freigesetzt, die die Extravasation und die Degradation extrazellulärer Matrix ermöglichen (17–19). Ein wichtiger Vertreter ist die Gelatinase MMP-9, welche unter anderem Typ IV-Kollagenfasern und damit einen wesentlichen Bestandteil von Basalmembranen abbauen kann (20).

2.3 Interaktionen zwischen Tumoren und dem Immunsystem

2.3.1 Tumormikromilieu

Die Entwicklung und Progression von Tumoren ist nicht nur abhängig von den mutierten Zellen, welche das Grundgefüge des neoplastischen Gewebes bilden. Hanahan und Weinberg konnten unter dem Überbegriff *Hallmarks of cancer* 10 wesentliche Faktoren definieren, die den Charakter eines Tumors beeinflussen (21). Einer dieser Punkte ist die dauerhafte Inflammation in der Tumormikroumgebung (TME). Die Tumorumgebung wird neben dem Tumorzellverband von ansässigen Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen und einwandernden Immunzellen gebildet. Alle beteiligten Zellen können durch ihre spezifischen Eigenschaften und sezernierten Proteine und Zytokine auf das Verhalten des Tumors einwirken (22).

2.3.2 Tumorassoziierte neutrophile Granulozyten

Auch neutrophile Granulozyten nehmen Einfluss auf den Tumor und werden als tumorassoziierte Neutrophile, sogenannten TANs, bezeichnet (23). Es werden N1-Neutrophile mit tumorhemmenden Eigenschaften von N2-Zellen unterschieden, die das Tumorwachstum und die Metastasierung fördern können (24, 25). N1-Neutrophile werden durch Interferone induziert, N2-Zellen durch TGF- β , welches von vielen Tumoren vermehrt exprimiert wird (25–28).

Einige Prozesse finden direkt zwischen den Neutrophilen und den Tumorzellen statt, wie die Wirkungen von ROS. Sauerstoffradikale können einerseits die Apoptose induzieren, andererseits kann es aber auch zur DNA-Schädigung und somit weiteren Mutationen der Tumorzellen kommen (13, 26). Die Sekretion von MMP9 aus den tertiären Granula fördert die Angiogenese und die Degradation der Extrazellulärmatrix (EZM), was die Migration und Metastasierung von Tumorzellen begünstigt (20).

Matlung et al. beschrieben einen weiteren Mechanismus, durch den Neutrophile mit Antikörpern opsonierte Tumorzellen eliminieren. Die Autoren bezeichneten diesen Prozess als Trogoptose, eine Form der Trogozytose, die in der Nekrose der Zielzelle mündet. Dabei wird über CD11b/CD18 ein Teil der Tumorzellmembran durch Granulozyten aufgenommen und die Tumorzelle auf diese Weise lysiert. Die dadurch frei

werdenden Zellbestandteile können wiederum andere Akteure des Immunsystems aktivieren (29).

Weitere Funktionen von Neutrophilen werden durch ihre Interaktion mit anderen Immunzellen erklärt. Durch die Sekretion von IL-18 können natürliche Killerzellen (NK-Zellen) angelockt werden, die dann mutierte Zellen durch Perforation der Membran abtöten (2). Jedoch können Granulozyten mittels Freisetzung von MPO und Wasserstoffperoxid ebenso die NK-Zellaktivität hemmen (30). Ebenso ist ein Einfluss der PMNs auf CD8⁺ T-Zellen beschrieben. Durch eine verstärkte Sekretion von Arginase-1 wird extrazellulär gelegenes Arginin abgebaut und auf diese Weise die T-Zell-Antwort gehemmt (31).

Zusätzlich sind auch die extrazellulären Netze (NETs) an der Modulation der Immunantwort der Neutrophilen gegenüber Tumoren beteiligt (32). Es wird vermutet, dass erhöhte Spiegel von G-CSF, produziert von Tumoren, zu einer Aktivierung der Granulozyten und somit zu einer verstärkten NETose führt (33). Dies begünstigt die Bildung von Thrombosen, welche eine häufige Begleiterscheinung bei Tumorerkrankungen darstellen. Zudem konnte durch intravitale Mikroskopie beobachtet werden, dass der Kontakt von NK- und CD8⁺ T-Zellen zu Tumorzellen durch NETs behindert wurde. Ob dies allein durch die physikalische Abschirmung, oder auch durch die angelagerten Proteine bedingt ist, muss weiter evaluiert werden (24, 34).

Tabelle 1 fasst zusammen, welche Parameter und Stimulationen im Rahmen dieser Arbeit zur Unterscheidung der beiden gegensätzlich wirkenden Phänotypen tumorssoziierter Neutrophiler verwendet wurden.

	N1-Granulozyten (27)	N2-Granulozyten (25)
Wirkung	tumorhemmend	tumorfördernd
Stimulation	IFN- β	TGF- β
Erhöhte Expression	ICAM1/CD54 (25) CD95/Fas (25) CD11b (28) CD66b (28)	CD182/CXCR2 (27, 35) LOX-1 (36) CD62L (28)

Tabelle 1: Oberflächenepitope und Stimulationen zur Unterscheidung zwischen N1- und N2-TANs

2.4 Aufbau und Wirkung des Proteins NGAL

1992 wurde erstmalig ein 25 kDa-Protein beschrieben, das von Neutrophilen produziert wird und strukturelle Ähnlichkeit zu dem murinem 24p3-Protein und dem von Ratten exprimierten α 2-Mikroglobulin aufweist (37–39). Aufgrund der kovalenten Bindung mittels einer Disulfidbrücke an die Gelatinase Matrixmetalloproteinase 9 (MMP9) wurde es von Kjeldsen et al. als Neutrophilen-Gelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL) bezeichnet. NGAL befindet sich wie auch Lactoferrin in den sekundären Granula (18). Die Produktion von NGAL ist nicht nur auf PMNs beschränkt, sondern findet auch in den Atemwegen, dem Verdauungstrakt, der Prostata, den Nierenepithelzellen, den Speicheldrüsen, dem Pankreas, dem Thymus, im Uterus, im Brustgewebe und in Adipozyten statt (39, 40). Als Antwort auf verschiedene Bedingungen wie Infektionen, Entzündungen oder Nierenschädigungen wird es vermehrt exprimiert.

NGAL ist ein Protein aus 178 Aminosäuren und liegt in Form eines Monomers (25 kDa), eines Homodimers (45 kDa) und Heterodimers mit MMP9 (135 kDa) vor (38). Die Tertiärstruktur von Lipocalinen wird gebildet durch ein β -Fass aus acht antiparallelen β -Faltblättern, in dessen Zentrum hydrophobe Liganden gebunden werden können, und das von zwei α -Helices umgeben wird (41).

Die immunmodulatorischen Funktionen von NGAL sind vielfältig: es wirkt als Akute-Phase-Protein bakteriostatisch, indem es an bakterielle Siderophore wie Enterocholin bindet und damit die Aufnahme von Fe^{3+} durch Bakterien hemmt (42). Gleichzeitig kann es aber bei Säugetieren den Transport von Catechol-gebundenem Eisen über Zellmembranen ermöglichen (43). Eisen dient unter anderem als Cofaktor bei der ROS-Produktion (4, 44).

Eine Studie von Schroll et al. (45) legt nahe, dass NGAL sowohl in vitro als auch im Mausmodell chemotaktisch auf Neutrophile einwirkt. Sie beobachteten bei Mäusen eine gesteigerte Mobilisation, Migration und Infiltration der PMNs zum Ort der Injektion von NGAL. In NGAL-Knockout-Mäusen wurde eine verringerte Expression von CD11b (Mac-1), CD51 (Integrin $\alpha_v\beta_3$) und CD62L (L-Selektin) auf der Zelloberfläche im Vergleich zum Wildtypen gezeigt, was zu einer verminderten Adhäsion und Chemotaxis der Neutrophilen führte.

Diese Wirkungen werden über die Erk1/2-Kaskade vermittelt, die durch die Bindung von NGAL an den 24p3-Rezeptor auf der Neutrophilenoberfläche initiiert wird. Über

diesen Signalweg wird die Produktion von Stressfasern gehemmt und eine Verlängerung der Filopodien ermöglicht, was eine verbesserte Zellmotilität bedingt (46).

Überdies induziert NGAL die Expression von CXCR2 auf der Oberfläche der Granulozyten, das die Auswanderung aus dem Knochenmark und die Rekrutierung aus dem Blut zum Entzündungsort durch Liganden wie CXCL1 und CXCL2 fördert (47, 48).

Seit einigen Jahren ist die Rolle von NGAL im Tumorgeschehen in den Fokus neuer Studien gerückt. Neoplastisch veränderte Zellen verschiedener Ursprungsorgane exprimieren eine höhere Konzentration des Proteins im Vergleich zu gesundem Gewebe. Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass eine Überexpression von NGAL mit einer schlechteren Prognose assoziiert sein könne. Das Gros der verfügbaren Literatur zu diesem Thema stützt die tumorfördernde Rolle (49).

Im Folgenden wird genauer auf die Studienlage zweier Tumorentitäten eingegangen.

2.4.1 Einfluss auf das Mammakarzinom

In einer Untersuchung von 250 Tumorproben wurde eine inverse Korrelation zwischen der Expression von NGAL und der Progesteron- und Östrogenrezeptorexpression von Mammakarzinomzellen gefunden. Außerdem war die S-Phasen-Fraktion bei höheren Konzentrationen von NGAL signifikant gesteigert. Während alle drei Marker mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind, konnte in dieser Studie jedoch kein kürzeres Gesamtüberleben oder krankheitsfreies Überleben nachgewiesen werden (50). Besonders ausgeprägt ist NGAL in metastasierten Stadien exprimiert und ist in diesen Fällen im Urin nachweisbar. Damit könnte sich die Möglichkeit ergeben, durch eine nicht-invasive Methode den Erkrankungsverlauf zu verfolgen (51).

In vitro und im Tiermodell hat man bereits versucht, die negativen Effekte von NGAL umzukehren. Dabei konnte die Migrationsrate von Tumorzellen der aggressiven Zelllinie MDA-MB-231 durch den Einsatz von small interfering Ribonukleinsäuren (siRNA), welche die Transkription von NGAL hemmen, verringert werden (51). Darüber hinaus erbrachte die wiederholte Injektion von polyklonalen Antikörpern gegen murines NGAL im Mausmodell einen signifikanten Rückgang der Lungenmetastasierung (52).

2.4.2 Einfluss auf das Pankreaskarzinom

Bei Patienten mit Pankreaskarzinom wurden 1,9-fach höhere NGAL-Serumspiegel gemessen als bei gesunden Kontrollpersonen (53). Jedoch ist die Datenlage zur Bedeutung dieses Proteins im Tumorgeschehen, sowie dessen prognostische Relevanz widersprüchlich.

Laut Tong et al. korreliert die NGAL-Expression mit dem Grad der Differenzierung des Tumors und ist häufiger bei gut differenzierten Zellen zu finden (54). Dies geht einher mit der Beobachtung, dass NGAL die Invasion von BxPC3-Zellen durch Matrigel und die Adhäsion an eine mit Fibronectin benetzte Oberfläche hemmte (55). In einer späteren Veröffentlichung dieser Arbeitsgruppe wurde eine Verbindung zum Epidermal Growth Factor (EGF) hergestellt, das von diversen Karzinomen vermehrt sezerniert wird und die Tumorprogression fördert. Es konnte gezeigt werden, dass EGF die NGAL-Expression hemmt, was möglicherweise einen Beitrag zur Rolle von EGF im Tumorgeschehen beiträgt (54).

Im Gegensatz dazu berichteten Leung et al., dass die Reduktion der NGAL-Expression mittels siRNA eine signifikante Verringerung der Invasion, des Wachstums und der Adhäsion von HPAF-II- und BxPC3-Zellen bewirkte (56). Eine weitere Beobachtung war, dass NGAL die Ausschüttung des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) förderte, was ebenso den Ergebnissen von Tong et al. widerspricht (55).

Insgesamt bleibt die genaue Rolle von NGAL im duktalem Adenokarzinom des Pankreas unklar, und weitere Forschung ist notwendig, um seine prognostische Relevanz und funktionellen Mechanismen zu verstehen.

2.5 Fragestellung der Arbeit

Die Rolle von NGAL in der Tumorentstehung und -progression wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht. Dennoch bleiben viele Fragen hinsichtlich der Interaktion von NGAL mit neutrophilen Granulozyten offen. Diese Zellen spielen durch ihre Funktion in der Tumormikroumgebung (TME) eine entscheidende Rolle bei der Tumorprogression. Basierend auf den Hinweisen aus der aktuellen Literatur wird folgende Forschungshypothese formuliert:

NGAL nimmt Einfluss auf neutrophile Granulozyten im Sinne einer Modifikation zu tumorassoziierten Neutrophilen.

2.6 Projektplanung

Um die Hypothese zu überprüfen, wurden in einem ersten Schritt die Tumorzelllinien BxPC3 und MDA-MB-231 in Kultur genommen. Die Überstände dieser Tumorzellen wurden mittels ELISA auf die Produktion von NGAL untersucht, um zu bestätigen, dass NGAL in ausreichender Menge von den Zellen sezerniert wird.

Im zweiten Schritt wurden neutrophile Granulozyten von gesunden Spendern entweder mit den Tumorzellüberständen oder mit rekombinantem NGAL inkubiert, um den direkten Einfluss des Proteins auf die Granulozytenfunktion zu untersuchen. Das Migrationsverhalten der Granulozyten wurde mittels Live Cell Imaging erfasst und zusätzlich wurden die NETose, die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie die Freisetzung von Myeloperoxidase (MPO) als zentrale Abwehrmechanismen analysiert.

Durchflusszytometrische Analysen ermöglichten die Quantifizierung der Zelloberflächenepitope, des oxidativen Bursts, sowie die Bestimmung des Anteils vitaler und apoptotischer Zellen. Schließlich wurde untersucht, ob NGAL eine Polarisierung der Granulozyten in Richtung der tumorinhibierenden N1- oder der tumorfördernden N2-Phänotypen induziert.

Die verwendeten Methoden und spezifischen Abläufe werden im folgenden Kapitel detailliert beschrieben und sind in Abbildung 1 zusammengefasst.

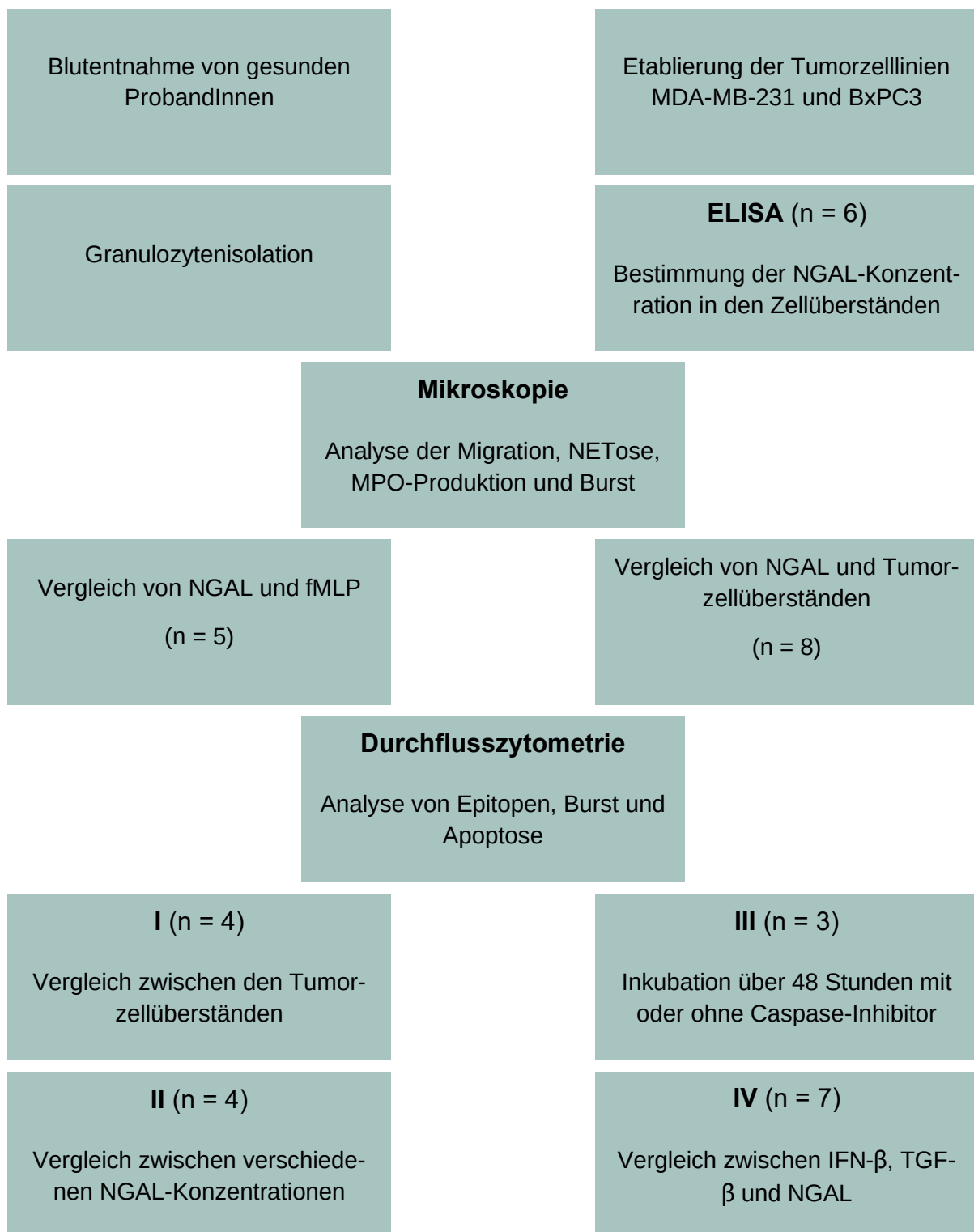


Abbildung 1: Übersicht Projektplan

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialliste

Allgemeine Geräte und Materialien	
Cellstar Tubes 15 mL	188 271, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
CO2 Inkubator Heracell 150i	Thermo Scientific, Waltham, USA
kleine Zentrifuge Micro Star 17R	VWR, Leuven, Belgien
Neubauer-Zählkammer: Neubauer-improved	0640030, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Safe Lock Tubes 0,5 mL - 2 mL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Wasserbad SWB 25	Haake, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge Biofuge Stratos	Heraeus, Osterode, Deutschland
Zentrifuge: Heraeus™, Megafuge 1.0 R	ThermoFisher Scientific, Langenselbold, Deutschland

Zellkultur	
BXPC-3 pancreas car. human frozen culture	ACC 760, DSMZ GmbH
DMEM High Glucose	Life Technologies, Carlsbad, USA
DPBS (1X), [-] CaCl ₂ , [-] MgCl ₂	Gibco, Paisley, UK
Fetales Kälberserum	F7524, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
L-Glutamine 200 mM	G7513, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
MDA-MB-231	300275, Cell Lines Service, Eppelheim, Deutschland
Multiwell 24 Well	353504, Falcon, Corning, USA

Penicillin/Streptomycin	P0781, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
RPMI 1640: without l-glutamine, without phenolred, with 2.0 g/L NaHCO ₃	P04-16516, Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
Trypsin-EDTA	F4174, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Zellkulturflaschen 75 cm ²	353136, Falcon, Corning, USA

ELISA	
Human Lipocalin-2/NGAL ELISA Kit PicoKine	Boster Biological Technology, Pleasanton, USA
Skant Software for Varioskan Flash, Version 2.4	Thermo Electron Cooperation, Vantaa, Finland
Varioskan Flash ELISA Reader	Thermo Electron Cooperation, Vantaa, Finland

Durchflusszytometrie	
anti-human CD11b AK APC	150-10095, RayBiotech, Peachtree Corners, USA
APC anti-human CD66b	BioLegend, San Diego, USA
APC anti-human CD95 (Fas)	BioLegend, San Diego, USA
Cell Quest Pro	Beckton Dickinson Sciences, Franklin Lakes, USA
Dihydrorhodamin 123-Färbelösung: „DHR“, c(Dimethylformamid) = 10 mg/26,2 ml, verdünnt zu 100 nM	D632, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
DPBS (1X), [-] CaCl ₂ , [-] MgCl ₂	Gibco, Paisley, UK

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, with MgCl ₂ and CaCl ₂ , liquid, sterile-filtered	D1283, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
FACS Calibur	Beckton Dickinson Sciences, Franklin Lakes, USA
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Pharmingen, BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
FITC anti-human CD54	BioLegend, San Diego, USA
FITC anti-human CD62L	BioLegend, San Diego, USA
FlowJo Version 10	Tree Star Inc., Ashland, USA
Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin: fMLP, 1 mM (1 mg + 2,3 ml DMF), gelöst in 1 ml PBS	F3506, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Human IFN-beta	300-02BC-5ug, PeproTech, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Human TGF-beta 1	100-21-2ug, PeproTech, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Lipocalin-2 protein	TP723847, OriGene Technologies Inc., Rockville, USA
LOX-1 antibody, anti-human, APC	REA1188, Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch-Gladbach, Deutschland
PE anti-human CD11b	BioLegend, San Diego, USA
PE anti CD51	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH
Phorbol 12-myristate 13-acetate, verdünnt zu 10 nM	P8139-1mg, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Propidiumiodid, 1,5 mM, 1 mg/mL PBS 1:100	P1304MP, Life Technologies, Carlsbad, USA
Q-VD-OPh	HY-12305-1mg, Hölzel Biotech, Köln, Deutschland

SNARF 1 mM, 1 mg + 1,7 mL DMF	C1271, Life Technologies Limited, Paisley, UK
TNF alpha 1 µg/mL in PBS + 0,1% BSA	300-01A, PeproTech by Thermo Fisher Scientific, USA

Mikroskopie	
10 x Minimum-Essential Medium	M0275; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol: „DAPI“, c=0,5 µg/mL	D9542, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Computersoftware Imaris®	Bitplane AG, Zürich, Schweiz
CoolLED pE-4000	CoolLED Ltd., Andover, Großbritannien
Dihydrorhodamin 123-Färbelösung: „DHR“, 1mM in DMF (c = 10 mg/26,2 ml)	D632, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
Filterwürfel DAPI/FI	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Fluoreszenzkamera: Leica DFC9000 GT	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin: fMLP, 1 mM (1 mg + 2,3 ml DMF), verdünnt zu 10 nM	F3506, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Harmonic Compound Objektiv: HC, PL FL L20x/0,40 CORR PH1	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
ibidi Heating System und ibidi Gas incubation System for CO2	10722, Firma IBIDI, Martinsried, Deutschland
Inversionsmikroskop Leica DMI 8	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Pure Col®, Bovine Collagen	5005, CellSystems GmbH, Troisdorf, Deutschland

LED QUAD Filterwürfel	Chroma Technology Corp., Bellows Falls, USA
Lipocalin-2 protein	TP723847, OriGene Technologies Inc., Rockville, USA
MPO antibody, anti-human, APC	REA 491, Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Natriumbikarbonat-Lösung 7,5 %	S8761, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Softwareplattform: Leica Application Suite X Version	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
µSlide-Chemotaxis ibiTreat	80326, ibidi GmbH, Gräfeling, Deutschland

Granulozyten-Isolierung	
Blutabnahmeröhrchen S-Monovette® Lithium Heparin LH 7,5 ml	01.1604, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Blutentnahmeröhrchen S-Monovette® Serum CAT 7,5 ml	01.1601.014, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Ficoll-Paque PREMIUM	17544203, Uppsala, Schweden
Gelafusal, 4% mod. Flüssige Gelatine in Ringer-Acetat	04101548, Serumwerk ,Bernburg, Deutschland
Innovatis Casy TTC Cell Counter & Analyser System	Schärfe-System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Leuko-Spin-Medium: PluriSpin	60-00091, PluriSelect Life Science – Worldwide, Leipzig, Deutschland
PBMC-Spin-Medium/Lympho-Spin-Medium	60-00092, PluriSelect Life Science – Worldwide, Leipzig, Deutschland
Safety-Multifly-Kanüle: 0,9 x 19 mm	156354, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Programme zur statistischen Auswertung	
Computersoftware Phoenix®	Certara L.P., Princeton, USA
Datenauswertungs-/Analyseprogramm IBM SPSS® Statistics Version	IBM, Armonk, USA
Kalkulationsprogramm Excel®	Microsoft Corporation, Redmond, USA

3.2 Votum der Ethikkommission

Diese Studie wurde gemäß den ethischen Grundsätzen der Deklaration von Helsinki durchgeführt und erhielt die Genehmigung der lokalen Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Regensburg (Aktenzeichen 20-1919-101).

3.3 Vorversuche

Im Folgenden werden zunächst die Schritte zur weiteren Planung der PMN-Funktionsprüfungen beschrieben. Die in der Einleitung genannten Tumorzellen wurden in Kultur genommen, um die Produktion von NGAL unter in vitro-Bedingungen mittels ELISA nachzuweisen und quantitativ zu erfassen. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein standardisiertes Protokoll erstellt, das in den nachfolgenden Experimenten eingesetzt wurde, um die durch NGAL induzierten Veränderungen an neutrophilen Granulozyten systematisch zu untersuchen.

3.3.1 Kultivierung der Tumorzellen

Für die durchgeführten Versuche wurden die hochinvasiven MDA-MB-231-Zellen eines Mammakarzinoms und BxPC3-Zellen eines pankreatischen Adenokarzinoms kultiviert. Die Zellen wurden in spezifischen Nährmedien kultiviert: DMEM für die MDA-MB-231-Zellen und RPMI-1640 für die BxPC3-Zellen, jeweils ergänzt mit 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin und 5 % Penicillin-Streptomycin. Die Kultivierung erfolgte unter sterilen Bedingungen in 75 cm² Kulturflaschen, bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit in einem normoxischen CO₂-Inkubator.

Bei Erreichen einer Subkonfluenz von 80-90 %, typischerweise nach etwa sechs bis sieben Tagen, wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden die Kulturen zunächst mit DPBS gewaschen und anschließend mit 4 mL Trypsin (0,125 %) vom Trägerboden gelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 6 mL Medium suspendiert und in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt, welches bei 272g für 5 Minuten (min) bei Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Nach dem Abpipettieren des Überstands wurde das Zellpellet in 10 mL frischem Medium resuspendiert und homogenisiert, um die Zellen im Verhältnis 1:10 auf neue Kulturflaschen zu verteilen. Für die Versuche kamen MDA-MB-231-Zellen der Passagen 30-40 und BxPC3-Zellen der Passagen 8-20 zum Einsatz.

3.3.2 Vorbereitung der Zellüberstände

Zur Vorbereitung auf die Bestimmung der NGAL-Konzentrationen wurden zunächst die Anzahl der Tumorzellen beider Zelllinien in der Neubauer-Zählkammer erfasst und 100.000 Zellen pro Well in eine 24-Well-Platte ausgesät. Die Wells wurden mit dem jeweiligen Kulturmedium auf 500 µL Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Platten wurden unter standardisierten Bedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert, ohne einen Mediumwechsel während der Inkubationszeit vorzunehmen. Nach 96 Stunden (h) wurden die Kulturmedien entnommen und in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden bei 778g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, woraufhin der Überstand in zwei separate 0,5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert wurde. Zur späteren Analyse wurden die Proben bei - 20 °C gelagert.

Für die weiteren Versuche am Durchflusszytometer und im Live Cell Imaging wurden 100.000 Zellen pro Well für 96 h kultiviert und die Überstände direkt im Anschluss verwendet.

3.3.3 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Zur Bestimmung der NGAL-Konzentrationen in den Zellüberständen wurde das Human Lipocalin-2/NGAL ELISA Kit nach Herstelleranweisung verwendet.

Mithilfe des Varioskan Flash ELISA Readers wurden die Absorptionen bei 450 nm gemessen. Diese wurden mittels der Software SkanIt in die Konzentrationen umgerechnet.

net. Hierfür wurde eine Vier-Parameter-Logistik-Kurve anhand der Standardreihe bestimmt. Die unbekannten Konzentrationen der Proben wurden anschließend anhand der Formel, die dieser Kurve zugrunde liegt, ermittelt.

3.4 Blutentnahme

Nach der Aufklärung zu den möglichen Risiken und Folgen wurde den freiwilligen, gesunden Blutspenderinnen und Blutspendern im Alter von 21 bis 60 Jahren 7,5 – 15 mL Blut aus einer Ellenbeugenvene entnommen. Die Blutentnahme fand direkt vor Beginn der Versuchsvorbereitung gegen 8 Uhr morgens statt. Dafür wurde eine geeignete Vene mittels Safety-Multifly-Kanüle punktiert und das Blut in ein Lithium-Heparin-Blutentnahmeröhrchen oder ein Serumröhrchen abgenommen.

3.5 Granulozytenisolierung und Serumgewinnung

Für die Versuche kamen verschiedene Isolationsmethoden zum Einsatz, welche im folgenden Abschnitt erläutert werden.

3.5.1 Dichtegradientenzentrifugation

Um das entnommene Vollblut nach den jeweiligen Zellarten aufzutrennen, wurde im Vorfeld des Versuchs eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dafür wurden in zwei 15 mL Zentrifugenröhrchen übereinander je 3 mL Leuko-Spin-Medium und PBMC-Spin-Medium geschichtet. Darüber wurde anschließend vorsichtig 3 mL Vollblut pipettiert. Die Proben wurden daraufhin für 20 min bei 765g ohne Bremse und bei Raumtemperatur zentrifugiert. Man erhielt auf diese Weise verschiedene makroskopisch abgrenzbare Schichten, welche jeweils unterschiedliche Zellarten enthielten. Die Schichten oberhalb des Granulozytenrings wurden mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Je 1 mL der Granulozytenlösung wurde pro Röhrchen abgehoben und in ein 1,5 mL Safe-Lock-Tube gegeben.

3.5.2 Sedimentieren

Das entnommene Vollblut verblieb nach der Probenentnahme für etwa eine Stunde bei Raumtemperatur in dem verwendeten Lithium-Heparin-Röhrchen, um die Separation der Blutbestandteile zu ermöglichen. Während dieser Zeit setzte sich das Blut in seine verschiedenen Schichten ab, wodurch sich ein gut sichtbarer Leukozytenring bildete. Aus diesem Ring konnte anschließend vorsichtig etwa 1 mL der Leukozytenfraktion entnommen werden. Für die weitere Verwendung wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit autologem Serum verdünnt.

3.5.3 Ficoll

In einem Zentrifugenröhrchen wurden zunächst 3 mL Ficoll pipettiert, woraufhin vorsichtig 3 mL Vollblut darüber geschichtet wurden. Das Röhrchen wurde anschließend für etwa 30 min stehen gelassen, bis sich die charakteristischen Ringe ausgebildet hatten. Nach dieser Ruhezeit konnten die Granulozyten aus der entstandenen Trennschicht isoliert werden. Für die weitere Verwendung wurden die Granulozyten im Verhältnis 1:5 mit RPMI und 10 % autologem Serum verdünnt.

3.5.4 Gelafundin

Zu 5 mL Vollblut in einem Zentrifugenröhrchen wurden 500 µL Gelafundin hinzugefügt. Nach vorsichtigem Schwenken des Röhrchens ließ man es etwa 30 min aufrecht stehen, sodass sich die Blutbestandteile trennen konnten. Anschließend wurden 700-800 µL der Granulozytenfraktion behutsam aus der entstandenen Trennschicht entnommen.

3.5.5 Gewinnung von autologem Serum

Für die Versuche mit dem Durchflusszytometer und das Live Cell Imaging wurde autologes Serum benötigt. Dafür wurde das abgenommene Serum-Röhrchen für 10 min bei 1181g und Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend der Überstand abgenommen.

3.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Messung verschiedener Parameter auf Einzelzellebene. Durch den Einsatz von Antikörpern, die an spezifische Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind, können Epitope auf der Zelloberfläche quantifiziert werden. Die Intensität der Fluoreszenz, im Weiteren bezeichnet mit AFU (artificial fluorescence unit), steht dabei in direktem Verhältnis zur Anzahl der an die Zelle gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexe. Neben der Quantifizierung von Oberflächenmolekülen ermöglicht diese Technik auch die Untersuchung der Binnenstruktur und des Zellvolumens, indem die Streuung des Laserstrahls aufgrund der Zellgröße und -granularität gemessen wird. Darüber hinaus erlaubt die Durchflusszytometrie den Nachweis von Farbstoffen, die durch zelluläre Prozesse in fluoreszierende Substanzen umgewandelt werden.

In vier verschiedenen Versuchsteilen wurden die Granulozyten nach der Inkubation in Tumorzellüberständen oder NGAL untersucht, um ihre Oberflächenepitope, die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie den Anteil vitaler Zellen zu analysieren. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die verschiedenen Versuchsteile.

Im ersten Versuchsteil wurden Granulozyten in den Überständen von Tumorzellen, im zweiten Teil in Zellmedium mit verschiedenen Konzentrationen des rekombinanten, humanen Proteins NGAL (0, 5, 15, 45 ng/mL) für definierte Zeiten (5, 30, 60, 150 Min) bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde Zellmedium mit den in 3.2.1 genannten Zusätzen verwendet. Im dritten Teil wurde der Einfluss des Caspase-Inhibitors Q-VD-OPh auf das Zellüberleben und die Granulozytenfunktionen bei einer Inkubation von 48 h untersucht. Anschließend wurden die PMNs im vierten Teil in TGF- β , IFN- β , NGAL oder ohne Zusatz bei 37 °C inkubiert. Nach 0, 24 und 48 h fanden Messungen statt.

	Isolierung der Granulozyten	Versuchsaufbau	Gemessene Parameter
I	Dichtegradientenzentrifugation (siehe 3.5.1)	Zugabe von 20 µL Granulozyten zu 250 µL Zellkulturüberstand von BxPC3 bzw. MDA-MB-231 (Abnahme nach 96 h, 100.000 Tumorzellen/Well) oder Zellmedium (RPMI-1640 bzw. DMEM ohne Zusätze) Inkubation für 5, 30, 60 und 180 min (37 °C)	Oxidativer Burst CD11b, CD51, CD62L
II	Dichtegradientenzentrifugation (siehe 3.5.1)	Zugabe von 20 µL Granulozyten zu 250 µL DMEM oder RPMI-1640 (ohne Zusätze) mit NGAL in den Konzentrationen 0, 5, 15, 45 ng/mL Inkubation für 5, 30, 60 und 180 min (37 °C)	Oxidativer Burst CD11b, CD51, CD62L
III	Gelafundin (siehe 3.5.4)	Zugabe von 500.000 Granulozyten zu 500 µL RPMI + 10 % autologes Serum. Zusätzlich Q-VD-Oph (c = 3 µM) sowie Kontrolle ohne Q-VD-Oph. Inkubation für 24 und 48 h (37 °C)	Oxidativer Burst CD11b, CD62L, CD66b Annexin
IV	Gelafundin (siehe 3.5.4)	Zugabe von 500.000 Granulozyten in 500 µL RPMI + 10 % autologes Serum. Zusätzlich TGF-β (c = 20 ng/mL), IFN-β (c = 100 ng/mL) oder NGAL (c = 45 ng/mL), sowie eine Kontrolle ohne zusätzliche Stimulation. Inkubation für 24 und 48 h (37 °C)	Oxidativer Burst CD11b, CD54, CD62L, CD66b, CD95, CD182, LOX-1

Tabelle 2: Versuchsreihen (I-IV) der Durchflusszytometrie

3.6.1 Oxidativer BURST

Der oxidative Burst, bei dem PMNs reaktive Sauerstoffspezies (ROS) freisetzen, kann durch die Stimulation mit Chemoattraktantien wie fMLP oder PMA ausgelöst werden. PMA dient dabei als Positivkontrolle und führt zu einer stark ausgeprägten ROS-Produktion. Durch die Sauerstoffradikale wird 1,2,3-Dihydrorhodamin zu Rhodamin 123

oxidiert. Rhodamin kann bei einer Wellenlänge von 507 nm zur Fluoreszenz angeregt werden und emittiert daraufhin Licht mit einer Wellenlänge von 529 nm.

Um diesen Prozess zu analysieren, werden die Zellen gemäß den Vorgaben in den folgenden Tabellen (Tabelle 3 und Tabelle 4) vorbereitet und unmittelbar am Gerät gemessen.

Ansatz	DPBS	PMN-Lösung	DHR	SNARF	TNF α			20 min im Wasserbad bei 37°C, danach 5 min bei 4°C	PI
LW	750 μ L	270 μ L	10 μ L	10 μ L		10 min im Wasserbad bei 37°C			10 μ L
fMLP u. TNF α	750 μ L	270 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L		10 μ L fMLP		10 μ L
PMA	750 μ L	270 μ L	10 μ L	10 μ L			10 μ L PMA		10 μ L

Tabelle 3: Pipettierschema Durchflusszytometrie Versuche I und II

Ansatz	DPBS	PMN-Lösung	DHR	SNARF	TNF α			20 min im Wasserbad bei 37°C, danach 5 min bei 4°C	PI
LW	300 μ L	50 μ L	3 μ L	3 μ L		10 min im Wasserbad bei 37°C			3 μ L
fMLP u. TNF α	300 μ L	50 μ L	3 μ L	3 μ L	3 μ L		3 μ L fMLP		3 μ L
PMA	300 μ L	50 μ L	3 μ L	3 μ L			3 μ L PMA		3 μ L

Tabelle 4: Pipettierschema Durchflusszytometrie Versuche III und IV

Tabelle 5 gibt Aufschluss über die Konzentrationen der jeweiligen Stoffe in der fertigen Lösung.

DHR	1 μ M
SNARF	0,1 μ M
TNF- α	10 ng/mL
fMLP	0,1 μ M
PMA	0,1 μ M
Propidiumiodid	15 μ M

Tabelle 5: Endkonzentrationen der Zusätze für die Burst-Messung

3.6.2 Bestimmung der Oberflächenepitope

Um die spezifischen Oberflächenproteine der Granulozyten darzustellen, wurden Antikörper verwendet, welche an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind. Für die FACS-Versuchsreihen 1 und 2 waren die Antikörper gegen CD11b (Integrin α -M), CD51 (Integrin α V β 5) und CD62L (L-Selektin) gerichtet. Für die dritte Versuchsreihe wurden CD11b, CD54 (ICAM-1), CD62L, CD66b (CEACAM8), CD95 (Fas-Rezeptor), CD182 (CXCR2), LOX-1 (Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1) verwendet.

Die nachfolgenden Tabellen (Tabelle 6 und Tabelle 7) erläutern die einzelnen Schritte für die Vorbereitung der Zellen.

Ansatz	DPBS	Granulozyten-Suspension	AKs		DPBS	ZF		DPBS
Leerwert	1000 μ L	270 μ L	0	Vortexen, 15 min bei 4°C + finster	2000 μ L	3 min 425g bei 4°C	Über- stand abkippen	200 μ L
Antikörper	1000 μ L	270 μ L	Je 10 μ L		2000 μ L			200 μ L

Tabelle 6: Pipettierschema für die Versuche I und II

AKs = Antikörper mit gekoppelten Farbstoffen. ZF = Zentrifugation

Ansatz	DPBS	Granulozyten-Suspension	AKs		DPBS	ZF		DPBS
Leerwert	80 μ L	50 μ L	0	Vortexen, 15 min bei 4°C + finster	2000 μ L	3 min 425g bei 4°C	Über- stand abkippen	200 μ L
Antikörper	80 μ L	50 μ L	Je 3 μ L		2000 μ L			200 μ L

Tabelle 7: Pipettierschema für die Versuche III und IV

AKs = Antikörper mit gekoppelten Farbstoffen. ZF = Zentrifugation

Die Antikörper mit den jeweils gekoppelten Farbstoffen (PE, FITC, APC) wurden durch Bestrahlung bei 488nm und 635nm aktiviert und an 5 Detektoren erfasst. Die Messungen wurden als Dot-Plots dargestellt.

3.6.3 Annexin V-Test

Im dritten Versuchsteil wurde der Anteil an vitalen oder apoptotischen Granulozyten mithilfe des FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I bestimmt. Zunächst wurde der

Bindepuffer im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Anschließend wurden jeweils 50 μL der Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen gegeben und 20 μL des vorbereiteten Bindepuffers hinzugefügt. Danach wurden 3 μL Annexin und 3 μL PI zugegeben. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden nochmals 100 μL des Bindepuffers hinzugefügt und die Proben unmittelbar am Durchflusszytometer gemessen.

3.7 Vorbereitung der Mikroskopie und Ablauf der Messung

In diesem Abschnitt wird die Vorbereitung der Mikroskopie-Slides der Firma ibidi erläutert. Mithilfe dieser Methode kann das Migrationsverhalten durch die Gelmatrix, die ROS-Produktion, die MPO-Freisetzung sowie die NETose über einen individuell festgelegten Zeitraum quantifiziert werden.

Ein μ -Slide Chemotaxis® besteht aus drei separaten Systemen, welche aus jeweils zwei Reservoiren (blau) gebildet werden, die über den gelgefüllten Kanal (weiß) miteinander in Verbindung stehen (Abbildung 2). Durch das Gel ist eine Trennung der in die Reservoirs eingefüllten Lösungen gewährleistet.

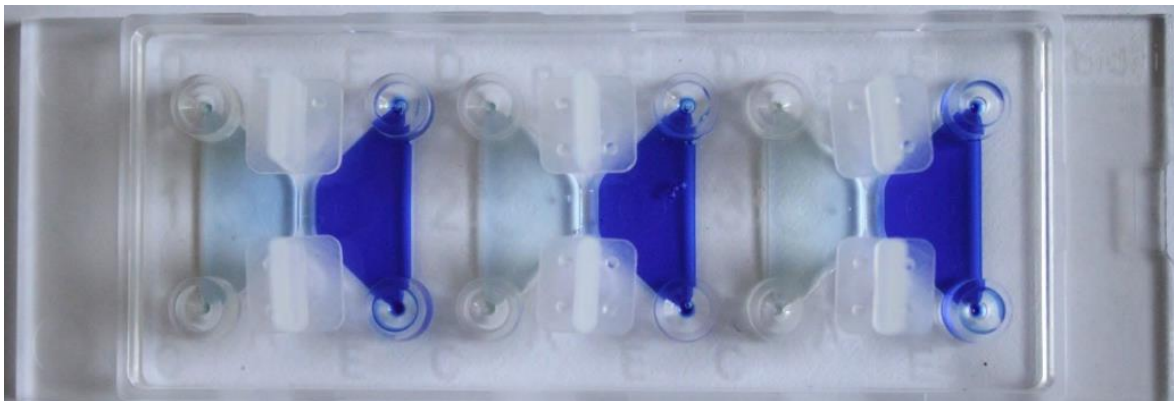


Abbildung 2: μ -Slide Chemotaxis®

Abbildung mit freundlicher Genehmigung durch IBIDI. Hellblau: linkes Reservoir, dunkelblau: rechtes Reservoir, dazwischen liegt der Kanal.

3.7.1 Gelmatrix und Kanäle

Die μ -Slide-Chemotaxis Kammern sowie die zugehörigen Verschlussstopfen wurden ab dem Vortag des Versuchs im Brutschrank inkubiert. Ebenso wurde bereits am Vortag das Gel vorbereitet. Dazu wurden 20 μL 10x MEM, 20 μL Aqua dest., 10 μL NaHCO_3 und 50 μL RPMI in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß pipettiert.

Direkt vor dem Befüllen des Kanals wurden dieser Suspension 5 µL DAPI, 3 µL DHR, 10 µL MPO-Antikörper, 50 µL RPMI mit autologem 10 % Serum sowie 150 µL Kollagen Typ 1 beigelegt. Die Konzentration von DAPI betrug somit im fertigen Gel 8,3 ng/mL und 1 µM von DHR. Unter Auf- und Abpipettieren wurde die Matrix homogenisiert. 7 µL des Gemisches wurden vorsichtig in jeden der drei Kanäle des Chemotaxis µ-Slides eingebracht.

Mithilfe der Verschlussstopfen wurden die Kanäle verschlossen. Die Slides inkubierten im Anschluss über einen Zeitraum von 30-45 min im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂, bis das Gel ausgehärtet war. Anschließend wurden die Kanäle unter dem Mikroskop hinsichtlich eventueller Lufteinschlüsse oder Inhomogenitäten kontrolliert.

3.7.2 Rechte Reservoir

Nach Kontrolle der Kanäle wurden die Reservoirs befüllt, welche auf beiden Seiten den Kanälen angrenzen. In das rechte Reservoir wurden die Granulozyten eingebracht, welche, wie unter 3.5.2 und 3.5.3 beschrieben, isoliert wurden.

Für den Vergleich von NGAL zu fMLP wurden die Granulozyten durch Sedimentation isoliert, für den Vergleich zu den Tumorzellüberständen wurde die Isolation mittels Ficoll gewählt. Das Befüllen der Reservoirs fand etwa 2 h nach der Blutentnahme statt.

3.7.3 Linke Reservoir

In die linken Reservoirs wurden je nach Fragestellung verschiedene Substanzen zur Beeinflussung der Granulozytenfunktionen eingefüllt. Eine Übersicht über die angewendeten Bedingungen gibt Tabelle 8.

Stimulation	Kontrolle
fMLP (c=10 nM) in RPMI + 10 % Serum	RPMI + 10 % Serum
NGAL (c=45 ng/mL) in RPMI + 10 % Serum	RPMI + 10 % Serum
MDA-MB-231 Überstand nach 96 h Wachstum	DMEM + 10 % Serum
BxPC3 Überstand nach 96 h Wachstum	RPMI + 10 % Serum

Tabelle 8: Lösungen für die linken Reservoirs mit jeweiliger Kontrollbedingung

3.7.4 Mikroskopie-Einstellungen

Mit den Stopfen wurden anschließend alle Einlässe verschlossen und der Slide wurde in die Klimakammer des Leica DMI8 Inversionsmikroskops eingesetzt. Die Klimakammer garantierte eine Atmosphäre mit 5 % CO₂, 37 °C und erhöhter Luftfeuchtigkeit.

Die Aufnahmen (siehe Abbildung 3) entstanden unter Einsatz der Schwarz-Weiß-Kamera Leica DFC9000 GT sowie eines Harmonic Compound Objektivs mit 10-facher Vergrößerung und der Lichtquelle CoolLED pE-4000. Für die Aufnahme von DAPI (λ abs. 385 nm) und Rhodamin 123 (λ abs. 490 nm) kam der DAPI/FI-Filterwürfel zum Einsatz, während für Anti-MPO-APC (λ abs. 635 nm) der LED QUAD-Filterwürfel verwendet wurde.

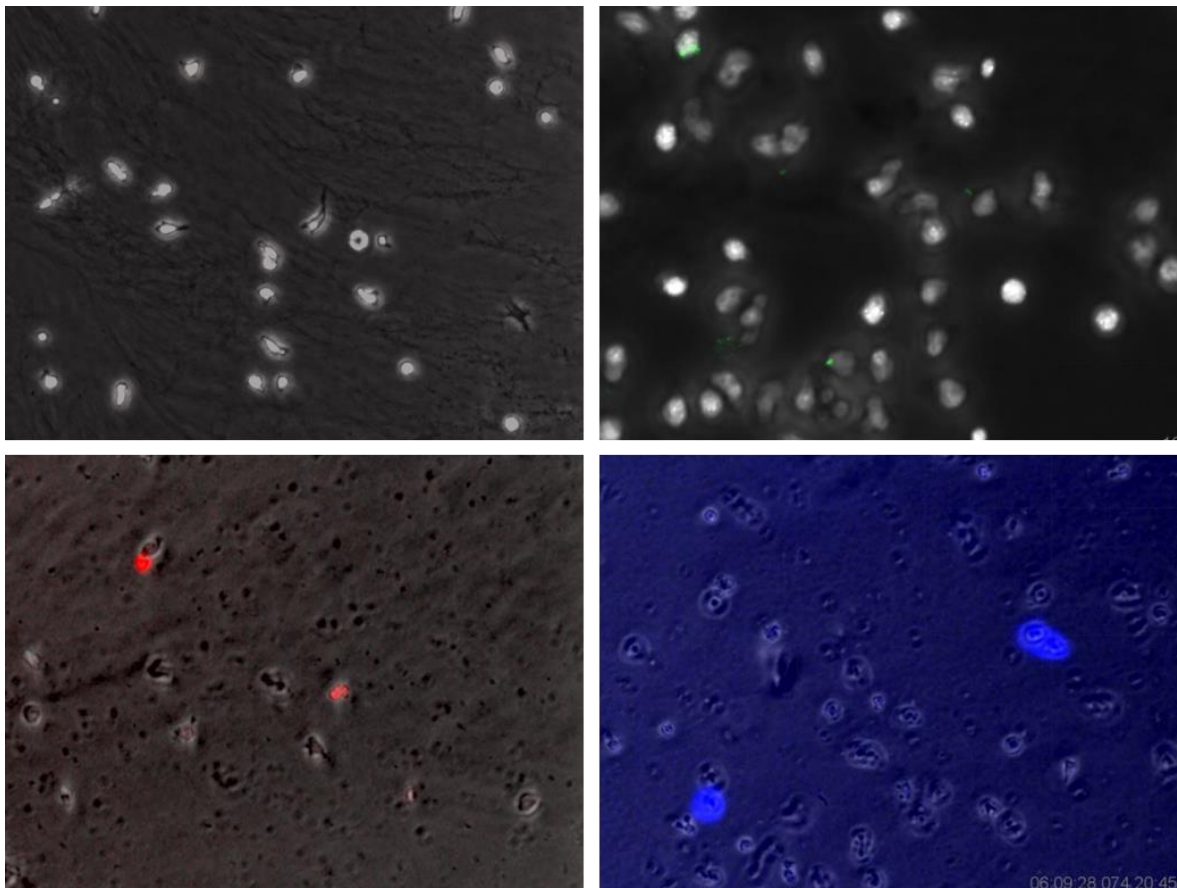


Abbildung 3: Aufnahmen des Live Cell Imagings.

Oben links: Weißlichtmikroskopie. Oben rechts: Anfärbung mit anti-MPO-AK (grün). Unten links: Darstellung der ROS-Produktion durch Rhodamin 123 (rot). Unten rechts: Darstellung der NETose mit DAPI (blau).

Die Migration wurde durch den Phasenkontrast der Weißlichtmikroskopie dargestellt. Dabei beobachtet man über den Verlauf mehrerer Stunden die Bewegungen der Granulozyten durch das im Kanal eingefügte kollagenhaltige Gel im Abstand von jeweils 30 Sekunden.

Zur ROS-Analyse bedient man sich der Fluoreszenzeigenschaften von 1,2,3-Dihydro-rhodamin, welches durch Sauerstoffradikale zu Rhodamin 123 oxidiert. Rhodamin 123 wird im Wellenlängenbereich von 532 nm zur Fluoreszenz angeregt.

Die MPO-Freisetzung wurde durch einen monoklonalen Anti-MPO-Antikörper gemessen, welcher an Allophycocyanin (APC) gebunden ist. APC zeigt eine Fluoreszenzantwort mit einer Wellenlänge von 660 nm durch Anregung bei 635 nm.

Im Zuge der NETose wird nukleäre DNA in den Extrazellularraum freigesetzt. Für die Darstellung der nukleinsäurereichen NETs wurde 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) verwendet, welches sich an doppelsträngige DNA anlagert und nach Anregung im Wellenlängenbereich von 461 nm fluoresziert.

Eine Zusammenfassung der verwendeten Wellenlängen und Filterwürfel zur Messung der jeweiligen PMN-Parameter gibt Tabelle 9.

Farbstoff	PMN-Funktion	Anregungs-/ Emissionswellenlänge	Filterwürfel
Rhodamin 123	Oxidativer Burst	490 nm/532 nm	DAPI/FI
Anti-MPO-APC	MPO-Freisetzung	635 nm/660 nm	LED-Quad
DAPI	NETose	385 nm/461 nm	DAPI/FI

Tabelle 9: Farbstoffe, Wellenlängen und Filterwürfel im Live Cell Imaging

Innerhalb eines Zeitfensters von 30 Sekunden wurde jeweils eine Aufnahme je Parameter angefertigt. So entstanden in der Beobachtungszeit von 10 bis 24 h 1200-2800 Einzelaufnahmen. Die Steuerung des Mikroskops sowie die Verarbeitung der entstandenen Aufnahmen wurde softwaregestützt mittels Leica Application Suite X vorgenommen.

3.8 Auswertung der Daten der Durchflusszytometrie

Zur Analyse der Daten wurde zunächst die Software FlowJo verwendet. Im ersten Schritt wurden die Granulozyten anhand ihres Zellvolumens und der Granularität identifiziert. Danach erfolgte eine weitere Auswertung anhand der Fluoreszenzen der eingesetzten Farbstoffe. Die einzelnen Schritte der Auswertung sind in Abbildung 4 dargestellt. Es erfolgte schließlich ein Export der Daten, bestehend aus einem eindeutigen

Probennamen, des Mean und Median und/oder Anteil der Zellen in der jeweiligen Subpopulation als Excel-Datei. Die Daten wurden durch versuchsspezifische Eigenschaften vervollständigt. Mittels der Software SPSS erfolgte die statistische Auswertung.

Nach Identifikation der Granulozyten wurden im nächsten Schritt die toten Zellen aussortiert, welche durch PI angefärbt waren. Die ROS-Produktion wurde durch Messung der AFU von Rhodamin quantifiziert. Es ergab sich ein Mean und Median der jeweiligen Stimulation. Für die Auswertung wurden die Mediane von fMLP + TNF- α bzw. PMA nach Abzug der Leerwerte herangezogen.

Die Fluoreszenzintensitäten der an die Antikörper gekoppelten Farbstoffe wurden gegen die Granularität aufgetragen. Es wurden der Mean und Median der jeweiligen AFU bestimmt. In Excel wurden die Leerwerte von den Positivkontrollen abgezogen.

Nach Auswahl der Granulozyten wurden die Fluoreszenzen von PI auf der Y-Achse gegen die Fluoreszenz von Annexin FITC auf der X-Achse aufgetragen. Durch die Aufteilung in Quadranten konnten die PI positiven, Annexin V positiven, Annexin V und PI positiven sowie die Annexin V und PI negativen Zellen unterschieden werden. Vitale Zellen präsentierten sich negativ für beide Farbstoffe, früh-apoptotische Zellen zeigten eine Anfärbung durch Annexin V FITC und spät-apoptotische Zellen bzw. nekrotische Zellen sind sowohl PI als auch Annexin V positiv.

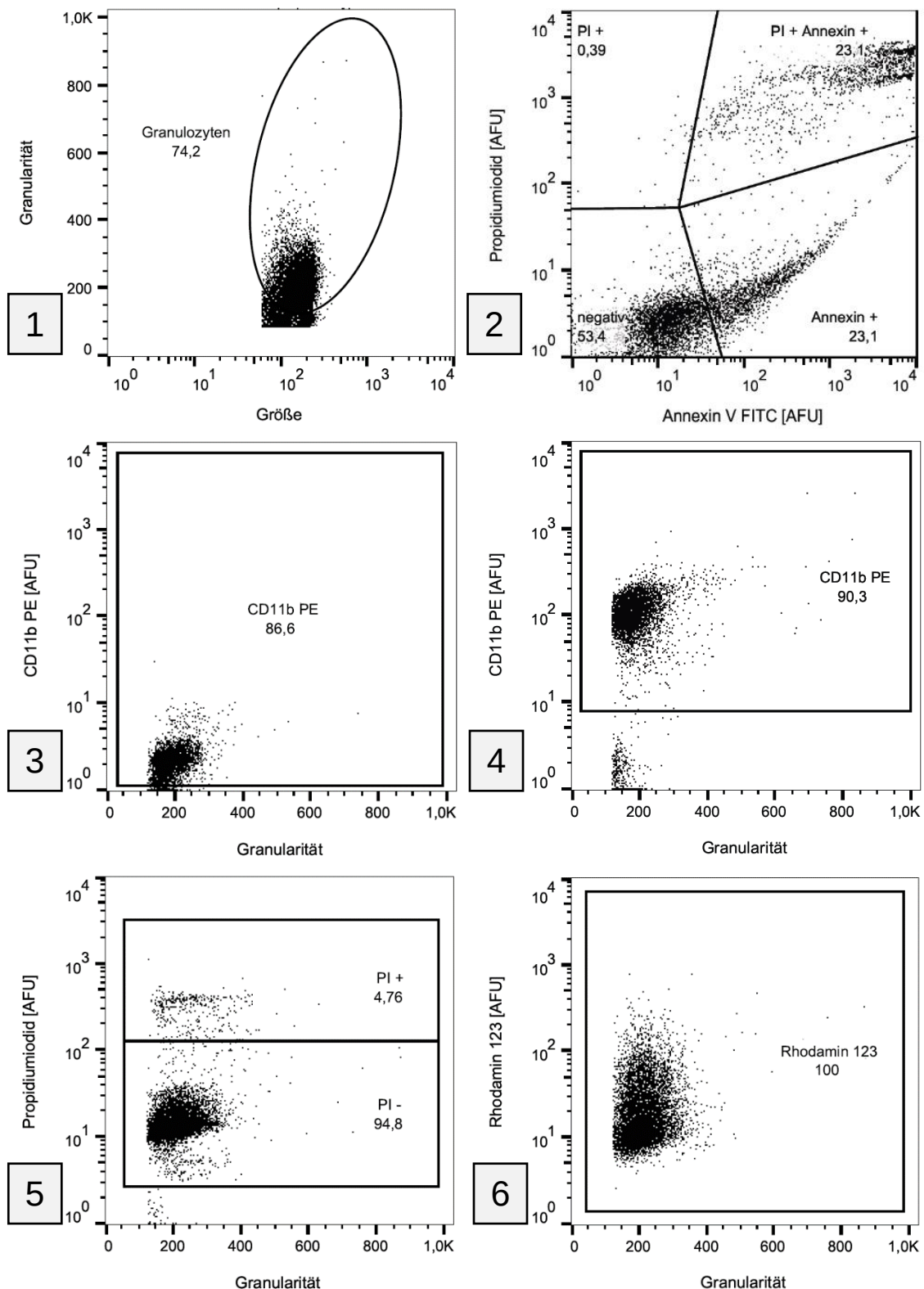


Abbildung 4: Schritte zur Auswertung der Daten der Durchflusszytometrie mittels FlowJo. 1: Eingrenzen der Granulozyten anhand der Größe und Granularität. 2: Einteilung der Zellen anhand der Anfärbung mit PI und/oder Annexin V. 3: Leerwertmessung zur Analyse der Oberflächenepitope. 4: Messung der Fluoreszenzintensität von CD11b PE mit Ausschluss ungültiger Zellen. 5: Auswahl der vitalen Granulozyten (PI-) für die Analyse des oxidativen Bursts. 6: Dotplot bei Stimulation durch fMLP und TNF- α zur Messung des oxidativen Bursts.

3.9 Auswertung der Mikroskopie-Aufnahmen

3.9.1 Datenverarbeitung mit der Software Imaris

Im Anschluss an die Versuche wurden die erzeugten Bildreihen mit der Computersoftware Imaris verarbeitet. Die Randbereiche des Kanals wurden ausgeschlossen, um eventuelle Artefakte zu verhindern.

Für die Analyse der Migration wurden die Zellen im Phasenkontrast aufgrund der Intensitätsunterschiede zum Hintergrund erfasst und mittels Spots markiert. Die erzeugten Spots wurden über die Dauer von 30 Min, entsprechend 60 Einzelaufnahmen, verfolgt und die Wegstrecken als *Tracks* sichtbar gemacht. Mithilfe der Anpassung des Kriteriums „Quality“ konnte ein Einschluss der Granulozyten sichergestellt werden. Dafür wurden folgende Kriterien festgelegt: ein geschätzter Zelldurchmesser von 13 μm und eine maximale Distanz von 40 μm zwischen zwei Zeitpunkten.

Auf diese Weise konnten die folgenden Migrationsparameter quantifiziert werden:

Track Displacement X [μm]	zurückgelegte Wegstrecke in x-Richtung
Track Displacement Y [μm]	zurückgelegte Wegstrecke in y-Richtung
Track Length [μm]	tatsächlich zurückgelegte Wegstrecke
Track Displacement Length [μm]	Distanz zwischen Ausgangs- und Endpunkt
Track Straightness	Maß für die Zielgerichtetheit der Bewegung
Track Duration [s]	Dauer der Migration

Tabelle 10: Parameter der Migrationsanalyse

Die somit erzeugten Datensätze wurden als Tabelle aus Imaris exportiert und weiter in Excel bearbeitet.

Zur Auswertung der Immuneffekte NETose, MPO- und ROS-Produktion wurde den Fluoreszenzen eine jeweilige, falsche Farbe zugeordnet. Bei Überschreiten einer festgelegten Intensität der Fluoreszenzen wurden diese durch Imaris in der Option *Surface* erfasst. Es erfolgte eine Quantifizierung der angefärbten Gesamtflächen aller aktivierten Zellen pro Zeitpunkt. Da sich diese Parameter langsamer veränderten, wurde nur jede fünfte Aufnahme zur Analyse betrachtet. Die erzeugten Daten wurden ebenfalls an Excel exportiert.

3.9.2 Migration

Die Migrationsdaten wurden in einer Tabelle zusammengefasst und mit weiteren Informationen über den Versuch (Stimulation, Versuchsnummer) vervollständigt. Die Tracks wurden anhand ihrer Track Lengths sortiert. Nur die ersten 50 Zellen wurden weiter analysiert. Als weitere Einschlusskriterien galten Track Lengths $\geq 25 \mu\text{m}$ und Track Durations ≥ 900 Sekunden.

3.9.3 Rhodamin 123

Die exportierten Tabellen zeigten die erkannten Flächen zu jedem Zeitpunkt auf. Es erfolgte eine Addition der einzelnen Flächen zu jedem Zeitpunkt. Die summierten Werte wurden in einer Verlaufskurve gegen die Beobachtungszeit aufgetragen. Anhand dieser konnte der Zeitpunkt der maximalen ROS-Produktion bestimmt werden. Für den Zeitpunkt des Maximums sowie den Bereich von ± 5 Bildzeitpunkten wurde anhand der Messwerte ein Polynom dritten Grades errechnet. Durch Ableitung und Nullstellenbestimmung konnte der Zeitpunkt der maximalen ROS-Produktion berechnet werden. Die berechneten Maxima wurden anschließend zwischen den verschiedenen Bedingungen verglichen.

3.9.4 NETose und MPO-Produktion

Für die mithilfe von DAPI und anti-MPO-Antikörper dargestellten PMN-Funktionen NETose und MPO-Produktion wurde jeweils eine sigmoidale Kurve aus den summierten Flächen in Abhängigkeit der Zeit angenommen. Mittels der Software Phoenix wurde diese anhand der folgenden Gleichung beschrieben:

E : *Ermittelter Effekt*

E_0 : *Effekt zu Beginn*

E_{max} : *maximaler Effekt*

T : *Zeit*

$$E = E_0 \times \frac{E_{max} \times T^\gamma}{ET_{50}^\gamma + T^\gamma}$$

Die dadurch berechneten ET_{50} -Werte wurden für als Vergleichsparameter für die verschiedenen Bedingungen verwendet.

3.10 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte anhand der Analysesoftware IBM SPSS. Zunächst wurde jede Gruppe mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung überprüft. Bei Normalverteilung erfolgte eine Untersuchung auf Varianzhomogenität mittels Levene-Test. Wenn alle relevanten Daten normalverteilt waren und eine Varianzhomogenität vorlag, wurden bei mehreren Vergleichen die Mittelwerte (MW) unter Berücksichtigung der Standardabweichung ($\pm$ SD) mithilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) auf signifikante Unterschiede untersucht. Die anschließende Post-Hoc-Analyse erfolgte in diesem Fall mit der Bonferroni-Testung. Falls die Varianzhomogenität nicht gegeben war, kam die Welch-ANOVA mit anschließendem Dunnett-T3-Verfahren zum Einsatz. Bei Vergleich zweier normalverteilter Gruppen wurde ein t-Test durchgeführt.

Wenn die zu vergleichenden Daten nicht normalverteilt waren, wurde der Vergleich der zentralen Tendenzen der verschiedenen Gruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, wobei die Mediane und Interquartilsabstände (IQR) angegeben wurden. Zur Ermittlung der angepassten Signifikanzen erfolgte die Post-Hoc-Analyse mithilfe des Dunn-Bonferroni-Tests. Wurden nur zwei Gruppen miteinander verglichen, wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Bei Normalverteilung wurden zur graphischen Darstellung der Daten Fehlerbalkendiagramme verwendet. Dabei werden der Mittelwert sowie eine Standardabweichung visualisiert. Lag keine Normalverteilung vor, erfolgte die Darstellung mittels einfacher und gruppierter Boxplots. Dabei werden die Boxen aus dem 25. Perzentil (untere Begrenzung) und dem 75. Perzentil (obere Begrenzung) gebildet. Die Differenz der genannten Perzentile entspricht dem Interquartilbereich (IQR). Der Median wird durch eine Linie innerhalb der Box dargestellt. Die T-Balken zeigen den 1,5-fachen Interquartilabstand.

Es gilt eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als statistisch signifikant.

4 Ergebnisse

4.1 Daten zu den Probandinnen und Probanden

Insgesamt wurden für die durchgeführten Versuche Granulozyten von 32 Spenderinnen und Spendern verwendet. Die Probandinnen und Probanden hatten ein Alter von 21 bis 60 Jahren (Median 24,5). 27 der Versuchspersonen waren weiblich, fünf waren männlich.

4.2 NGAL-Konzentrationen in Tumorzellüberständen

Durch die Bestimmung der NGAL-Konzentrationen der Tumorzellüberstände mittels ELISA konnte die Produktion des Proteins NGAL nachgewiesen werden. Nach 96 h Inkubationsdauer ergab sich ein Median der NGAL-Konzentration von $26,7 \pm 17,6$ ng/mL in den Überständen der BxPC3-Zellen und $24,9 \pm 9,8$ ng/mL in den Überständen der MDA-MB-231 Zellen (vgl. Abbildung 5). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den NGAL-Konzentrationen in den Überständen der beiden Tumorzelllinien ($p = 0,437$).

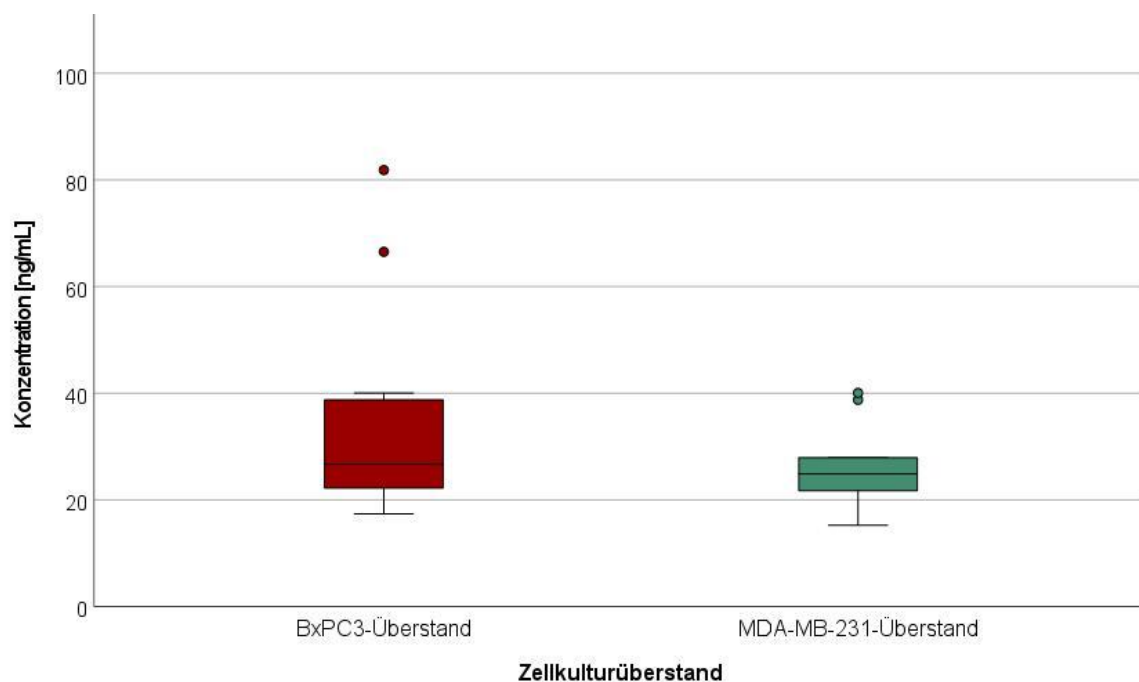


Abbildung 5: Konzentration von NGAL [ng/mL] in den Tumorzellüberständen der Zelllinien BxPC3 und MDA-MB-231

4.3 Ergebnisse aus den durchflusszytometrischen Versuchen

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Durchflusszytometrie dargelegt. Da sich die einzelnen Versuchsteile in ihrem Aufbau und der Granulozytenisolationsmethode unterscheiden, werden diese separat betrachtet.

4.3.1 Inkubation mit Tumorzellüberständen

In der ersten Versuchsreihe wurde beobachtet, ob es zu Unterschieden der Oberflächenepitope CD11b, CD51 und CD62L sowie in der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies kommt, wenn die Granulozyten in Tumorzellüberständen im Vergleich zu Zellkulturmedien inkubiert werden. Die Inkubation erfolgte über Zeiträume von 5, 30, 60 und 150 min.

4.3.1.1 Oxidativer Burst

Es wurden die Mittelwerte der medianen Fluoreszenzintensitäten von Rhodamin 123 bei Stimulation mit fMLP und TNF- α bzw. PMA zu jedem Zeitpunkt zwischen den Inkubationsmedien verglichen (vgl. Abbildung 6).

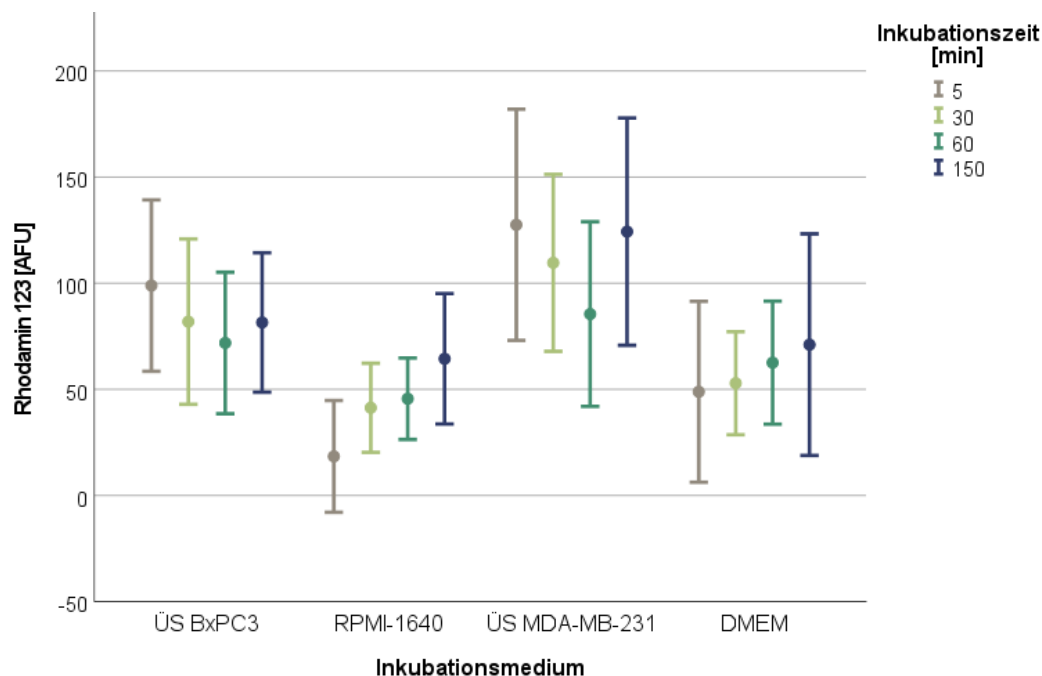


Abbildung 6: Fluoreszenzintensitäten von Rhodamin 123 bei Stimulation der Granulozyten durch fMLP und TNF- α

Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, weder im zeitlichen Verlauf innerhalb einer Gruppe, noch zwischen den Inkubationsmedien zu einem Zeitpunkt. Der

höchste Wert bei Stimulation mit fMLP und TNF- α wurde bei den Überständen von MDA-MB-231 nach einer Inkubationszeit von 5 min gemessen (128 AFU), während der niedrigste Wert bei den Granulozyten in RPMI-1640 zum selben Zeitpunkt mit 18,5 AFU ermittelt wurde. Zu jedem Zeitpunkt erwies sich die Fluoreszenzintensität unter beiden Stimulationen bei DMEM höher als bei RPMI und bei dem Überstand von MDA-MB-231 höher als bei BxPC3. Bei den Kulturmedien DMEM und RPMI-1640 wurde eine Zunahme der Rhodamin 123-Fluoreszenz über die Zeit beobachtet, während die Werte in den Tumorzellüberständen gering abnahmen.

4.3.1.2 Oberflächenepitope

Für die statistische Auswertung der Oberflächenepitope CD11b, CD51 und CD62L wurden die vier verwendeten Inkubationsmedien in die folgenden Kategorien zusammengefasst:

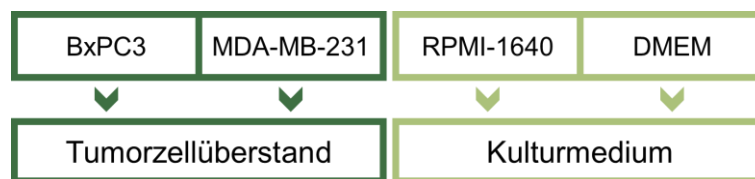


Abbildung 7: Einteilung der Inkubationsmedien in die Kategorien Tumorzellüberstand bzw. Kulturmedium

Die Fluoreszenzintensitätswerte waren zu den Zeitpunkten 0 und 150 min in den Gruppen Tumorzellüberstand und Kulturmedium normalverteilt. Nicht normalverteilt waren hingegen die CD62L-Fluoreszenzwerte in den Kulturmedien bei 5 und 150 min. Es zeigten sich signifikante Unterschiede in der Expression von CD11b bei Vergleich der Kategorien zum jeweiligen Zeitpunkt ($p < 0,001$). Nach 5 min Inkubation fiel ebenso ein signifikanter Unterschied der CD51-Expression auf. Bei den Fluoreszenzintensitäten von CD62L wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den in Tumorzellüberständen bzw. Kulturmedien inkubierten Granulozyten festgestellt. Die Fluoreszenzintensitäten und p-Werte der Vergleiche zwischen den Kategorien zu den Zeitpunkten 5 und 150 min sind der Tabelle 11 zu entnehmen:

	[min]	[AFU] im Kulturmedium		[AFU] im Tumorzellüberstand		Test	p
		MW	Median	MW	Median		
CD11b	5	230	237	1320	1334	T	< 0,001
	150	489	387	1354	1446	T	< 0,001
CD51	5	4,46	4,45	5,39	5,20	T	0,039
	150	5,10	4,79	5,13	4,62	T	0,966
CD62L	5	105	109	81,6	83,5	MWU	0,059
	150	89,8	95,9	68,4	66,9	MWU	0,081

Tabelle 11: Mittelwerte (MW) und Mediane der Fluoreszenzintensitäten.

Angabe der Signifikanzwerte (p) nach Vergleich der Fluoreszenzintensitäten zwischen den Inkubationsmedien zum jeweiligen Zeitpunkt mittels t-Test (T) oder Mann-Whitney-U-Test (MWU).

Der Mann-Whitney-U-Test identifizierte eine signifikante Abnahme der CD62L-Fluoreszenz zwischen 5 min (Median 109 AFU) und 150 min (Median 95,9 AFU) bei Inkubation im Kulturmedium ($p = 0,040$). Bei den anderen Epitopen wurden keine Unterschiede in der Fluoreszenzintensität im zeitlichen Verlauf beobachtet.

4.3.2 Inkubation mit NGAL

In dieser Versuchsreihe wurde getestet, ob sich eine Inkubation in verschiedenen NGAL-Konzentrationen auf die Granulozytenfunktionen auswirkt. Die verwendeten Konzentrationen waren 0, 5, 15 und 45 ng/mL, jeweils gelöst in RPMI-1640 oder DMEM. Wie im ersten Versuchsteil betrugen die Inkubationszeiten der Granulozyten 5, 30, 60 und 150 min.

4.3.2.1 Oxidativer Burst

Zunächst wurden die Rhodamin 123-Fluoreszenzwerte in den verwendeten Inkubationsmedien RPMI-1640 und DMEM, unabhängig von der NGAL-Konzentration, verglichen. Über alle Zeitpunkte hinweg zeigten sich bei beiden Stimulationen höhere Fluoreszenzintensitäten von Rhodamin 123 bei Inkubation in DMEM im Vergleich zu RPMI-1640. Nach 30- und 60-minütiger Inkubation und Stimulation mit fMLP (0,1 μ M) und

TNF- α (10 ng/mL) erwiesen sich diese Unterschiede als signifikant ($p = 0,024$ bzw. $p = 0,003$). **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** im Anhang gibt Aufschluss über die jeweiligen Mittelwerte.

Die verschiedenen Konzentrationen von NGAL zeigten unabhängig vom Inkubationsmedium keinen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität von Rhodamin 123, weder bei Stimulation durch fMLP und TNF- α , noch bei PMA (Abbildung 8).

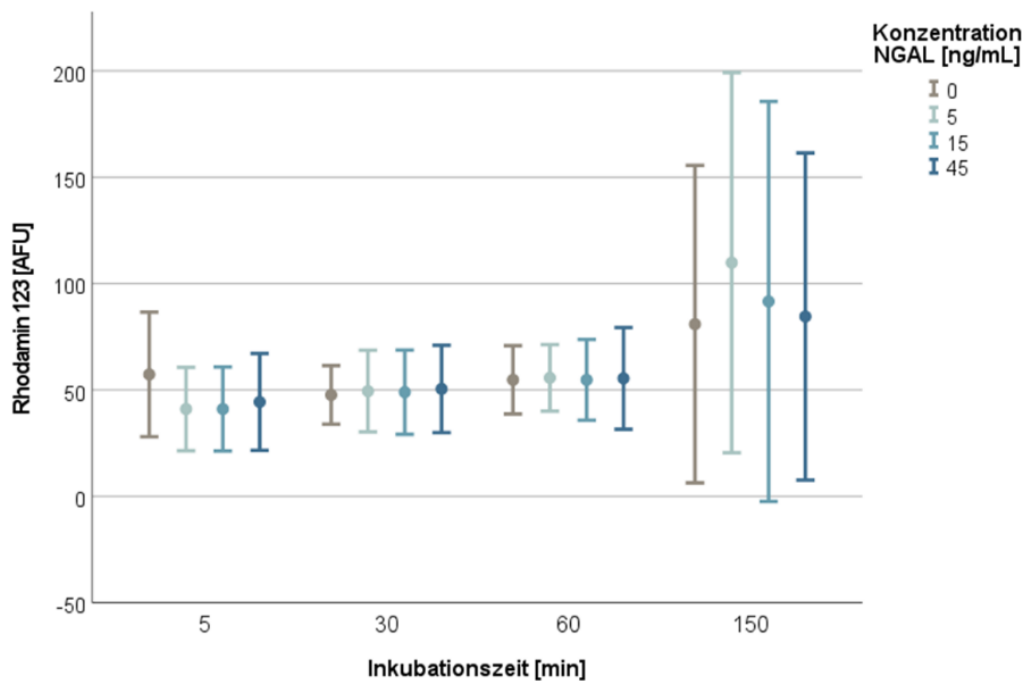


Abbildung 8: Fluoreszenzintensität von Rhodamin 123 bei Stimulation der Granulozyten mit fMLP und TNF- α und Inkubation in DMEM

4.3.2.2 Oberflächenepitope

Die Untersuchung der Oberflächenmerkmale CD11b, CD51 und CD62L ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den verwendeten Inkubationsmedien RPMI-1640 und DMEM zu den jeweiligen Zeitpunkten. Daher wurde in der weiteren Analyse nur noch die Wirkung der verschiedenen NGAL-Konzentrationen betrachtet. Auch hierbei zeigten sich bei keinem der untersuchten Oberflächenepitope signifikante Unterschiede zwischen in den verschiedenen NGAL-Konzentrationen inkubierten Granulozyten. Bei Analyse der Fluoreszenzen über die verschiedenen Messzeitpunkte hinweg, unabhängig von Inkubationsmedium und der NGAL-Konzentration, ergab der

Kruskal-Wallis-Test eine signifikante Zunahme der CD11b-Expression (siehe Abbildung 9). Die Expression von CD51 und CD62L blieb hingegen im zeitlichen Verlauf ohne signifikante Änderung.

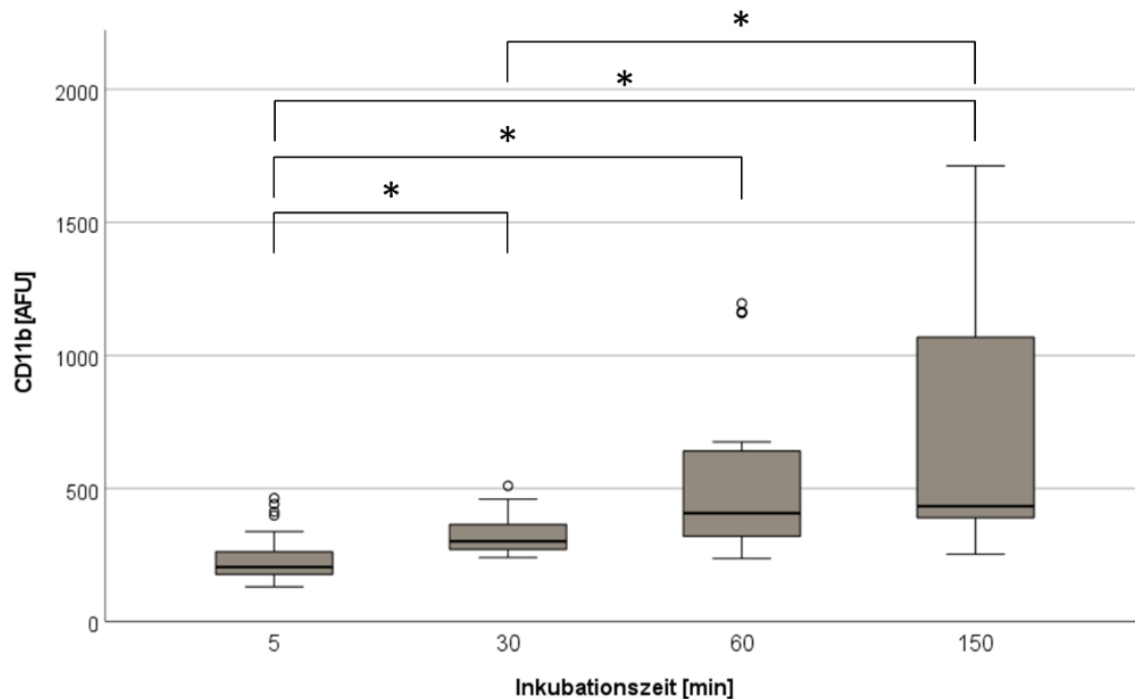


Abbildung 9: Fluoreszenzintensität von CD11b PE zu den verschiedenen Messzeitpunkten unabhängig von Inkubationsmedien und NGAL-Konzentrationen

4.3.3 Einfluss des Caspase-Inhibitors Q-VD-OPh

Isolierte Granulozyten wurden für 48 h in RPMI-1640 und 10 % autologem Serum, entweder mit oder ohne Q-VD-OPh, inkubiert. Die anschließende Analyse untersuchte den Einfluss dieses Caspase-Inhibitors auf die Zellen in Bezug auf den oxidativen Burst, spezifische Oberflächenmerkmale sowie auf das Zellüberleben.

4.3.3.1 Oxidativer Burst

Unabhängig von der Anwesenheit des Caspase-Inhibitors wurden die höchsten Fluoreszenzintensitäten von Rhodamin 123 zum ersten Messzeitpunkt festgestellt.

Zu Beginn (0 h) lag die mittlere Fluoreszenzintensität von Rhodamin 123 nach Stimulation der Granulozyten durch fMLP (0,1 μ M) und TNF- α (10 ng/mL) bei $17,2 \pm 15,7$ AFU (Q-VD-OPh) und $45,8 \pm 7,1$ AFU (Kontrolle, ohne Zugabe von Q-VD-OPh). Nach 48 h reduzierten sich die Mittelwerte auf $0,6 \pm 0,8$ AFU (Q-VD-OPh) und

10,7 ± 15,4 AFU (Kontrolle). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zum jeweiligen Zeitpunkt nachgewiesen.

Die Mittelwerte der Rhodamin 123-Intensitäten bei Stimulation mit PMA blieben in der Gruppe Q-VD-Oph über die Messzeitpunkte hinweg konstant, während es in der Kontrollgruppe zu einer Abnahme der Werte kam. Auch hier gab es zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Daten sind in Tabelle 12 aufgelistet.

	MW Rhodamin 123 [AFU] (fMLP+TNF-α)	SD	MW Rhodamin 123 [AFU] (PMA)	SD
0 h Ohne Q-VD-Oph	45,8	7,1	1241	29,7
0 h Mit Q-VD-Oph	17,2	15,7	1303	254
24 h Ohne Q-VD-Oph	8,9	6,1	649	383
24 h Mit Q-VD-Oph	3,4	1,1	1121	164
48 h Ohne Q-VD-Oph	10,7	15,4	359	208
48 h Mit Q-VD-Oph	0,6	0,8	1279	425

Tabelle 12: Mittelwerte und Standardabweichungen der Rhodamin 123-Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation in RPMI-1640

4.3.3.2 Oberflächenepitope

Nach 48 h Inkubation mit Q-VD-Oph war die Fluoreszenzintensität des Antikörpers gegen CD62L signifikant reduziert ($8,84 \pm 1,1$ AFU) im Vergleich zur Kontrolle ($14,5 \pm 1,3$ AFU, $p = 0,004$). Auch die Expression von CD11b und CD66b war bei Inkubation mit Q-VD-Oph vermindert, jedoch erreichten diese Veränderungen keine statistische Signifikanz (vgl. Tabelle 13)

	CD11b [AFU] MW	CD11b [AFU] SD	CD62L [AFU] MW	CD62L [AFU] SD	CD66b [AFU] MW	CD66b [AFU] SD
0 Stunden Ohne Q-VD-OPh	576	498	113	21,2	99,3	41,1
0 Stunden Mit Q-VD-OPh	481	291	80,2	38,2	99,2	25,3
24 Stunden ohne Q-VD-OPh	1339	873	16,2	5,4	268	141
24 Stunden mit Q-VD-OPh	725	457	8,49	2,3	171	66,0
48 Stunden ohne Q-VD-OPh	1478	996	14,5	1,3	370	210
48 Stunden mit Q-VD-OPh	859	312	8,84	1,1	200	63,1

Tabelle 13: Epitope CD11b, CD62L, CD66b im zeitlichen Verlauf bei Inkubation mit und ohne Q-VD-OPh

4.3.3.3 Annexin V-Test

Der Anteil vitaler Granulozyten, d.h. ohne Anfärbung durch PI und Annexin V, war bei Inkubation mit Q-VD-OPh nach 24 h höher (20,0 % bei Inkubation mit Q-VD-OPh, 11,1 % in der Kontrolle). Nach 48 h zeigten sich hingegen bei Inkubation ohne Caspase-Inhibitor mehr vitale Zellen (15,1 % bei Inkubation mit Q-VD-OPh, 33,9 % in

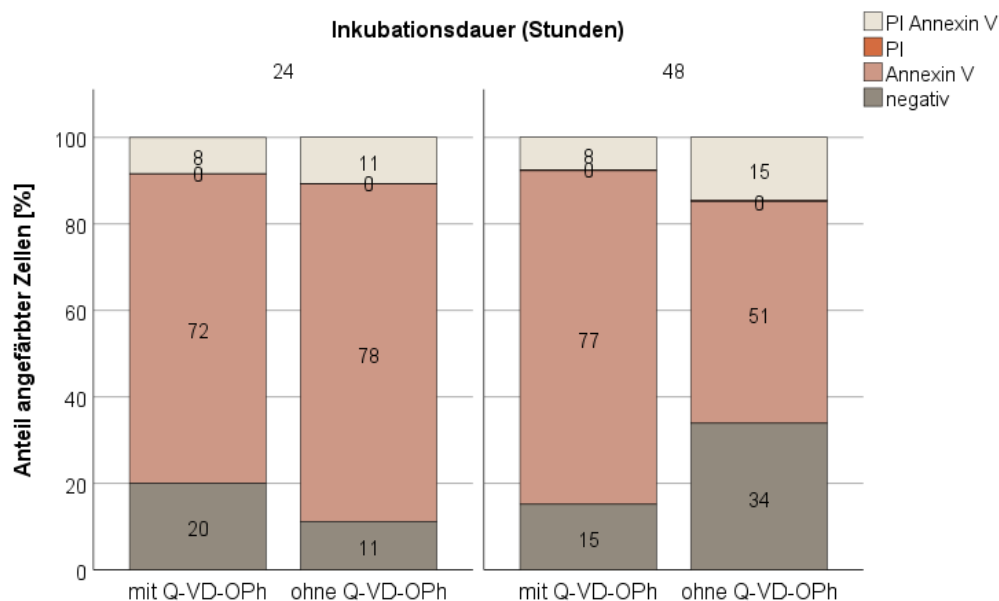


Abbildung 10: Anteile [%] der markierten Zellen bei Anfärbung mit PI und Annexin V

der Kontrolle). Gleichzeitig fiel in der Kontrollgruppe zu beiden Messzeitpunkten ein höherer Anteil spät-apoptotischer Zellen auf, d.h. mit Anfärbung durch PI und Annexin V. Insgesamt wurden zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede in den Anfärbungen zwischen den Granulozyten, welche mit respektive ohne Caspase-Inhibitor inkubierten, festgestellt (vgl. Abbildung 10).

4.3.4 Inkubation zur TAN-Differenzierung

In diesem Versuchsteil wurde analysiert, ob NGAL eine Differenzierung der Granulozyten in N1- oder N2-TANs auslösen kann. Dafür wurden die Spendergranulozyten 24 und 48 h mit NGAL, TGF- β oder IFN- β inkubiert und anschließend die Expression verschiedener Oberflächenepitope sowie der oxidative Burst quantifiziert.

4.3.4.1 Oxidativer Burst

Nach dem Ausschluss von Ausreißern/Extremwerten waren die Daten der Rhodamin 123-Fluoreszenz, aufgeteilt nach Inkubationsbedingung und Zeit, normalverteilt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Inkubationsbedingungen zum jeweiligen Zeitpunkt, weder bei Stimulation mit fMLP und TNF- α , noch bei Stimulation mit PMA.

Im zeitlichen Verlauf nahm die Anzahl der mit PI angefärbten, also apoptotischen, Granulozyten zu (siehe Abbildung 11). Die geringste Zunahme wurde bei der Inkubation mit NGAL beobachtet. Nach 24 h fielen signifikante Unterschiede im Anteil der PI-gefärbten Zellen bei Inkubation mit IFN- β gegenüber der Kontrolle auf ($p = 0,038$). Auch nach 48 h zeigte sich der höchste Anteil PI-gefärbter Zellen bei IFN- β mit einem signifikanten Unterschied gegenüber den Zellen, welche mit NGAL inkubierten ($p = 0,014$).

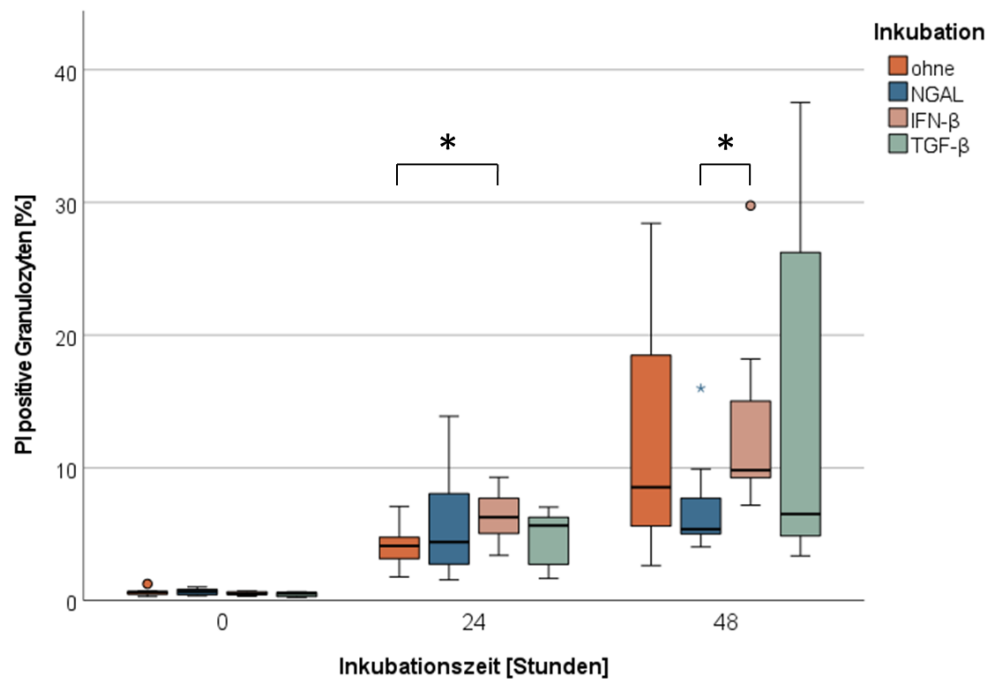


Abbildung 11: Anteil an PI-gefärbten Granulozyten je nach Inkubationsbedingung und Zeit.
 * bedeutet $p < 0,05$ im Kruskal-Wallis-Test

4.3.4.2 Oberflächenepitope

Es ergaben sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen Antikörper zwischen den verschiedenen Inkubationsbedingungen. Abbildung 12 veranschaulicht die relativen Veränderungen der Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zur Kontrolle für jeden Antikörper nach 48 h Inkubation.

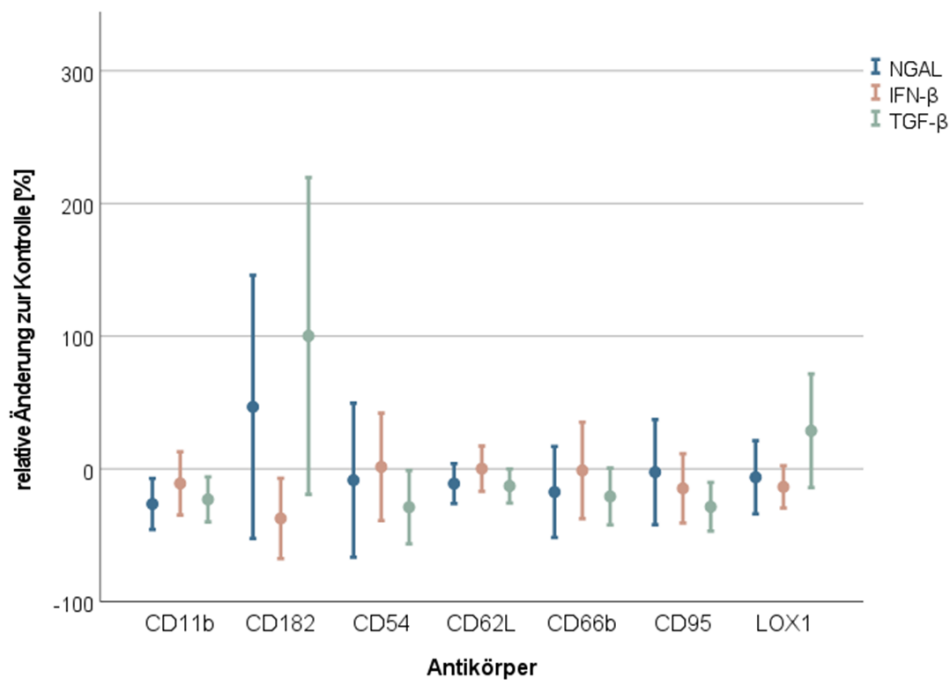


Abbildung 12: Relative Veränderungen der jeweiligen Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zur Kontrolle nach 48-stündiger Inkubation

4.3.5 Vergleich der verschiedenen Isolationsmethoden

Die Isolation der Versuchsteile I und II wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt, in Teil III und IV wurden die Granulozyten mit Gelafundin isoliert. Um zu untersuchen, welchen Einfluss dies auf die Granulozytenfunktionen hatte, wurde ein Vergleich der 5-Min- bzw. 0-h-Werte bei Inkubation in Zellkulturmedien ohne weitere Zusätze durchgeführt. Es zeigten sich signifikante Unterschiede bei der ROS-Produktion mit höheren Werten nach Zentrifugation. Bei Stimulation durch fMLP (0,1 μ M) und TNF- α (10 ng/mL) lagen die Mittelwerte nach Isolation durch Dichtegradientenzentrifugation bei 45,6 AFU und durch Gelafundin bei 21,4 AFU ($p = 0,018$). Auch bei Stimulation durch PMA (0,1 μ M) erwiesen sich die Mittelwerte signifikant höher (1394 AFU und 1111 AFU, $p = 0,025$).

Die CD62L-Expression der Granulozyten zeigte keine Unterschiede zwischen den Isolationen. CD11b war vermehrt exprimiert, wenn mittels Gelafundin isoliert wurde (MW Gelafundin 398 AFU, MW Lympho-/Leukospin 218 AFU, $p = 0,008$).

4.4 Live Cell Imaging

Mithilfe des Live Cell Imagings erfolgte eine Analyse der Granulozytenmigration durch die Kollagenmatrix, sowie der Zellfunktionen NETose, oxidativer Burst und MPO-Produktion. Die Daten werden im Folgenden, aufgeteilt nach den einzelnen Versuchsteilen, dargelegt.

4.4.1 Migrationsanalyse

4.4.1.1 NGAL versus fMLP als Chemoattraktantien

Als Positivkontrolle für die erste Versuchsreihe wurde fMLP gewählt. Vergleichend dazu wurde überprüft, ob auch NGAL einen Einfluss auf die Migrationseigenschaften der Granulozyten hat.

Die linken Reservoirs wurden in jedem Versuch mit RPMI-1640 mit 10 % autologem Serum als Kontrolle oder fMLP bzw. NGAL, jeweils gelöst in RPMI-1640 mit 10 % Serum, befüllt.

Die Granulozyten wurden über eine Dauer von 21 h aufgezeichnet. Die Daten beziehen sich auf 30-minütige Beobachtungsintervalle. Insgesamt wurden 68237 Tracks erfasst. 6135 Tracks (8,99 %) wiesen eine Track Duration von mehr als 900 Sekunden und eine Track Length über 25 μm auf. Pro Beobachtungszeitraum wurden die schnellsten 50 Zellen ausgewählt. 2279 Tracks, entsprechend 3,34 %, erfüllten alle drei Kriterien und wurden für die weitere Analyse berücksichtigt. Es wurde untersucht, ob die verschiedenen Bedingungen eine Veränderung in den Parametern Track Length, Track Displacement in X-Richtung, Track Straightness und Track Speed Mean bewirkten.

4.4.1.1.1 Track Length

Die Track Length gibt an, welche Strecke ein Granulozyt innerhalb eines Zeitraums von jeweils 30 min zurücklegt. Bei allen drei Versuchsbedingungen zeigte sich in den ersten drei Beobachtungsintervallen eine Zunahme der zurückgelegten Distanzen mit einer sukzessiven Abnahme im weiteren Verlauf (Abbildung 13). Die höchsten Werte der Track Length wurden mit dem Lockstoff fMLP gemessen. Der Median lag bei Betrachtung aller Beobachtungszeiträume bei der Bedingung „fMLP“ bei 436 μm und war

damit signifikant höher als bei RPMI-1640 (Median 236 μm , angepasstes $p < 0,001$) und NGAL (Median 342 μm , angepasstes $p < 0,001$) als Lockstoffen.

In den Zeiträumen von 900-930 min (15-15,5 h) und 1200-1230 min (20-20,5 h) war die Track Length der Granulozyten bei NGAL signifikant höher als bei RPMI-1640 und fMLP ($p < 0,001$).

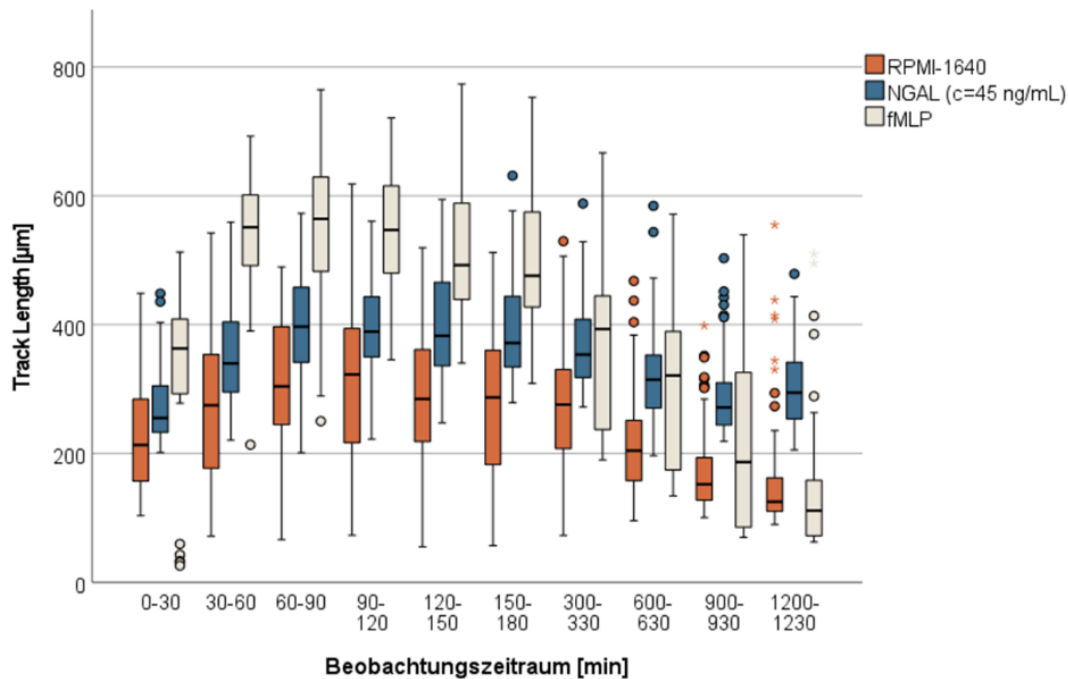


Abbildung 13: Werte der Track Length aufgeteilt über die Beobachtungszeiträume und Bedingungen

4.4.1.1.2 Track Displacement X

Die Track Displacement X beschreibt die geodätische Distanz der Start- und Endpunkte der Granulozyten innerhalb eines Beobachtungszeitraums. Positive Werte geben dabei eine Migrationsrichtung in Richtung des linken Reservoirs an. Ähnlich wie bei der Track Length kam es in den ersten beiden Beobachtungsintervallen zu einer Zunahme der Track Displacement X, gefolgt von einem anschließenden Rückgang (Abbildung 14). Es konnten bei Vergleich der Werte aller Beobachtungszeiträume signifikante Unterschiede zwischen den Bedingungen nachgewiesen werden, wobei Granulozyten bei fMLP die größten Distanzen in X-Richtung aufwiesen. Die Mediane der Track Displacement X betrugen bei fMLP 101 μm , bei NGAL 45,1 μm und bei RPMI-1640 16,5 μm .

In den ersten drei Stunden ergaben sich signifikante Unterschiede der TDx der PMNs zwischen den Lockstoffen fMLP und NGAL sowie zwischen fMLP und RPMI-1640. Im weiteren Verlauf glichen sich die Distanzen in X-Richtung jedoch an, sodass keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den Bedingungen mehr festgestellt wurden. Mit Ausnahme der Zeiträume von 0-30 min und 90-120 min unterschieden sich die TDx-Werte der Granulozyten bei den Bedingungen NGAL und RPMI-1640 nicht signifikant.

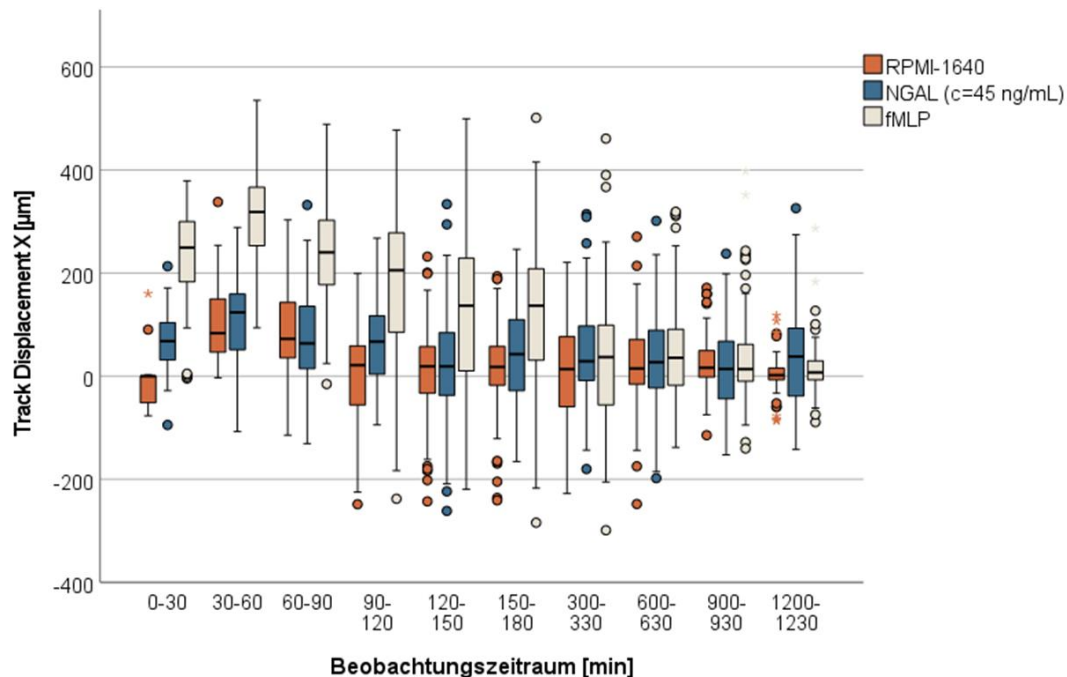


Abbildung 14: TDx-Werte [μm] in Abhängigkeit der Bedingung und des Zeitraums

4.4.1.1.3 Track Straightness

Die Track Straightness beschreibt den Quotienten aus der Track Displacement Length durch die Track Length und wird ohne Einheit angegeben. Eine Track Straightness von 1 bedeutet, dass sich die Zelle auf einer Geraden bewegt. Die zusammengefassten Werte der Track Straightness aller Zeiträume zeigten sich unter dem Einfluss von fMLP (Median 0,445) signifikant höher als bei den anderen Lockstoffen (p jeweils $< 0,001$). Die Mediane in den Bedingungen RPMI-1640 (0,353) und NGAL (0,336) unterscheiden sich hingegen nicht signifikant voneinander ($p = 0,677$).

Der höchste Wert der Track Straightness wurde bei den Granulozyten mit fMLP im ersten Beobachtungszeitraum (0,738) gemessen. Danach zeigten sich die Werte rückläufig. Im Gegensatz dazu blieb die Track Straightness bei NGAL über die Beobachtungszeit konstant, mit Werten zwischen 0,299 und 0,415. Mit Ausnahme der ersten 30 min wiesen die Granulozyten unter NGAL zu jedem Zeitpunkt die niedrigsten Werte auf. Insgesamt näherten sich die Werte der Track Straightness zwischen den verschiedenen Bedingungen an, sodass ab Minute 150 der Beobachtung keine signifikanten Unterschiede mehr festgestellt wurden (Abbildung 15).

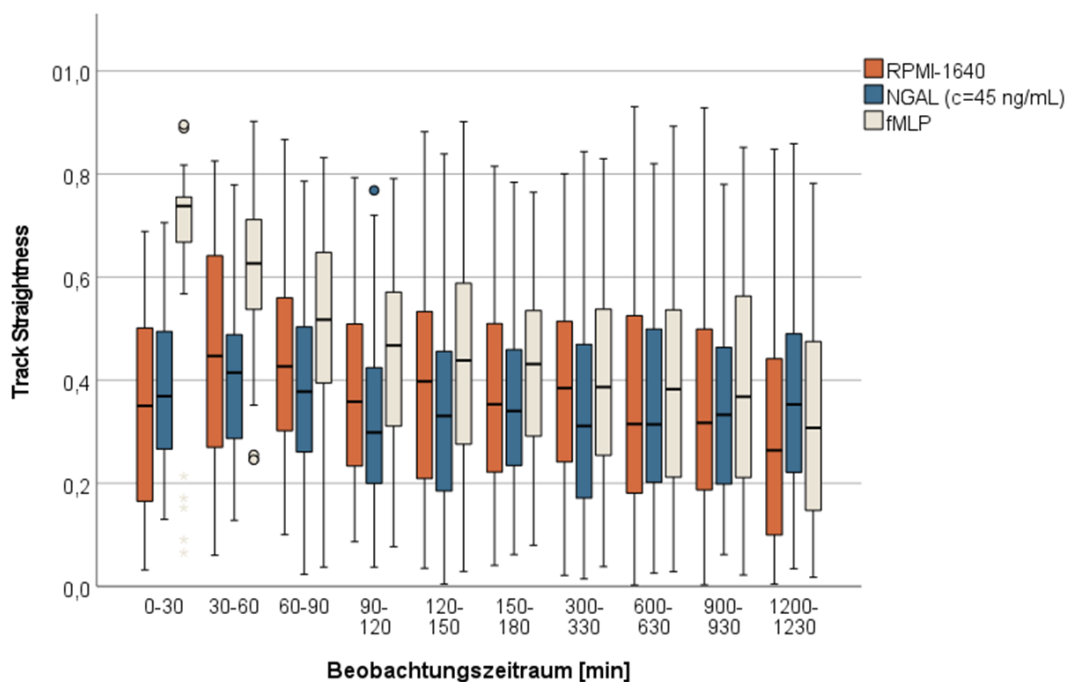


Abbildung 15: Track Straightness bei verschiedenen Bedingungen über die Beobachtungsintervalle

4.4.1.1.4 Track Speed Mean

Als letzter Parameter in der Migrationsanalyse wurde die Track Speed Mean, also die mittlere Geschwindigkeit der Granulozyten betrachtet. Diese wird mit der Einheit [$\mu\text{m/s}$] angegeben.

In den ersten drei Stunden der Beobachtung waren die Geschwindigkeiten der Granulozyten bei dem Lockstoff fMLP in jedem Beobachtungsintervall am höchsten, mit signifikantem Unterschied zu den Lockstoffen NGAL und RPMI-1640 (p jeweils $< 0,010$). In den Bedingungen RPMI-1640 und NGAL konnten in den ersten fünf Beobachtungszeiträumen keine signifikanten Unterschiede in der Track Speed Mean der PMNs festgestellt werden (vgl. Abbildung 16).

Die durchschnittliche Geschwindigkeit war bei den Lockstoffen RPMI-1640 und fMLP, im Gegensatz zu NGAL, ab der zehnten Stunde stark rückläufig. Damit ergaben sich höhere Geschwindigkeiten bei der Bedingung NGAL mit signifikanten Unterschieden zu den anderen Lockstoffen in den Zeiträumen 600-630 min, 900-930 min und 1200-1230 min (p jeweils $< 0,001$).

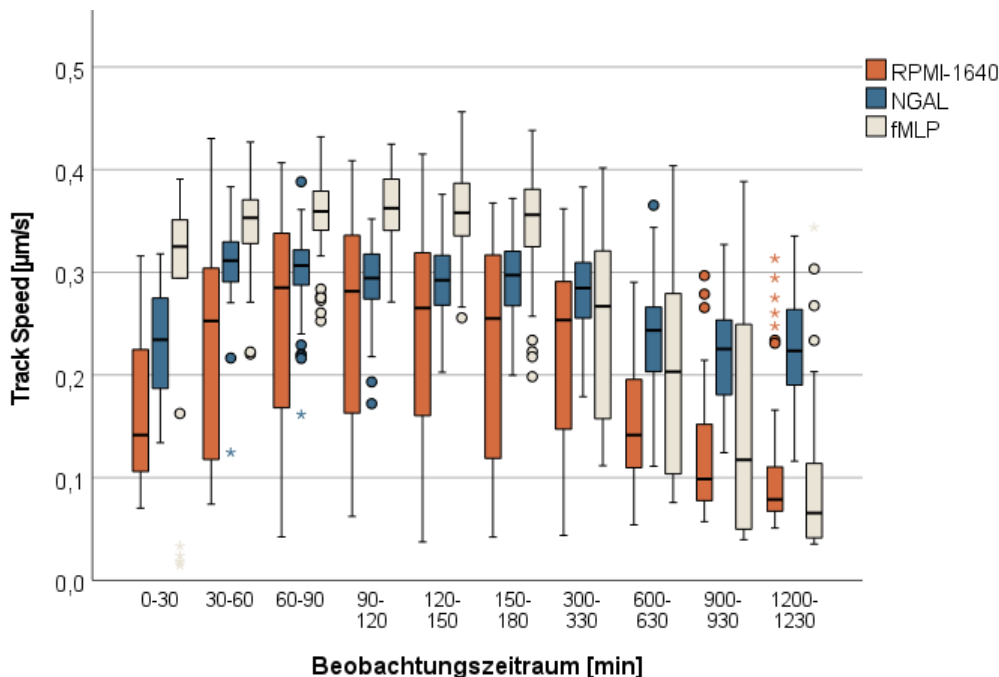


Abbildung 16: Track Speed Mean [$\mu\text{m/s}$] je nach Beobachtungszeitraum und Bedingung

4.4.1.2 Ergebnisse des Vergleichs NGAL und Tumorzellüberstände

Im folgenden Abschnitt werden die Effekte der Tumorzellüberstände, NGAL und der Kulturmedien als Kontrolle auf Granulozyten verglichen. In das jeweils linke Reservoir der Slides wurde entweder NGAL in einer Konzentration von 45 ng/mL, RPMI-1640/DMEM mit Zusätzen als Zellkulturmedien oder die Tumorzellüberstände von BxPC3 bzw. MDA-MB-231 eingebracht.

Alle Parameter wurden gemäß den in Abschnitt 3.9.2 beschriebenen Einschlusskriterien analysiert. Damit reduzierte sich die Trackzahl von insgesamt 115.330 auf 4965 Tracks, entsprechend 4,31 %, welche in die Berechnungen einbezogen wurden.

4.4.1.2.1 Track Length

Die Mediane der Track Lengths der Granulozyten lagen über die gesamte Dauer der Beobachtung bei NGAL im Median bei 327 μm und damit signifikant niedriger als bei

den Kulturmedien RPMI-1640 (332 μm , $p = 0,007$) und DMEM (339 μm , $p < 0,001$), sowie dem Überstand der BxPC3-Zellen (336 μm , $p = 0,001$). Die mediane Track Length bei Einbringen des Überstands der MDA-MB-231-Zellen war auch länger (338 μm), jedoch ohne signifikanten Unterschied gegenüber den Werten bei NGAL ($p = 0,156$).

Die zurückgelegten Strecken bei der Bedingung NGAL waren in den Zeiträumen von 90-120, 120-150 und 150-180 min höher als in den anderen Bedingungen, die Unterschiede erwiesen sich nicht als signifikant. Es war eine starke Abnahme der Track Lengths der PMNs bei NGAL in den letzten zwei Zeiträumen zu beobachten. In Minute 600 bis 630 gab es signifikant höhere Werte in allen anderen Bedingungen im Vergleich zu NGAL (vgl. Abbildung 17).

Es kam zu keinem Zeitpunkt zu signifikanten Unterschieden in den Track Lengths der Granulozyten bei Vergleich der Tumorzellüberstände. Im Vergleich der Kulturmedien untereinander fielen auch keine Unterschiede auf, mit Ausnahme des letzten Zeitraums (600-630 min). Dabei zeigten sich die zurückgelegten Strecken der Granulozyten bei RPMI-1640 signifikant kürzer als bei DMEM ($p = 0,015$).

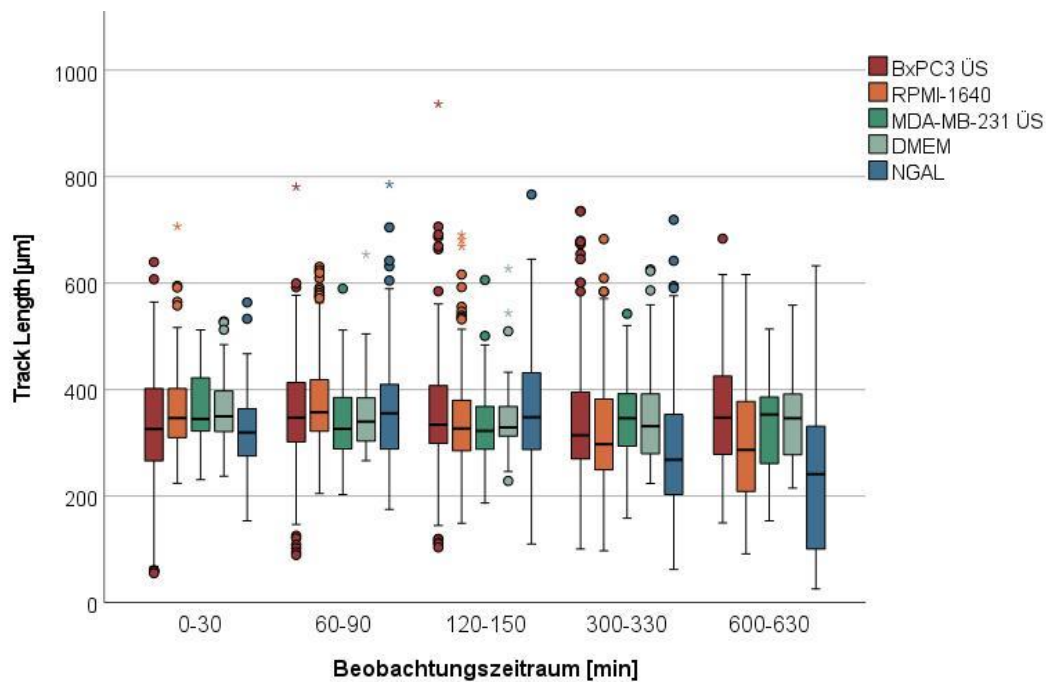


Abbildung 17: Track Lengths [µm] aufgeteilt nach Lockstoffen und Beobachtungszeiträumen

4.4.1.2.2 Track Displacement X

Die höchsten Werte der in X-Richtung zurückgelegten Strecken der Granulozyten wurden im ersten Beobachtungszeitraum gemessen (vgl. Abbildung 18). Danach zeigte sich eine Abnahme der Werte in allen Bedingungen. Im ersten Beobachtungszeitraum waren die TDx-Werte der Granulozyten bei den Lockstoffen DMEM (256 µm) und den Überständen der MDA-MB-231-Zellen (260 µm) signifikant höher als bei NGAL (151 µm), den BxPC3-Zellüberständen (206 µm) und RPMI-1640 (206 µm). Mit Ausnahme des ersten Zeitraums zeigten sich die Mediane bei den Tumorzellüberständen jeweils höher als bei den dazugehörigen Zellkulturmedien. Diese Unterschiede waren nicht signifikant. Die TDx-Werte der Granulozyten bei NGAL waren im Median über alle Zeiträume hinweg am niedrigsten (1,26 µm). Der Kruskal-Wallis-Test ergab dabei signifikante Unterschiede zu den medianen TDx-Werten der gesamten Beobachtungszeit bei DMEM (21,4 µm), BxPC3-Überstand (25,1 µm) und MDA-MB-231-Überstand (31,1 µm).

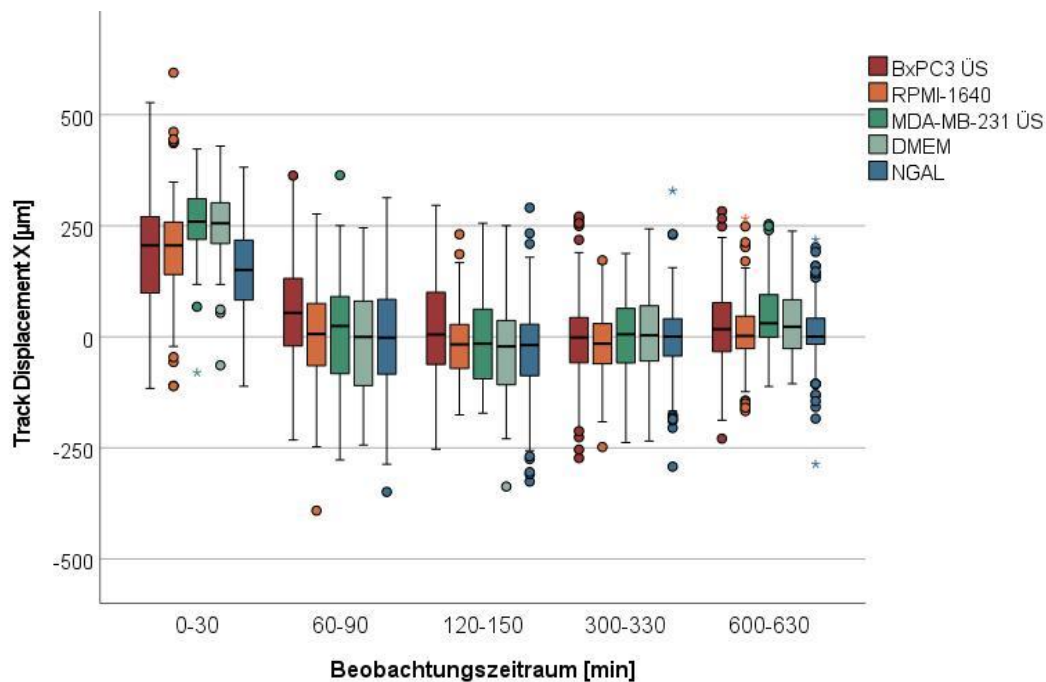


Abbildung 18: TDx-Werte [µm] in Abhängigkeit des Beobachtungszeitraums und des Lockstoffes

4.4.1.2.3 Track Straightness

Im Verlauf der Beobachtung zeigte sich eine Abnahme der Track Straightness bei allen Bedingungen im Vergleich zu den Werten des ersten Intervalls (vgl. Abbildung 19). In den ersten dreißig Minuten der Beobachtung lagen die Mediane zwischen 0,64 (BxPC3-Zellüberstand) und 0,79 (MDA-MB-231-Zellüberstand). Die Werte der Track Straightness bei BxPC3-Überstand und RPMI-1640 zeigten die geringste Abnahme im zeitlichen Verlauf. Es gab zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede der Track Straightness bei Betrachtung Granulozyten in den Zellkulturüberständen zu dem dazugehörigen Medium. Lediglich im Zeitraum von 600-630 min erwies sich die Track Straightness bei BxPC3-Überstand als signifikant höher im Vergleich zu RPMI-1640.

Die Track Straightness der Granulozyten bei dem Lockstoff NGAL blieb in den ersten 150 min konstant über 0,50, zeigte jedoch dann ebenfalls eine starke Abnahme mit einem Wert von 0,262 im Zeitraum von 600 bis 630 min.

Bei Betrachtung aller Intervalle betrug der Median der Track Straightness bei dem Lockstoff BxPC3-Überstand 0,57, bei dem zugehörigen Kulturmedium RPMI-1640 betrug der Median 0,52. Die niedrigsten Werte wurden bei den Bedingungen MDA-MB-231-Überstand (0,39) und DMEM (0,40) gemessen. Damit unterschieden sich die medianen Werte der Track Straightness nicht zwischen den Bedingungen Tumorzellüberstand zum jeweiligen Medium. Der Median der Track Straightness-Werte bei NGAL war über die gesamte Beobachtungsdauer bei 0,49. Die Bedingung NGAL unterschied sich mit Ausnahme von RPMI-1640 signifikant von allen Gruppen bei Betrachtung der Werte über die gesamte Dauer.

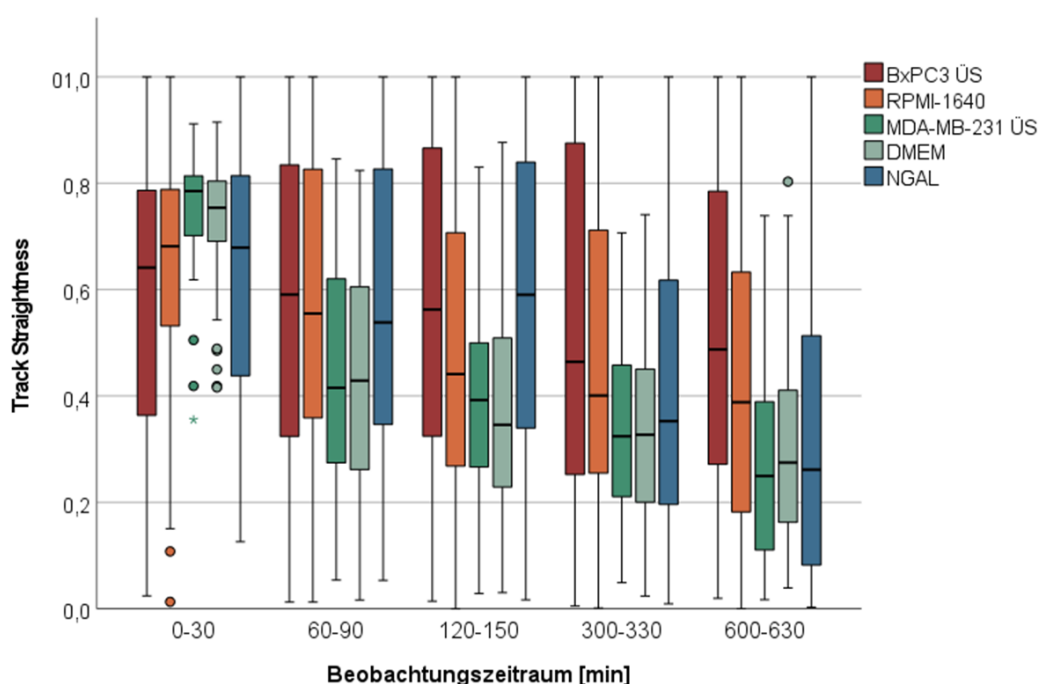


Abbildung 19: Track Straightness im zeitlichen Verlauf, aufgeteilt nach den Lockstoffen

4.4.1.2.4 Track Speed Mean

Es zeigte sich eine sukzessive Abnahme der Durchschnittsgeschwindigkeit der Granulozyten im zeitlichen Verlauf (vgl. Abbildung 20).

Die durchschnittliche Geschwindigkeit der Granulozyten war mit DMEM als Lockstoff am höchsten. Über die gesamte Beobachtungsdauer hinweg lag der Median in dieser Bedingung bei 0,28 $\mu\text{m/s}$ und damit signifikant höher als in den anderen Gruppen (p jeweils $< 0,001$). Der niedrigste mediane Wert der durchschnittlichen Geschwindigkeit wurde bei der Bedingung NGAL festgestellt (0,25 $\mu\text{m/s}$).

Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede zu allen anderen Bedingungen (p jeweils $< 0,001$). Unterschieden sich die Durchschnittsgeschwindigkeiten im ersten Zeitraum

nur signifikant zwischen den Bedingungen NGAL und DMEM, so zeigten sich in den Zeiträumen 300-330 und 600-630 min signifikante Unterschiede zwischen NGAL zu allen übrigen Gruppen.

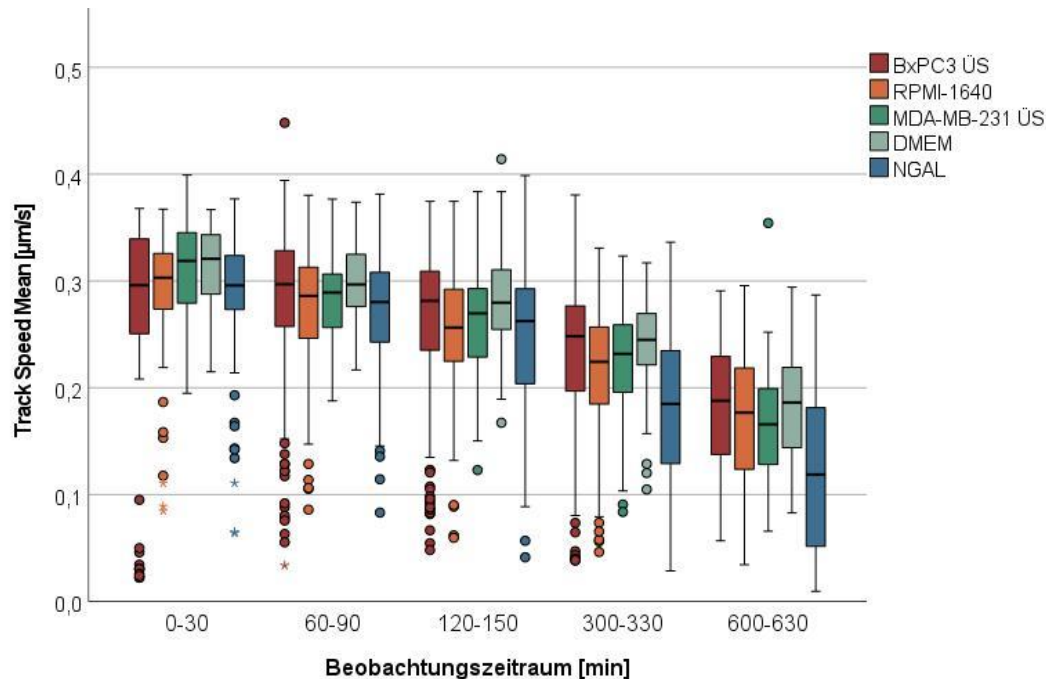


Abbildung 20: Mittlere Track Speed [µm/s] der Granulozyten in den Beobachtungszeiträumen [min], aufgeteilt nach den Lockstoffen

4.4.2 Vergleich der verschiedenen Isolationsmethoden

Für die zwei Versuchsteile wurden verschiedene Granulozytenisolationen gewählt. Im ersten Teil (Vergleich zwischen NGAL und fMLP) wurden die Granulozyten mittels Sedimentation ohne weitere Zugabe isoliert. Für den Vergleich zwischen NGAL und den Tumorzellüberständen wurde die Ficoll-Isolation verwendet. Um die Auswirkungen der verschiedenen Isolationen zu untersuchen, wurde jeweils der Zeitraum von 60 bis 150 min nach Start der Beobachtung im Mikroskop verglichen und nur die Kanäle mit der Bedingung „NGAL“ eingeschlossen. Es galten die Kriterien zum Einschluss der Tracks wie unter 3.9.2 beschrieben. Durch diese Auswahl erhielt man eine Anzahl von 230 Tracks für die Isolation mittels Sedimentation und 522 für die Isolation mittels Ficoll. Bei nicht-normalverteilten Daten wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Es ergaben sich signifikante Unterschiede bei Betrachtung der Track Speed Mean, der Track Displacement X, Track Length und Track Straightness ($p < 0,001$). Die Mediane und IQR zur jeweiligen Isolation können der folgenden Tabelle 14 entnommen werden.

Isolations- methode	n	Track Speed mean [µm/s]	Track Displacement X [µm]	Track Straightness	Track Length [µm]
Sedimen- tation	230	0,297 (± 0,046)	50,8 (± 121)	0,331 (± 0,250)	386 (± 114)
Ficoll	522	0,271 (± 0,081)	-11,7 (± 132)	0,572 (± 0,491)	353 (± 103)

Tabelle 14: Mediane sowie Interquartilsabstände (in Klammern) der jeweiligen Parameter

4.4.3 Analyse der MPO-Produktion, NETose und des oxidativen Bursts

Die Auswertung der Immuneffekte konnte nicht wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt werden. Insgesamt wurden Granulozyten aus 25 Kanälen zum Zeitpunkt 1750, entsprechend etwa 14,5 h nach Beginn der Beobachtung, analysiert. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich im Analysebereich der Kanäle zwischen 35 und 462 Granulozyten, im Mittel 162 Zellen. Nur 0,91 % der Zellen waren durch DAPI markiert und abgesehen von Zellen in einem Kanal konnte keine MPO-Färbung nachweisgewiesen werden (vgl. Tabelle 15). Auch die Auswertung der Rhodamin 123-Fluoreszenzen zur Ermittlung der $T_{\max ROS}$ war nicht durchführbar. Obwohl eine geringe ROS-Produktion in den Granulozyten festgestellt werden konnte, war diese nicht ausreichend, um den notwendigen Kontrast für die Analyse mittels Imaris zu erzeugen. Durch den fehlenden Kontrast war es zum Teil nicht möglich, eine angefärbte Zelle zu erkennen, in anderen Fällen zeigten sich alle Zellen leicht angefärbt.

Farb- stoff	angefärbte Zellen [%] (Median)	angefärbte Zellen [%] (Minimum)	angefärbte Zellen [%] (Maximum)
DHR	27,8	0,00	100
DAPI	0,91	0,00	22,9
MPO	0,00	0,00	6,49

Tabelle 15: Anteil angefärbter Zellen zum Zeitpunkt 1750, entsprechend 14,5 h nach Beginn der Beobachtung, im Live Cell Imaging

5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung des Proteins NGAL unter in vitro-Bedingungen auf Granulozyten zu testen. Hierfür wurden Oberflächenepitope, die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und das Migrationsverhalten untersucht. Weiterhin wurde getestet, ob verschiedene Inkubationszeiten einen Einfluss auf diese Funktionen haben.

5.1 Auswahl und Eigenschaften der Tumorzelllinien

Die Tumorzelllinien BxPC3 und MDA-MB-231 sind seit Jahrzehnten für eine Vielzahl wissenschaftlicher Fragestellungen etabliert (55–58). Sie zeichneten sich durch ein konstantes Zellwachstum aus, wobei die 80-90-prozentige Konfluenz stets nach sechs bis sieben Tagen erreicht wurde. Es konnte daher angenommen werden, dass auch bei Kultivierung in den Wells zur Abnahme der Überstände konstante Zellzahlen vorliegen würden.

Die spontane NGAL-Produktion der Tumorzellen, d.h. ohne Notwendigkeit einer zusätzlichen Stimulation, wurde durch ELISA-Konzentrationsbestimmungen bestätigt. Die Überstände beider Zelllinien zeigten dabei ähnliche NGAL-Konzentrationen, die über mehrere Versuchsreihen hinweg keine signifikanten Schwankungen aufwiesen. Die NGAL-Konzentrationen in den Überständen lagen mit 24,9 bzw. 26,7 ng/mL jedoch deutlich unter den von Gomez-Chou et al. (53) berichteten Serum-NGAL-Werten von gesunden Probandinnen und Probanden. In einer in vitro-Studie von Schroll et al. (45) zur Untersuchung des NGAL-Einflusses auf Granulozyten wurden Konzentrationen zwischen 0,5 und 50 nM verwendet. Bereits ab einer NGAL-Konzentration von 0,5 nM (entspricht etwa 12,5 ng/mL) zeigten sich Veränderungen im Migrationsverhalten der PMNs. Für diese Arbeit wurden die NGAL-Konzentrationen in den Versuchen so gewählt, dass sie mit den Konzentrationen der Zellüberstände vergleichbar sind. Diese lagen im Bereich des Medians $\pm$ einer Standardabweichung der Ergebnisse der ELISA-Messungen.

5.2 Isolationsmethoden

Da es nicht möglich ist, Granulozyten ex vivo zu kultivieren, müssen diese für die Versuche aus Vollblut isoliert werden. Verschiedene Methoden stehen dafür zur Verfügung, wobei jede jeweils spezifische Vor- und Nachteile aufweist.

Für die Versuche wurden insgesamt vier unterschiedliche Methoden eingesetzt, deren Auswirkungen auf die PMN-Funktionen im Folgenden dargelegt werden. Um mögliche Verzerrungen der Ergebnisse durch die unterschiedlichen Isolationsmethoden zu minimieren, wurden die Daten der jeweiligen Versuchsteile separat ausgewertet, sodass die Ergebnisse nur in Abhängigkeit der jeweiligen Bedingungen betrachtet werden konnten.

Für die ersten beiden Teile der Durchflusszytometrie kam die Isolation mittels Lympho-/Leukospin (siehe 3.5.1) zum Einsatz. Diese Methode ermöglicht nicht nur die Trennung der Erythrozyten von den Leukozyten, sondern erlaubt auch eine Aufteilung der Leukozytenpopulationen. Dadurch wird eine präzisere Auswahl der Granulozyten erzielt. Allerdings führt die Zentrifugation, die bei dieser Methode angewendet wird, zu Veränderungen der Zelleigenschaften. Hundhammer et al. (56) berichteten von einer abnehmenden Expression von CD11b bei steigender Zentrifugationskraft. Diese Beobachtung konnte auch in den hier durchgeführten Experimenten bestätigt werden. Während die Datenlage zur ROS-Produktion in Abhängigkeit der Isolationsmethode uneinheitlich ist (59, 60), zeigten die vorliegenden Daten der Durchflusszytometrie signifikant höhere Rhodamin 123-Fluoreszenzen bei zentrifugierten Granulozyten. Diese Beobachtung konnte sowohl unter Stimulation durch PMA, als auch unter fMLP + TNF- α gemacht werden.

Für die Isolation der Granulozyten für das Live Cell Imaging wurde keine Zentrifugation verwendet, da diese einen negativen Einfluss auf die Migrationsfähigkeit von Granulozyten gezeigt hat (59). Daher wurde auf die Isolationen durch Sedimentation und mittels Ficoll zurückgegriffen. In den durchgeführten Versuchen fielen signifikante Unterschiede in allen analysierten Migrationsparametern bei Vergleich der Isolationsmethoden auf. Dabei erwiesen sich die Granulozyten, welche in Ficoll isoliert wurden, als verlangsamt und zeigten eine verringerte Bewegung in X-Richtung.

Die Wahl der Isolationsmethode spielt insbesondere bei der Untersuchung tumorassoziiert Granulozyten eine Rolle. N2-Granulozyten weisen eine geringere Dichte auf

und sind deshalb bei Dichtegradientenisolationen häufiger nicht in der Granulozytenfraktion vorhanden (60, 61). Da der Anteil dieser sogenannten Low-Density Granulozyten bei gesunden Individuen mit etwa 5 % sehr gering ist, spielte dieser Faktor in der vorliegenden Arbeit eine untergeordnete Rolle (62).

Abschließend bleibt festzuhalten, dass die unterschiedlichen Isolationsmethoden erhebliche Auswirkungen auf die Eigenschaften und Funktionen der Granulozyten haben, weshalb die genaue Auswahl an den jeweiligen Versuchsbedingungen angepasst werden sollte.

5.3 Einfluss von Inkubationszeit und Stimulus

Mithilfe der Durchflusszytometrie war es möglich, die Beeinflussung der Granulozyten durch äußere Stimuli in Abhängigkeit der Zeit auf Einzelzellebene zu untersuchen.

Es war auffällig, dass die ROS-Produktion der Granulozyten in dem Kulturmedium DMEM signifikant höher war als in RPMI-140. In einer früheren Studie fielen erhöhte Konzentrationen von H₂O₂ sowie eine verstärkte Rhodamin 123-Fluoreszenz in zellfreiem DMEM im Vergleich zu RPMI-1640 auf. Eine mögliche Erklärung könnten die erhöhten Konzentrationen von Redox-Komponenten wie Riboflavin in DMEM sein (63).

Für die Versuche I und II wurde eine maximale Inkubationsdauer von 150 min in Anlehnung an die Studie von Schroll et al. (45) gewählt. Im ersten Teil wurden Granulozyten in Tumorzellüberständen inkubiert, welche eine Vielzahl verschiedenster Stimuli beinhalten. Dabei zeigte sich die stärkste Beeinflussung der Granulozyten bereits zu Beginn der Inkubation. Nach 5 min ergaben sich signifikante Unterschiede bei Betrachtung CD11b- und CD51-Expression im Vergleich zur Inkubation in Zellkulturmedien. Auch im Burst zeigte sich die höchste ROS-Produktion nach 5 min, diese war jedoch nicht signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle. Im Verlauf glichen sich die Rhodamin 123-Werte zwischen den Überständen und der Kontrolle zunehmend aneinander an.

Im Gegensatz dazu konnte bei der gezielteren Beeinflussung der Granulozyten durch einzelne Proteine, in den vorliegenden Versuchen NGAL, TGF- β und IFN- β , erst im Verlauf von 24 bzw. 48 h Unterschiede gesehen werden. So war beispielsweise die Expression von CD11b zu Beginn der Inkubation mit NGAL im Mittel nur um 4,79 %

höher und damit sehr ähnlich zur Kontrolle. Nach 48 h Inkubationszeit betrug die Differenz 31,0 % und war damit bei NGAL deutlich erniedrigt. Bei TGF- β und IFN- β war ebenso ein längerer Zeitraum notwendig, um Veränderungen zu sehen. Diese Beobachtung wird mit einer Studie von Ohms et al. (28) unterstrichen, in der sich auch erst im Verlauf von 48 h eine Differenzierung der Granulozyten in den N1- und N2-Phänotypen zeigte.

Um jedoch eine Inkubation über einen Verlauf von bis zu 48 h durchzuführen, musste zunächst analysiert werden, dass nach dieser Zeit noch ein ausreichend hoher Anteil vitaler Zellen vorliegt. Aus anderen Studien ist bekannt, dass ein Überleben von Granulozyten in vitro auch über längere Zeiträume möglich ist (64). Für die Testung wurden Annexin V und Propidiumiodid verwendet, durch welche eine Unterscheidung in früh-apoptotisch und spät-apoptotisch/nekrotisch möglich ist.

Der Anteil spät-apoptotischer Zellen lag nach 48 h Inkubationsdauer in der Kontrolle (RPMI-1640) bei 14,6 %. Dem Kulturmedium RPMI-1640 wurde 10 % autologes Serum anstelle von FKS zugesetzt, da damit ein verbessertes Überleben der Granulozyten assoziiert ist (65). Um die Rate apoptotischer Zellen zusätzlich zu verringern, wurde auf den Caspase-Inhibitor Q-VD-OPh zurückgegriffen (28). Darunter war der Anteil apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen nach 24 und 48 h Inkubationszeit zwar geringer als in der Kontrolle, gleichzeitig zeigten sich auch deutlich niedrigere Fluoreszenzintensitäten der Antikörper gegen die Epitope CD11b, CD62L und CD66b sowie von Rhodamin 123. Um eine Datenverzerrung zu vermeiden, wurde daher in den folgenden Versuchen keine weitere Behandlung der Zellen mit Q-VD-OPh durchgeführt.

5.4 Bewertung des Live Cell Imaging Systems

Mithilfe des Live-Cell-Imagings wurden die Granulozytenfunktionen Migration, ROS-Produktion, MPO-Freisetzung und NETose über einen Zeitraum von mindestens zehn Stunden beobachtet. Diese Methode, unter Verwendung der Software LAS X, ermöglichte eine kontinuierliche und detaillierte Verfolgung der Zellen in 30 Sekunden-Intervallen.

Um sicherzustellen, dass nur aktive und bewegliche Zellen für die Analyse berücksichtigt werden, wurden die Granulozyten in das rechte Reservoir eingefüllt. Es musste

also die Fähigkeit zur Eigenbewegung vorliegen, damit die Zellen in den Kanal eindringen. Ergänzend dazu wurde die Selektion der Zellen durch Voreinstellungen in der Imaris-Software optimiert. Es wurden ausschließlich Zellen mit einem Durchmesser von mindestens 13 μm zur Analyse herangezogen, was die Verlässlichkeit der korrekten Auswahl der Granulozyten erhöhte. Weiterhin wurden Migrationsstrecken von über 40 μm pro 30 Sekunden ausgeschlossen, da das über der für PMN üblichen Geschwindigkeit liegt und beispielsweise für eine Gelauflockerung sprechen könnte.

Durch das Kriterium $\text{Track Duration} \geq 900 \text{ s}$ wurden die Zellen ausgeschlossen, welche zum Beispiel durch Bewegung in tiefere Gelschichten nicht zuverlässig nachverfolgt werden konnten. Zellen, die sich kaum oder gar nicht bewegten, wurden durch das Kriterium $\text{Track Length} \leq 25 \mu\text{m}$ aus der Analyse entfernt. Diese Filtermechanismen verbesserten die Genauigkeit und Robustheit der Datenauswertung.

Während der Auswertung traten technische Herausforderungen in der Imaris-Software auf. Beispielsweise wurden Migrationsstrecken teilweise nicht als durchgehende Tracks erkannt, wenn Granulozyten kurzzeitig in tiefere Bereiche der Gelmatrix eindringen und dadurch unscharf wurden. Dies erforderte eine präzise Einstellung des Mikroskops sowie manuelle Nachbearbeitungen der Tracks, um die Ausschlusskriterien korrekt anzupassen.

Die gemessenen Durchschnittsgeschwindigkeiten der Granulozyten waren mit Daten aus anderen Studien vergleichbar (66), was die Eignung der verwendeten Gelmatrix zur Überprüfung der Migrationseigenschaften bestätigte. Im Gegensatz zu früheren Daten aus der Arbeitsgruppe stellten sich die gemessenen Track Lengths in dieser Arbeit höher dar (67). Ein wichtiger Unterschied zu den damaligen Versuchen bestand in der Durchführung der Zentrifugation zur Isolation der Granulozyten, welche nachweislich deren Migrationsfähigkeiten einschränkt (59). Nach der Dichtegradientenzentrifugation hatte man in früheren Arbeiten eine maximale ROS-Produktion nach etwa 140 min beobachtet, die ET_{50} der NETose und MPO-Freisetzung wurden etwa 240 min nach Beginn der Messung erreicht (67). In den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen ohne Zentrifugation konnte mit Ausnahme eines Kanals keine MPO-Freisetzung nachgewiesen werden. Die ROS-Produktion zeigte kein Maximum, vielmehr konnte über die ganze Beobachtungsdauer hinweg in allen Granulozyten eine geringe Aktivität nachgewiesen werden. Diese schien jedoch nicht auszureichen, um regelhaft eine NETose zu induzieren (14). Die Anzahl an DAPI-markierten DNA-Strängen war auch

nach einer Beobachtungsdauer von über 12 h zu gering, um eine sinnvolle Berechnung der ET_{50} zu ermöglichen. Das deckt sich mit den Beobachtungen aus anderen Publikationen, bei denen auf eine Zentrifugation verzichtet wurde (68). In Zusammenschau mit den Daten der Durchflusszytometrie, welche nur eine geringe Anzahl toter Zellen nach 24 h ergeben haben, ist davon auszugehen, dass die Beobachtungszeiträume von nicht-zentrifugierten Granulozyten verlängert werden sollten.

5.5 Effekte von NGAL und Tumorzellüberständen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des Proteins NGAL auf Granulozyten *in vitro* analysiert. Die Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten im Kontext bestehender Literatur diskutiert.

NGAL, als Siderophoren-bindendes Protein, hat die Fähigkeit, freies Eisen in Körperzellen aufzunehmen, welches unter anderem für die ROS-Produktion in Granulozyten benötigt wird (4, 43). Bei Eisenmangel kann die Fähigkeit zum oxidativen Burst eingeschränkt sein (44). In den vorliegenden Versuchen zeigte sich jedoch kein Einfluss von NGAL auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies.

Ziel der Analyse der Oberflächenepitope war es, zu klären, ob NGAL die Aktivierung der Granulozyten beeinflusst und eine Polarisierung der Granulozyten in Richtung des N1- (tumorhemmend) oder N2-Phänotyps (tumorfördernd) bewirken kann. Dafür wurden die Marker CD11b, CD51, CD54, CD62L, CD66b, CD95 und CD182 untersucht. Eine vermehrte Expression von CD11b und CD66b sowie eine verminderte CD62L-Expression deuten auf ein erhöhtes Aktivitätslevel von PMNs hin (69, 70). Diese Marker zeigen bei N2-Granulozyten gegenteilige Tendenzen. Zusätzlich ist der CXCR2-Rezeptor (CD182) auf den tumorfördernden PMNs verstärkt exprimiert (28), wohingegen N1-Granulozyten vermehrt CD95 und CD54 aufweisen (25). Bei tumorassoziierten Granulozyten wird häufiger LOX-1 nachgewiesen (36).

Die Zugabe von NGAL führte zu einer erhöhten Expression von CD182 und einer verringerten Expression von CD11b und CD66b im Vergleich zur Kontrolle nach 48 h. Die Fluoreszenzintensitäten von CD62L zeigte sich allerdings ebenfalls niedriger nach Inkubation mit NGAL. CD54, CD95 und LOX-1 waren nach 48 h auch vermindert exprimiert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ein Einfluss auf CD51 innerhalb der Inkubati-

onszeit von 150 min wurde nicht beobachtet. Zusammenfassend deuten die verminderten Expressionen von CD11b, CD66b, CD54 und CD95, sowie die erhöhte Expression von CD182 auf eine mögliche Beeinflussung durch NGAL in Richtung eines N2-Phänotyps hin. Davon abweichend sind die verminderten Expressionen von CD62L und LOX-1. Es ist zu beachten, dass die beobachteten Effekte nur Trends darstellen und keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle vorlagen.

Eine weitere Beobachtung der Studie war eine reduzierte Apoptoserate der in NGAL inkubierten Granulozyten nach 48 h. In früheren Arbeiten wurde bereits ein Zusammenhang zwischen NGAL und einem verbesserten Zellüberleben beschrieben, etwa bei Nierenepithelzellen oder den Zellen anaplastischer Schilddrüsenkarzinome. Dieser Effekt wurde durch eine verringerte CD95-Expression vermittelt, was auf eine Erhöhung der NGAL-Rezeptoren 24p13 und Megalin zurückgeführt wird (71–73). Eine verminderte Expression von CD95 sowie ein verlängertes Zellüberleben sind zwei Merkmale von N2-Neutrophilen (25, 74, 75). Somit können diese Punkte als weitere Argumente dafür gesehen werden, dass NGAL eine Polarisierung der Granulozyten bedingen kann.

Die Migrationsanalyse zeigte keinen klaren Einfluss von NGAL auf die Motilität der Granulozyten. Die Track Straightness als wichtiger Parameter zur Untersuchung der Wirkung als Chemoattraktans zeigte keinen Unterschied zur Kontrolle im ersten Versuchsteil. Zum Teil wurden auch inkonsistente Ergebnisse ermittelt, bspw. bei Betrachtung der mittleren Geschwindigkeit. Im ersten Versuchsteil zeigten die Granulozyten, vor allem in den späteren Beobachtungszeiträumen, bei NGAL eine höhere Migrationsgeschwindigkeit als die Kontrolle, im zweiten Versuchsteil lagen die Mediane signifikant niedriger als bei den anderen Bedingungen, inklusive der Kontrolle.

Im Gegensatz zu den hier dargestellten Ergebnissen ist es in einer Studie von Schroll et al. (45) zu einer Beeinflussung der Granulozytenmotilität durch NGAL gekommen. In einer modifizierten Boyden-Kammer konnte ein erhöhter Migrationsindex der PMNs bereits bei einer NGAL-Konzentration von 0,5 nM (entspricht etwa 12,5 ng/mL) beobachtet werden. Allerdings erfolgte in diesem Fall die Beobachtung lediglich über einen Zeitraum von 30 Min. Für diesen Zeitraum wurden in den für diese Arbeit mit Live Cell Imaging durchgeführten Versuchen inkonsistente Ergebnisse gefunden. Über den Ver-

lauf mehrerer Stunden zeigten die PMNs bei NGAL in den meisten Parametern ähnliche oder schlechtere Migrationseigenschaften als in der Kontrolle, was die Wirkung von NGAL als Chemoattraktans infrage stellt.

In den durchgeführten Versuchen zeigten sich durch die Tumorzellüberstände eine deutlich stärkere Beeinflussung der Granulozyten als durch NGAL. Dabei konnten in der Durchflusszytometrie keine Unterschiede zwischen den Zelllinien MDA-MB-231 und BxPC3 beobachtet werden. In der Migrationsanalyse zeigten sich signifikante Unterschiede lediglich im Parameter Track Straightness mit höheren Werten für die Granulozyten bei BxPC3-Überstand. Bereits in den ersten 30 min der Messung bewirkten die Tumorzellüberstände, ähnlich wie fMLP, eine starke Beeinflussung der PMN-Funktionsparameter. Deutlich wurde dies nicht nur in der Analyse der Migration, sondern auch bei der Auswertung des oxidativen Bursts und der Oberflächenepitope in der Durchflusszytometrie. Die Granulozyten zeigten ab dem ersten Messzeitpunkt eine starke Aktivierung durch die Überstände, während NGAL auch nach 150 min Inkubationsdauer keine signifikanten Veränderungen hervorrief.

NGAL ist einer von vielen Faktoren, die das Tumormikromilieu formen (4, 76). Demnach war die Hypothese, dass ein Effekt durch NGAL zu sehen sein wird, dieser jedoch weniger ausgeprägt ist als durch die Tumorzellüberstände. Der Vorteil dieser Studie besteht darin, dass ausschließlich der Einfluss von NGAL untersucht wurde, was jedoch keine signifikanten Veränderungen der Granulozytenfunktionen aufzeigte. Um die Fähigkeit zur N1/N2-Differenzierung durch NGAL weiter zu evaluieren, könnte man noch zusätzliche Eigenschaften bestimmen, die mit dem jeweiligen Phänotyp in Verbindung gebracht werden. Beispielsweise kann eine Unterteilung in Granulozyten anhand ihrer Dichte erfolgen oder die Produktion bestimmter Zytokine und Chemokine evaluiert werden (24, 26, 27, 77). In einer anderen Arbeit zur Differenzierung der Granulozyten in einen N1- und N2-Phänotypen wurden neben dem Zusatz von Chemokinen zu den Inkubationsmedien auch weitere Bedingungen angepasst. Beispielsweise wurde eine hypoxische Umgebung geschaffen und dem Kulturmedium Lactat beigelegt, um die Polarisierung in Richtung eines N2-Phänotypen zu provozieren (28). In diesem Aufbau ist jedoch keine eindeutige Aussage darüber möglich, welche Bedingungen einen Anteil an den Veränderungen der Granulozytenfunktionen hatten.

6 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des Proteins NGAL auf neutrophile Granulozyten zu untersuchen, insbesondere in Hinblick auf deren Rolle im Tumormikromilieu. NGAL wird von verschiedenen Tumorentitäten exprimiert und wird als potentieller Marker für die Tumorprogression betrachtet. Durch eine Einteilung in N1- und N2-Granulozyten wurden zwei Populationen beschrieben, die auf gegenteilige Weise in das Tumorgeschehen eingreifen können. Die vorliegende Arbeit sollte klären, ob und inwiefern NGAL die Funktion und Differenzierung der Granulozyten beeinflusst.

Granulozyten gesunder Blutspenderinnen und Blutspender wurden in den Überständen der Tumorzelllinien MDA-MB-231 und BxPC3 inkubiert. Vergleichend wurde eine Inkubation der Granulozyten mit rekombinantem NGAL in ähnlicher Konzentration durchgeführt. Mittels Live Cell Imaging und Durchflusszytometrie wurden spezifische Oberflächenepitope, der oxidative Burst, die NETose, die MPO-Freisetzung sowie das Migrationsverhalten untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Tumorzellüberstände eine starke Aktivierung der Granulozyten bewirkten. Im Gegensatz dazu ergab die Inkubation mit NGAL keine signifikanten Unterschiede in den analysierten Parametern im Vergleich zur Kontrolle. Es konnte eine Tendenz zur Differenzierung in einen N2-Phänotyp beobachtet werden, jedoch ohne statistische Signifikanz. Die Ergebnisse der Migrationsanalysen waren uneinheitlich. Dies deutet darauf hin, dass NGAL keine klare Wirkung als Chemoattraktans auf neutrophile Granulozyten ausübt.

Daneben wurde die Überlebensfähigkeit der Granulozyten unter in vitro-Bedingungen analysiert. Nach 48 h zeigte sich ein großer Anteil der Zellen vital, welcher durch Zugabe von Q-VD-OPh noch vergrößert wurde. Allerdings führte der Caspase-Inhibitor auch zu deutlichen Veränderungen in der ROS-Produktion und der Expression von Oberflächenmarkern. Zusätzlich zeigte sich nach 48-stündiger Inkubation mit NGAL eine signifikante Verringerung der Apoptose der Granulozyten.

Zusammenfassend lassen sich folgende Ergebnisse festhalten: Innerhalb der ersten zwei Stunden der Inkubation zeigten die Granulozyten keine signifikanten funktionellen Veränderungen durch NGAL. Durch NGAL wurde keine eindeutige Differenzierung in einen TAN-Phänotypen induziert. Zudem wurde keine signifikante Wirkung von NGAL als Chemoattraktans nachgewiesen. Es ergab sich eine signifikante Zunahme im Überleben neutrophiler Granulozyten bei Inkubation mit NGAL im Vergleich zu IFN- β .

Q-VD-OPh als Caspase-Inhibitor steigerte das Zellüberleben der Granulozyten nicht signifikant, bewirkte jedoch teils signifikante Veränderungen in deren Funktion.

7 Ausblick

Aufgrund der in der Literatur beschriebenen und hier diskutierten inkonsistenten Ergebnisse, sollten in Zukunft weitere Daten zu der Frage gesammelt werden, welchen Einfluss NGAL im Tumorumfeld und insbesondere auf tumorassoziierte Granulozyten hat. Neben den hier verwendeten Markern gibt es noch eine Reihe anderer Merkmale, die tumorassoziierte Neutrophile aufweisen und in zukünftigen Arbeiten betrachtet werden können. So produzieren N1-Granulozyten beispielsweise vermehrt TNF- α , N2-Granulozyten hingegen Arginase, VEGF und IL-8 (23, 24). Der Zellnucleus zeigt sich bei N1-Zellen hypersegmentiert und die Zellen weisen eine höhere Dichte auf als N2-Zellen (25, 78).

Daneben bedingt NGAL noch weitere Interaktionen im Tumorumfeld, die in vivo oder mit einem anderen Studienaufbau überprüft werden können. So ist der Einfluss auf MMP9 und damit auf die Angiogenese ein wichtiger Faktor in der Tumorprogression. Zusätzlich spielen Interaktionen mit anderen Zellen des Immunsystems eine Rolle. NGAL kann beispielsweise durch die erhöhte Expression von CXCR2 weitere Granulozyten in das Tumorumfeld locken (78). Es wurde auch eine erhöhte Expression von HLA-G auf CD4-positiven T-Zellen durch NGAL beschrieben, was wiederum die Immuntoleranz erhöht und insbesondere bei Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielt. (79).

Ein weiterer Faktor ist die Rolle des sogenannten trainierten angeborenen Immunsystems. Es konnten beispielsweise noch Jahre nach einer stattgehabten BCG-Impfung gegen Tuberkulose Granulozyten mit epigenetischen und metabolischen Veränderungen nachgewiesen werden. Ähnliche langfristige Veränderungen wurden auch z.B. für β -Glukane, hyperglykämische Stoffwechselzustände oder G-CSF gefunden (80). Nach diesen Daten scheint es möglich, dass auch weitere Faktoren langfristige Veränderungen bei Granulozyten und ihren Progenitorzellen auf Knochenmarksebene auslösen können.

8 Literatur

1. *Causes of death statistics*; 2024 [Stand: 16.09.2024]. Verfügbar unter: https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Causes_of_death_statistics#Major_causes_of_death_in_the_EU_in_2021.
2. Murphy KM, Weaver C, Janeway C, Seidler L, Hrsg. *Janeway Immunologie*. 9. Auflage. Berlin, Germany: Springer Spektrum; 2018.
3. Nakazawa D, Shida H, Tomaru U, Yoshida M, Nishio S, Atsumi T et al. *Enhanced formation and disordered regulation of NETs in myeloperoxidase-ANCA-associated microscopic polyangiitis*. *Journal of the American Society of Nephrology* 2014; 25(5):990–7. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1681/ASN.2013060606>.
4. Chakraborty S, Kaur S, Guha S, Batra SK. *The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer*. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; 1826(1):129–69. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.03.008>.
5. Furze RC, Rankin SM. *Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow*. *Immunology* 2008; 125(3):281–8. Verfügbar unter: <https://online-library.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2567.2008.02950.x>.
6. Martin C, Burdon PC, Bridger G, Gutierrez-Ramos J-C, Williams TJ, Rankin SM. *Chemokines Acting via CXCR2 and CXCR4 Control the Release of Neutrophils from the Bone Marrow and Their Return following Senescence*. *Immunity* 2003; 19(4):583–93. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14563322/>.
7. Williams MR, Azcutia V, Newton G, Alcaide P, Luscinskas FW. *Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium*. *Trends in Immunology* 2011; 32(10):461–9. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.06.009>.
8. Filippi M-D. *Mechanism of Diapedesis: Importance of the Transcellular Route*. *Advances in immunology* 2016; 129:25–53. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4889131/>.
9. G. E. Rainger, C. D. Buckley, D. L. Simmons, and G. B. Nash. *Neutrophils sense flow-generated stress and direct their migration through $\alpha V\beta 3$ -integrin*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 1999; 276(3):H858-H864. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1999.276.3.H858>.

10. Petri B, Sanz M-J. *Neutrophil chemotaxis*. Cell and Tissue Research 2018; 371(3):425–36. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00441-017-2776-8>.
11. Michael M, Vermeren S. *A neutrophil-centric view of chemotaxis*. Essays in Biochemistry 2019; 63(5):607–18. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1042/EBC20190011>.
12. Segal AW. *How neutrophils kill microbes*. Annual review of immunology 2005; 23:197–223. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653>.
13. Gershkovitz M, Caspi Y, Fainsod-Levi T, Katz B, Michaeli J, Khawaled S et al. *TRPM2 Mediates Neutrophil Killing of Disseminated Tumor Cells*. Cancer Research 2018; 78(10):2680–90. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29490946/>.
14. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V et al. *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps*. Journal of Cell Biology 2007; 176(2):231–41. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2063942/>.
15. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS et al. *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science 2004; 303(5663):1532–5. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1126/science.1092385>.
16. Vorobjeva NV, Chernyak BV. *NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and Pathology*. Biochemistry. Biokhimiia 2020; 85(10):1178–90. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33202203/>.
17. Yin C, Heit B. *Armed for destruction: formation, function and trafficking of neutrophil granules*. Cell and Tissue Research 2018; 371(3):455–71. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29185068/>.
18. Rørvig S, Østergaard O, Heegaard NHH, Borregaard N. *Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors*. Journal of Leukocyte Biology 2013; 94(4):711–21. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1189/jlb.1212619>.

19. Borregaard N, Sørensen OE, Theilgaard-Mönch K. *Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins*. Trends in immunology 2007; 28(8):340–5. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.06.002>.
20. Gioia M, Monaco S, Van Den Steen PE, Sbardella D, Grasso G, Marini S et al. *The Collagen Binding Domain of Gelatinase A Modulates Degradation of Collagen IV by Gelatinase B*. Journal of Molecular Biology 2009; 386(2):419–34. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.12.021>.
21. Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell 2011; 144(5):646–74. Verfügbar unter: [https://www.cell.com/fulltext/S0092-8674\(11\)00127-9](https://www.cell.com/fulltext/S0092-8674(11)00127-9).
22. Wu T, Dai Y. *Tumor microenvironment and therapeutic response*. Cancer Letters 2017; 387:61–8. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.043>.
23. Sun C, Wang S, Ma Z, Zhou J, Ding Z, Yuan G et al. *Neutrophils in glioma microenvironment: from immune function to immunotherapy*. Frontiers in Immunology 2024; (15):1393173. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11109384/>.
24. Demkow U. *Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Cancer Invasion, Evasion and Metastasis*. Cancers 2021; 13(17). Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/cancers13174495>.
25. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L et al. *Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN*. Cancer Cell 2009; 16(3):183–94. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.06.017>.
26. Giese MA, Hind LE, Huttenlocher A. *Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment*. Blood 2019; 133(20):2159–67. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-844548>.
27. Jablonska J, Wu C-F, Andzinski L, Leschner S, Weiss S. *CXCR2-mediated tumor-associated neutrophil recruitment is regulated by IFN-β*. International Journal of Cancer 2014; 134(6):1346–58. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/ijc.28551>.
28. Ohms M, Möller S, Laskay T. *An Attempt to Polarize Human Neutrophils Toward N1 and N2 Phenotypes in vitro*. Frontiers in Immunology 2020; 11:532. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00532>.

29. Matlung HL, Babes L, Zhao XW, van Houdt M, Treffers LW, van Rees DJ et al. *Neutrophils Kill Antibody-Opsonized Cancer Cells by Trogoptosis*. Cell Reports 2018; 23(13):3946-3959.e6. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.082>.
30. El-Hag A, Clark RA. *Down-regulation of human natural killer activity against tumors by the neutrophil myeloperoxidase system and hydrogen peroxide*. The Journal of Immunology 1984; 133(6):3291–7. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6092470>.
31. Yachimovich-Cohen N, Even-Ram S, Shufaro Y, Rachmilewitz J, Reubinoff B. *Human embryonic stem cells suppress T cell responses via arginase I-dependent mechanism*. The Journal of Immunology 2010; 184(3):1300–8. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804261>.
32. Cools-Lartigue J, Spicer J, Najmeh S, Ferri L. *Neutrophil extracellular traps in cancer progression*. Cellular and Molecular Life Sciences 2014; 71(21):4179–94. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1683-3>.
33. Demers M, Wagner DD. *Neutrophil extracellular traps: A new link to cancer-associated thrombosis and potential implications for tumor progression*. OncolImmunology 2013; 2(2):e22946. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.4161/onci.22946>.
34. Teixeira Á, Garasa S, Gato M, Alfaro C, Migueliz I, Cirella A et al. *CXCR1 and CXCR2 Chemokine Receptor Agonists Produced by Tumors Induce Neutrophil Extracellular Traps that Interfere with Immune Cytotoxicity*. Immunity 2020; 52(5):856-871.e8. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.03.001>.
35. Nywening TM, Belt BA, Cullinan DR, Panni RZ, Han BJ, Sanford DE et al. *Targeting both tumour-associated CXCR2+ neutrophils and CCR2+ macrophages disrupts myeloid recruitment and improves chemotherapeutic responses in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Gut 2018; 67(6):1112–23. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-313738>.
36. Condamine T, Dominguez GA, Youn J-I, Kossenkova AV, Mony S, Alicea-Torres K et al. *Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients*. Science immunology 2016; 1(2). Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aaf8943>.

37. Triebel S, Bläser J, Reinke H, Tschesche H. *A 25 kDa $\alpha 2$ -microglobulin-related protein is a component of the 125 kDa form of human gelatinase*. FEBS letters 1992; 314(3):386–8. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)81511-j](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)81511-j).
38. Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengeløv H, Borregaard N. *Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase*. Journal of Biological Chemistry 1993; 268(14):10425–32. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7683678/>.
39. Kjeldsen L, Cowland BJ, Borregaard N. *Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse*. Biochimica et Biophysica Acta 2000; (1482):272–83. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(00\)00152-7](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(00)00152-7).
40. Friedl A, Stoesz SP, Buckley P, Gould MN. *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in normal and neoplastic human tissues. Cell type-specific pattern of expression*. The Histochemical journal 1999; 31(7):433–41. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10475571/>.
41. Flower DR, North AC, Sansom CE. *The lipocalin protein family: structural and sequence overview*. Biochimica et Biophysica Acta 2000; (1482):9–24. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(00\)00148-5](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(00)00148-5).
42. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK. *The Neutrophil Lipocalin NGAL Is a Bacteriostatic Agent that Interferes with Siderophore-Mediated Iron Acquisition*. Molecular Cell 2002; 10(5):1033–43. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00708-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00708-6).
43. Bao G, Clifton M, Hoette TM, Mori K, Deng S-X, Qiu A et al. *Iron traffics in circulation bound to a siderocalin (Ngal)-catechol complex*. Nature chemical biology 2010; 6(8):602–9. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/nchembio.402>.
44. Chandra RK. *Reduced bactericidal capacity of polymorphs in iron deficiency*. Archives of disease in childhood 1973; 48(11):864–6. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1136/adc.48.11.864>.
45. Schroll A, Eller K, Feistritzer C, Nairz M, Sonnweber T, Moser PA et al. *Lipocalin-2 ameliorates granulocyte functionality*. European Journal of Immunology 2012;

42(12):3346–57. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.201142351>.

46. Du Z-P, Wu B-L, Xie Y-M, Zhang Y-L, Liao L-D, Zhou F et al. *Lipocalin 2 promotes the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells through a novel positive feedback loop*. *Biochimica et Biophysica Acta* 2015; 1853(10 Pt A):2240–50. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26190820/>.
47. Ye D, Yang K, Zang S, Lin Z, Chau H-T, Wang Y et al. *Lipocalin-2 mediates non-alcoholic steatohepatitis by promoting neutrophil-macrophage crosstalk via the induction of CXCR2*. *Journal of hepatology* 2016; 65(5):988–97. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.041>.
48. Tekamp-Olson P, Gallegos C, Bauer D, McClain J, Sherry B, Fabre M et al. *Cloning and characterization of cDNAs for murine macrophage inflammatory protein 2 and its human homologues*. *The Journal of experimental medicine* 1990; 172(3):911–9. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1084/jem.172.3.911>.
49. Santiago-Sánchez GS, Pita-Grisanti V, Quiñones-Díaz B, Gumper K, Cruz-Monserrate Z, Vivas-Mejía PE. *Biological Functions and Therapeutic Potential of Lipocalin 2 in Cancer*. *International Journal of Molecular Sciences* 2020; 21(12). Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/ijms21124365>.
50. Stoesz SP, Friedl A, Haag JD, Lindstrom MJ, Clark GM, Gould MN. *Heterogeneous expression of the lipocalin NGAL in primary breast cancers*. *International Journal of Cancer* 1998; 79(6):565–72. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9842963/>.
51. Yang J, Bielenberg DR, Rodig SJ, Doiron R, Clifton MC, Kung AL et al. *Lipocalin 2 promotes breast cancer progression*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009; 106(10):3913–8. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19237579/>.
52. Leng X, Ding T, Lin H, Wang Y, Hu L, Hu J et al. *Inhibition of lipocalin 2 impairs breast tumorigenesis and metastasis*. *Cancer Research* 2009; 69(22):8579–84. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1934>.
53. Gomez-Chou SB, Swidnicka-Siergiejko AK, Badi N, Chavez-Tomar M, Lesinski GB, Bekaii-Saab T et al. *Lipocalin-2 Promotes Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by Regulating Inflammation in the Tumor Microenvironment*. *Cancer Research*

- 2017; 77(10):2647–60. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1986>.
54. Tong Z, Chakraborty S, Sung B, Koolwal P, Kaur S, Aggarwal BB et al. *Epidermal growth factor down-regulates the expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) through E-cadherin in pancreatic cancer cells*. *Cancer* 2011; 117(11):2408–18. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/cncr.25803>.
 55. Tong Z, Kunnumakkara AB, Wang H, Matsuo Y, Diagaradjane P, Harikumar KB et al. *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel suppressor of invasion and angiogenesis in pancreatic cancer*. *Cancer Research* 2008; 68(15):6100–8. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0540>.
 56. Leung L, Radulovich N, Zhu C-Q, Organ S, Bandarchi B, Pintilie M et al. *Lipocalin2 promotes invasion, tumorigenicity and gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma*. *PLoS ONE* 2012; 7(10). Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046677>.
 57. Natarajan S, Sumantran VN, Ranganathan M, Madheswaran S. *Microarray and pattern miner analysis of AXL and VIM gene networks in MDA-MB-231 cells*. *Molecular Medicine Reports* 2018; 18(4):4147–55. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9404>.
 58. Queen MM, Ryan RE, Holzer RG, Keller-Peck CR, Jorcyk CL. *Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression*. *Cancer Research* 2005; 65(19):8896–904. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1734>.
 59. Hundhammer T, Gruber M, Wittmann S. *Paralytic Impact of Centrifugation on Human Neutrophils*. *Biomedicines* 2022; 10(11). Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112896>.
 60. Blanter M, Cambier S, Bondt M de, Vanbrabant L, Pörtner N, Abouelasrar Salama S et al. *Method Matters: Effect of Purification Technology on Neutrophil Phenotype and Function*. *Frontiers in Immunology* 2022; 13:820058. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.820058>.
 61. Krémer V, Godon O, Bruhns P, Jönsson F, Chaisemartin L de. *Isolation methods determine human neutrophil responses after stimulation*. *Frontiers in Immunology* 2023; 14:1301183. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1301183>.

62. Blanco-Camarillo C, Alemán OR, Rosales C. *Low-Density Neutrophils in Healthy Individuals Display a Mature Primed Phenotype*. *Frontiers in Immunology* 2021; 12:672520. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34276661/>.
63. Zwolak I, Wnuk E, Świeca M. *Identification of Potential Artefacts in In Vitro Measurement of Vanadium-Induced Reactive Oxygen Species (ROS) Production*. *International journal of environmental research and public health* 2022; 19(22). Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/ijerph192215214>.
64. Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. *Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products*. *Blood* 1992; 80(8):2012–20. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1382715/>.
65. Alipour R, Fatemi A, Alsahebhosul F, Andalib A, Pourazar A. *Autologous plasma versus fetal calf serum as a supplement for the culture of neutrophils*. *BMC Research Notes* 2020; 13(1):39. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1186/s13104-020-4902-z>.
66. Butler KL, Ambravaneswaran V, Agrawal N, Bilodeau M, Toner M, Tompkins RG et al. *Burn injury reduces neutrophil directional migration speed in microfluidic devices*. *PLoS ONE* 2010; 5(7):e11921. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011921>.
67. Dobliger N, Bredthauer A, Mohrez M, Hähnel V, Graf B, Gruber M et al. *Impact of hydroxyethyl starch and modified fluid gelatin on granulocyte phenotype and function*. *Transfusion* 2019; 59(6):2121–30. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/trf.15279>.
68. Rimboeck J, Gruber M, Wittmann S. *Is the In Vitro Observed NETosis the Favored Physiological Death of Neutrophils or Mainly Induced by an Isolation Bias?* *International Journal of Molecular Sciences* 2023; 24(8). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10138317/>.
69. Ley K, Gaehtgens P, Fennie C, Singer MS, Lasky LA, Rosen SD. *Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo*. *Blood* 1991; 77(12):2553–5. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2043760/>.
70. Sengeløv H, Kjeldsen L, Diamond MS, Springer TA, Borregaard N. *Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils*. *Journal*

- of Clinical Investigation 1993; 92(3):1467–76. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1172/JCI116724>.
71. Crescenzi E, Mellone S, Gragnano G, Iaccarino A, Leonardi A, Pacifico F. *NGAL Mediates Anaplastic Thyroid Carcinoma Cells Survival Through FAS/CD95 Inhibition*. Endocrinology 2023; 165(2). Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1210/endo/bqad190>.
 72. Han M, Li Y, Di Wen, Liu M, Ma Y, Cong B. *NGAL protects against endotoxin-induced renal tubular cell damage by suppressing apoptosis*. BMC nephrology 2018; 19(1):168. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1186/s12882-018-0977-3>.
 73. Zang X, Zheng F, Hong H, Jiang Y, Song Y, Xia Y. *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin protects renal tubular epithelial cells in hypoxia-reperfusion by reducing apoptosis*. International Urology and Nephrology 2014; 46(8):1673–9. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11255-014-0749-3>.
 74. Andzinski L, Wu C-F, Lienenklaus S, Kröger A, Weiss S, Jablonska J. *Delayed apoptosis of tumor associated neutrophils in the absence of endogenous IFN- β* . International Journal of Cancer 2015; 136(3):572–83. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24806531/>.
 75. Wu L, Saxena S, Goel P, Prajapati DR, Wang C, Singh RK. *Breast Cancer Cell-Neutrophil Interactions Enhance Neutrophil Survival and Pro-Tumorigenic Activities*. Cancers 2020; 12(10). Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/cancers12102884>.
 76. Jin M-Z, Jin W-L. *The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing*. Signal Transduction and Targeted Therapy 2020; 5(1):166. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00280-x>.
 77. Mollinedo F. *Neutrophil Degranulation, Plasticity, and Cancer Metastasis*. Trends in immunology 2019; 40(3):228–42. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.01.006>.
 78. Wang X, Qiu L, Li Z, Wang X-Y, Yi H. *Understanding the Multifaceted Role of Neutrophils in Cancer and Autoimmune Diseases*. Frontiers in Immunology 2018; 9:2456. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6237929/>.
 79. La Manna G, Ghinatti G, Tazzari PL, Alviano F, Ricci F, Capelli I et al. *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin increases HLA-G(+)/FoxP3(+) T-regulatory cell*

population in an in vitro model of PBMC. PLoS ONE 2014; 9(2):e89497. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089497>.

80. Kalafati L, Hatzioannou A, Hajishengallis G, Chavakis T. *The role of neutrophils in trained immunity*. Immunological Reviews 2023; 314(1):142–57. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/imr.13142>.

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht Projektplan.....	20
Abbildung 2: μ -Slide Chemotaxis®	34
Abbildung 3: Aufnahmen des Live Cell Imagings.	36
Abbildung 4: Schritte zur Auswertung der Daten der Durchflusszytometrie mittels FlowJo.	39
Abbildung 5: Konzentration von NGAL [ng/mL] in den Tumorzellüberständen der Zelllinien BxPC3 und MDA-MB-231.....	43
Abbildung 6: Fluoreszenzintensitäten von Rhodamin 123 bei Stimulation der Granulozyten durch fMLP und TNF- α	44
Abbildung 7: Einteilung der Inkubationsmedien in die Kategorien Tumorzellüberstand bzw. Kulturmedium	45
Abbildung 8: Fluoreszenzintensität von Rhodamin 123 bei Stimulation der Granulozyten mit fMLP und TNF- α und Inkubation in DMEM.....	47
Abbildung 9: Fluoreszenzintensität von CD11b PE zu den verschiedenen Messzeitpunkten unabhängig von Inkubationsmedien und NGAL-Konzentrationen .	48
Abbildung 10: Anteile [%] der markierten Zellen bei Anfärbung mit PI und Annexin V	50
Abbildung 11: Anteil an PI-gefärbten Granulozyten je nach Inkubationsbedingung und Zeit.....	52
Abbildung 12: Relative Veränderungen der jeweiligen Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zur Kontrolle nach 48-stündiger Inkubation	53
Abbildung 13: Werte der Track Length aufgeteilt über die Beobachtungszeiträume und Bedingungen	55
Abbildung 14: TDx-Werte [μ m] in Abhängigkeit der Bedingung und des Zeitraums .	56

Abbildung 15: Track Straightness bei verschiedenen Bedingungen über die Beobachtungsintervalle	57
Abbildung 16: Track Speed Mean [$\mu\text{m/s}$] je nach Beobachtungszeitraum und Bedingung	58
Abbildung 17: Track Lengths [μm] aufgeteilt nach Lockstoffen und Beobachtungszeiträumen	60
Abbildung 18: TDx-Werte [μm] in Abhängigkeit des Beobachtungszeitraums und des Lockstoffes	61
Abbildung 19: Track Straightness im zeitlichen Verlauf, aufgeteilt nach den Lockstoffen	62
Abbildung 20: Mittlere Track Speed [$\mu\text{m/s}$] der Granulozyten in den Beobachtungszeiträumen [min], aufgeteilt nach den Lockstoffen	63

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Oberflächenepitope und Stimulationen zur Unterscheidung zwischen N1- und N2-TANs	15
Tabelle 2: Versuchsreihen (I-IV) der Durchflusszytometrie	31
Tabelle 3: Pipettierschema Durchflusszytometrie Versuche I und II	32
Tabelle 4: Pipettierschema Durchflusszytometrie Versuche III und IV.	32
Tabelle 5: Endkonzentrationen der Zusätze für die Burst-Messung.	32
Tabelle 6: Pipettierschema für die Versuche I und II.	33
Tabelle 7: Pipettierschema für die Versuche III und IV.	33
Tabelle 8: Lösungen für die linken Reservoirs mit jeweiliger Kontrollbedingung.	35
Tabelle 9: Verwendete Farbstoffe, Wellenlängen und Filterwürfel im Live Cell Imaging.	37
Tabelle 10: Parameter der Migrationsanalyse	40

Tabelle 11: Mittelwerte (MW) und Mediane der Fluoreszenzintensitäten.	46
Tabelle 12: Mittelwerte und Standardabweichungen der Rhodamin 123- Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation in RPMI-1640.....	49
Tabelle 13: Epitope CD11b, CD62L, CD66b im zeitlichen Verlauf bei Inkubation mit und ohne Q-VD-OPh	50
Tabelle 14: Mediane sowie Interquartilsabstände (in Klammern) der jeweiligen Parameter.....	64
Tabelle 15: Anteil angefärbter Zellen zum Zeitpunkt 1750, entsprechend 14,5 h nach Beginn der Beobachtung, im Live Cell Imaging.	64

9.3 Danksagung

Zum Ende möchte ich mich bei den Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

An erster Stelle danke ich meiner Doktormutter, Prof. Dr. med. Sigrid Wittmann, und dem Leiter des Forschungslabors der Klinik für Anästhesiologie, Dr. Michael Gruber, für das Vertrauen zur Bearbeitung des Themas, die stete Unterstützung und die konstruktive Kritik in jeder Phase der Arbeit.

Mein weiterer Dank gilt dem gesamten Team des Forschungslabors der Klinik für Anästhesiologie - Frau Regina Lindner, Frau Gabriele Bollwein, Frau Ruth Späth, Frau Sigrid Bamberger, Frau Marion Schindler und Herrn Simon Tümmeler - für die fachliche Begleitung, die Geduld und die herzliche Unterstützung in allen Belangen.

Weiterhin danke ich allen freiwilligen Blutspenderinnen und Blutspendern, ohne deren Bereitschaft diese Versuche nicht durchführbar gewesen wären.

Mein besonderer Dank gilt Pauline Hösel für unsere Freundschaft, ihre Verlässlichkeit und ihr offenes Ohr in Momenten des Zweifels.

Zuletzt danke ich meinen Eltern und meiner Schwester für ihren bedingungslosen Rückhalt, ihre Ermutigung und ihr Vertrauen in mich. Sie bestärken mich darin, meinen Weg zu gehen und geben mir Halt in herausfordernden Zeiten.

Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

9.4 Erklärung zum Promotionsverfahren

Gemäß § 3 Abs. 3 und 4 der Promotionsordnung der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg erkläre ich, Alicia Lydia Böhm, geboren am 26.08.1998 in Hammelburg,

- dass ich den Doktorgrad der Medizin nicht schon an einer Hochschule in der Bundesrepublik Deutschland erworben oder die medizinische Doktorprüfung endgültig nicht bestanden habe
- dass ich nicht an anderer Stelle zu einem Promotionsverfahren zum Erwerb des medizinischen Doktorgrades zugelassen bin

Außerdem erkläre ich,

- dass mir keine Tatsachen bekannt sind, die mich zur Führung eines akademischen Grades im Sinne des Gesetzes über die Führung akademischer Grade unwürdig erscheinen lassen
- dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, den 28.02.2026

(Alicia Lydia Böhm)