

F. Grimminger,
H. D. Walmrath, W. Seeger,
H.-G. Lasch

Zentrum für Innere Medizin,
Universität Gießen

Granulozyten-Endothel-Interaktion

Mechanismen der Abwehr und Autoaggression

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) spielen eine Schlüsselrolle in der Auseinandersetzung des Wirtsorganismus mit infektiösen Mikroorganismen. Im Verlauf eines inflammatorischen Prozesses werden die mobilen Effektoren des Immunsystems zunächst am Endothel des betroffenen Kapillarbettes adhären, verlassen dann den Intra-vascularraum durch reversible interendotheliale Lücken (Diapedese), um schließlich in Form gerichteter Bewegungen aktiv den Infektionsherd aufzusuchen (Chemotaxis). Am Ende der Reaktionssequenz erfolgt die Ingestion (Phagozytose) der infektiösen Partikel, erleichtert durch eine Opsonierung der bakteriellen Oberfläche mittels Komplementfaktoren oder spezifischer Immunglobuline. Die Abtötung und Verdauung der Mikrobe erfolgt im Verlauf ihrer Internalisation durch hydrolytische und bakterizide Faktoren, die aus zytoplasmatischen Granula in das phagosomale Kompartiment entleert werden (Degranulation), sowie durch die Produktion toxischer Sauerstoffspezies in der phagosomalen Membran. Dieses ausgeprägte Destruktionspotential der immunologischen Effektorzellen kann bei Fehlsteuerung des granulozytären Reiz-Antwort-Verhaltens zu einer Bedrohung für den menschlichen Organismus selbst werden. Hauptziel der granulozytären Autoaggression ist das vaskuläre Endothel und das perivaskuläre Gewebe bei verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen.

Steuerung der granulozytär-endothelialen Affinität

Die granulozytär-endotheliale Affinität wird sowohl durch biophysikalische als auch durch biochemische Fak-

Schlüsselwörter

Mikrovaskuläre Granulozytenkinetik, Integrine, Selectine, Lipidmediatoren, Neutrophil-Enaktivierung, Endotoxin, Exotoxin, Anti-Neutrophil-Antikörper

Zusammenfassung

Die mikrovaskuläre Granulozytenkinetik ist abhängig von Änderungen der Zellflexibilität und von der Expression intrazellulärer Adhäsionsmoleküle. Unter inflammatorischen Bedingungen kommt es zu einer direkten Kontaktaufnahme zwischen zirkulierenden Granulozyten und vaskulärem Endothel. Über interzelluläre Synthesewege entstehen Lipidmediatoren, welche den komplexen Vorgang der Extravasation stimulierter Granulozyten steuern. In der Zellmembran und in den zytoplasmatischen Granula sind Faktoren angereichert, die im Rahmen einer immunologischen Konfrontation aktiviert bzw. sezerniert werden. Sie stehen im Dienste der antimikrobiellen Verteidigung, können aber unter verschiedenen Bedingungen zu einer Bedrohung für den Organismus selbst werden. Eine Fehlsteuerung des granulozytären Destruktionspotentials gegen das vaskuläre/perivaskuläre Gewebe ist induzierbar durch bakterielle Endo- und Exotoxine, durch Anti-Granulozyten-Antikörper, durch mikrovaskulär deponierte Immunkomplexe und durch Störungen der intra- und extrazellulären Signalsysteme.

Keywords

Microvascular neutrophil kinetic, integrins, selectins, lipidmediators, neutrophil activation, endotoxin, exotoxin, anti-neutrophil antibodies

Summary

Adhesive interaction of activated neutrophils and vascular endothelial cells may play a crucial role in the pathogenesis of different inflammatory diseases. Microvascular granulocyte kinetic depends on cell deformability and surface of specific intercellular adhesion molecules. The intimate contact between granulocytes and endothelial cells is a prerequisite for the generation of lipidmediators and initiates the process of extravasation. The destructive arsenal of the activated neutrophil includes hydrolytic granule constituents as well as toxic oxygen species and it is controlled by regulatory mediators such as leukotriens and cytokines. It is a pivotal component of the host defence but may contribute to severe vascular damage under pathophysiological conditions. Neutrophil mediated vascular injury can be induced by bacterial endo- and exotoxins, by antineutrophil antibodies, by microvascular deposits of immunaggregates and by different disturbances of the intra- and extracellular signalling system.

toren reguliert. In den großen arteriellen und venösen Gefäßen der Makrozirkulation strömen Granulozyten und Erythrozyten gleichermaßen axial, und die Passagezeiten dieser Zellen zeigen keinen wesentlichen Unterschied. Diese Bedingungen ändern

sich grundlegend in dem Netzwerk der Mikrozirkulation. Die mittlere Größenverteilung der Granulozyten, bestimmt unter den Bedingungen einer sphärischen Zellform, übertrifft den mittleren Gefäßdurchmesser der Kapillarsegmente (Abb. 1). Hieraus

resultiert, daß die Granulozyten für die Passage des Kapillarbettes mehrfach deformiert werden müssen und daß hierbei ein enger Kontakt zwischen granulozytärer und endothelialer Oberfläche des Kapillarbettes entsteht.

Erwartungsgemäß ist die Passagezeit der Granulozyten durch die

Mikrozirkulation gegenüber derjenigen der Erythrozyten deutlich verlängert. Dieser Umstand führt z. B. zu einer relativen Anreicherung der PMN im pulmonalen Kapillarbett um den Faktor 50–100 im Vergleich zu den Erythrozyten (1).

Die Transitzeit hängt in erheblichem Umfang von dem hydrostati-

schon Druckgradienten über der Kapillarstrecke und von den durch die Blutflußgeschwindigkeit vermittelten Scherkräften ab (2). Eine Steigerung der Organperfusion bewirkt über eine Verkürzung der PMN-Transitzeit eine Verminderung des pulmonalen Marginationspools und somit eine Verschiebung der weißen Zellen in die systemische Zirkulation. Umgekehrt wird der Granulozytentransit durch eine Reduktion der Lungenperfusion erheblich verlangsamt, was zu einer Expansion des sequestrierten Zellpools führt. Diese Beobachtungen belegen die möglicherweise pathogenetisch relevante Abhängigkeit der granulozytär-endothelialen Interaktion von Parametern der mikrovaskulären Hämodynamik.

Zellflexibilität und mikrovaskuläre Granulozytenkinetik

Filteruntersuchungen haben gezeigt, daß Erythrozyten im Vergleich zu Granulozyten eine viel größere Verformbarkeit aufweisen (3). Dieser Unterschied, der für die Passage durch Kapillaren mit Durchmesser unterhalb des sphärischen Zelldurchmessers von großer Bedeutung ist, wird durch Unterschiede der Zytoplasmaviskosität erklärt, die wiederum von dem zytoplasmatischen Gehalt an zytoskeletalen Mikrofilamenten abhängig ist. Als Ausdruck einer Beeinflussbarkeit der Granulozytenflexibilität durch exogene Faktoren zeigten In-vitro-Untersuchungen, daß die Verformbarkeit dieser Zellen nach Aktivierung mit unterschiedlichen Rezeptorliganden weiter abnehmen kann (4, 5), parallel mit einem Anstieg fibrillärer Bestandteile des Zytoplasmas. Eine massive Zunahme des zellulären F-Actingehaltes erfolgt dabei wenige Sekunden nach Aktivierung der Zellen mit inflammatorischen Agenzien (Abb. 2), was in vivo eine sofortige Abbremsung in der Mikrozirkulation zur Folge haben muß. Erwartungsgemäß führt die F-Actin-vermittelte Abnahme der Zellflexibilität zu einem »Sticking« von Granulozyten in den Organkapillaren.

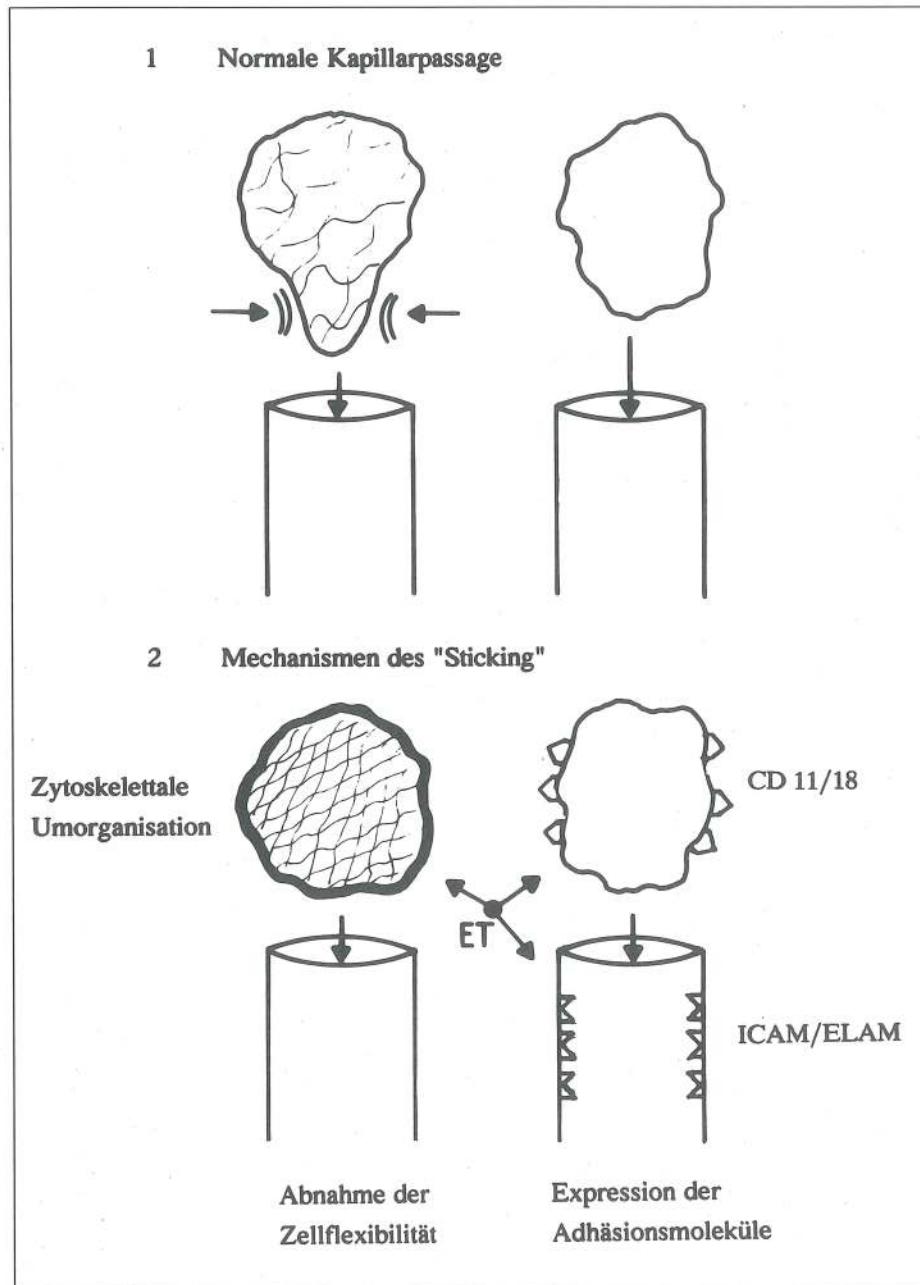


Abb. 1 Regulation der transkapillären Granulozytenkinetik. Inflammatorische Mediatoren verzögern die granulozytäre Kapillarpassage durch zwei Mechanismen: Sie induzieren eine Zunahme des zytoplasmatischen F-Actingehaltes und damit eine Abnahme der Zellflexibilität. Es resultiert eine Abbremsung in der relativ engen Mikrozirkulation (linke Bildhälfte). Die unmittelbare Kontaktaufnahme mit dem vaskulären Endothel erfolgt durch die stimulusinduzierte Expression von komplementären Adhäsionsmolekülen (rechte Bildhälfte).

Adhäsionsmoleküle als Vermittler der granulozytär-endothelialen Kontaktaufnahme (Abb. 3)

Die stimulusinduzierte Verlangsamung des kapillären Granulozytentransits ist die erste Stufe der granulozytär-endothelialen Interaktion. Der direkte Kontakt von Granulozyten und vaskulärem Endothel wird auf der nächsten Stufe durch ein System von Adhäsionsmolekülen auf den kommunizierenden Zellarten gesteuert. Eine Vielzahl inflammatorischer Stimuli kann die Expression dieser Moleküle in der Zellmembran auslösen.

Die Adhäsion-vermittelnden Rezeptoren auf beiden Zellen werden den Gruppen der Selectine, der Integrine und der Immunglobulin-Gensuperfamilie zugeordnet (6, 7). Der initiale lockere Kontakt von Granulozyten und Endothelzellen wird über Selectine vermittelt, von denen derzeit drei bekannt sind: P-Selectin, klassifiziert als cluster of differentiation (CD 62), und E-Selectin sind auf Endothelzellen präsent, während L-Selectin auf Granulozyten exprimiert wird. P-Selectin kann nach inflammatorischer Zellaktivierung innerhalb von Minuten aus intrazellulären Pools an die Zelloberfläche transloziert werden und mit bestimmten Oligosaccharidstrukturen (Sialyl-Lewis X-Pentasaccharid) sowie mit dem L-Selectin auf Granulozyten interagieren. E-Selectin dagegen wird über Stunden nach Zytokinaktivierung von Endothelzellen de novo synthetisiert und erst mit einer langen Latenzzeit an der Zelloberfläche exprimiert – es bindet zirkulierende Granulozyten aber über die gleichen Oberflächenmoleküle wie L-Selectin.

Das reversible Zusammenspiel der Selectine bewirkt eine weitere Abnahme der granulozytären Geschwindigkeit durch »Rollen« auf der endothelialen Oberfläche und ermöglicht den mobilen Zellen, sich auf dem Endothel in die Umgebung des inflammatorischen Focus »vorzutasten«. Erreicht der Granulozyt den Focus, wird seine Steuerung von lokalen Entzündungsmediatoren übernommen. Diese Lokalmediatoren veranlassen

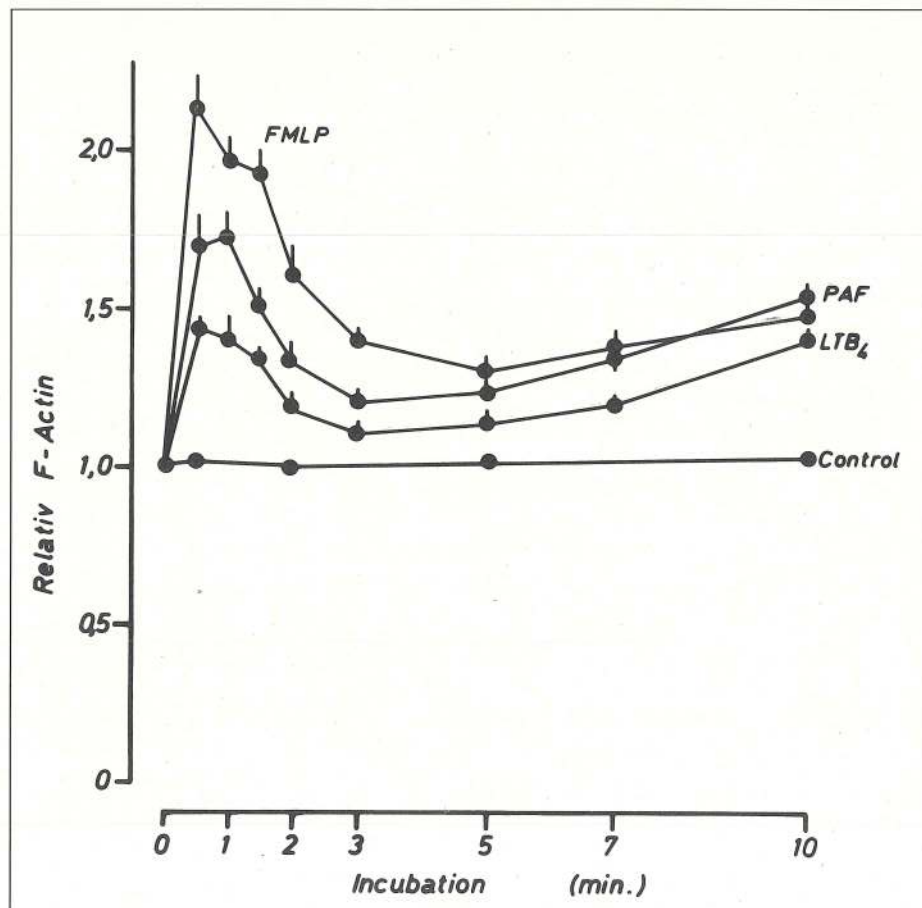


Abb. 2 Stimulusinduzierte Zunahme des zytoplasmatischen F-Actingehaltes in Granulozyten. Isolierte Granulozyten wurden *in vitro* mit verschiedenen inflammatorischen Mediatoren (PAF, LTB₄, FMLP) inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Zellreaktion abgestoppt und der zytoplasmatische F-Actingehalt fluorometrisch mit der NBD-Phalloidin-Methode bestimmt. Innerhalb weniger Minuten kommt es zu einem reversiblen Anstieg des zytoplasmatischen Mikrofilamentgehaltes und zu einer korrespondierenden Abnahme des freien G-Actinpools. Diese Reaktion ist verbunden mit einem Sol-Gel-Transit und einer Abnahme der Zellflexibilität.

über spezifische Rezeptormechanismen den Granulozyten dazu, sein L-Selectin durch proteolytische Spaltung des Verankerungspeptids »abzuwerfen« (Shedding) (8). Gleichzeitig wird über die nunmehr exprimierten Integrine die Adhäsion sekundär konsolidiert – der Granulozyt hält in der Mikrozirkulation des Zielgebietes an.

Neutrophile Granulozyten exprimieren drei heterodimere Integrine auf der äußeren Zellmembran, welche die Adhärenz an endothelialen Oberflächen vermitteln. Jedes dieser drei Adhäsionsmoleküle enthält eine strukturell identische Beta-Kette (CD 18), jedoch 3 distinkte Alpha-Ketten (CD 11a, CD 11b und CD11c). Während unstimulierte Granulozyten eine geringe Oberflächendichte dieser Proteine aufweisen, können verschiedene

inflammatorische Stimuli (Komplementfaktoren, FMLP, PAF, Leukotrien B₄, Endotoxin) eine erhebliche Mobilisation aus intrazellulären Kompartimenten auslösen.

Die Rezeptorstrukturen, welche mit den granulozytären Adhäsionsmolekülen in Kontakt treten, liegen auf der endothelialen Zelloberfläche. Derzeit bekannte endotheliale Liganden granulozytärer Integrine sind die einkettigen Glykoproteine ICAM-1 (interzelluläres Adhäsionsprotein 1), als CD 54 klassifiziert, und das ICAM-2, die beide zur Immunglobulin-Gensuperfamilie gehören (9). Beide Rezeptoren sind konstitutiv auf der Endothelzelloberfläche vorhanden. Die Expression von ICAM-1 ist jedoch durch Zytokine zu steigern, erfolgt im Unterschied zu den Integri-

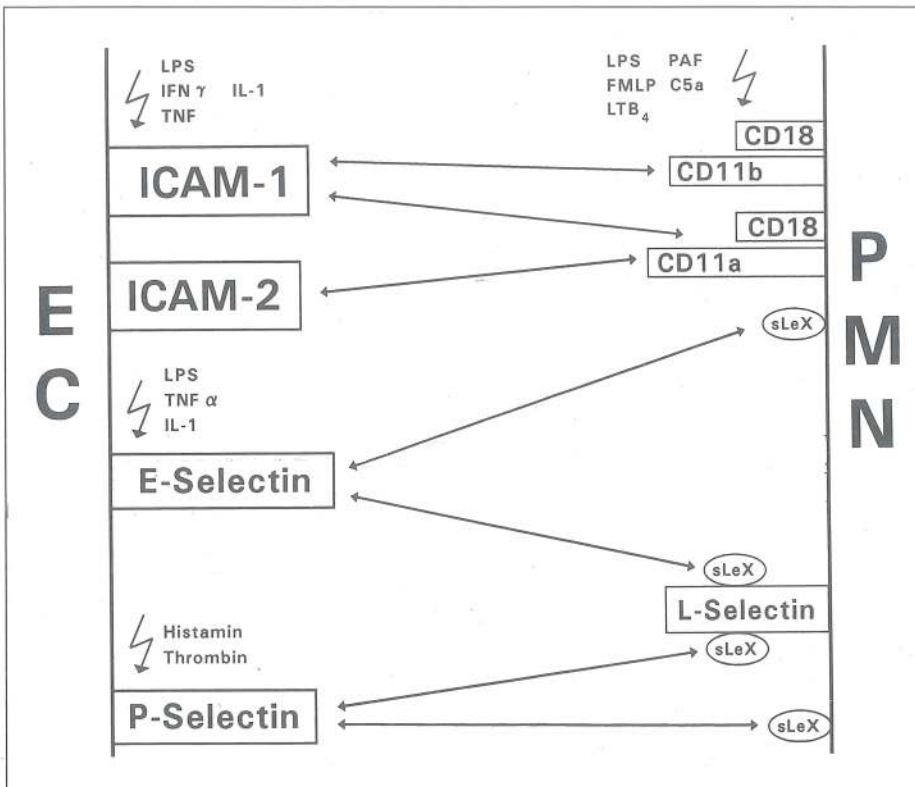


Abb. 3 Das System der interzellulären Adhäsionsproteine. Granulozyten (rechte Bildhälfte) und Endothelzellen (linke Bildhälfte) verfügen über Oberflächenmoleküle aus der Gruppe der Integrine und Selectine (Erläuterung im Text), die paarweise miteinander interagieren und die granulozytär-endotheliale Adhäsion vermitteln. Die Proteine sind entweder konstitutiv in der Zellmembran vorhanden oder aber nach Stimulation mit den angegebenen Agenzien aus intrazellulären Kompartimenten mobilisiert.

nen aber langsamer durch De-novo-Proteinbiosynthese.

Diapedese und Chemotaxis

Der nächste Schritt in der Reaktionssequenz des aktivierten Granulozyten ist die Extravasation. Der komplexe Vorgang des Durchtrittes der mobilen Zellen durch das vaskuläre Endothel wird als Diapedese bezeichnet und verläuft physiologisch nach dem auf der Abbildung 4 skizzierten Schema. Granulozyten adhären bevorzugt in der Nähe der interendothelialen Spalträume. Diese Lokalisierung kommt möglicherweise über eine Clusterung der Adhäsionsproteine an dieser Stelle zustande (10). Granulozytäre Mediatoren induzieren eine lokale endotheliale Retraktion (juxtakrine Aktivierung), an welcher das kontraktile Zytoskelett der Endothelzelle beteiligt ist. In dem geschützten Kompartiment der granulozytär-endo-

thelialen Interaktion sorgt eine lokalisierte Proteasereisetzung für die limitierte Spaltung interendothelialer Matrixkomponenten. Die Richtung des Austrittes wird durch den nach extrazellulär gerichteten Konzentrationsgradienten eines oder mehrerer chemotaktischer Moleküle bestimmt. Diese Faktoren führen zu einer Zellpolarisierung und zu einer Fluiditätszunahme am Zellvorderpol. Nach erfolgtem Granulozytendurchtritt sistiert die endotheliale Retraktion, der interendotheliale Spalt wird wieder abgedichtet, so daß kein Gefäßwanddefekt zurückbleibt.

Molekulare Komponenten des granulozytären Destruktionspotentials

Nach Austritt aus dem Kapillarbett wandert der Granulozyt zielstrebig durch das Interstitium in Richtung der

höchsten Chemotaxinkonzentration, bis er den Ort der Auseinandersetzung zwischen Wirtsgewebe und invasiver Mikrobe erreicht hat. Erleichtert durch markierende Opsonine (Komplementfaktoren, Immunglobuline) identifiziert er die Fremdorganismen und entläßt schließlich sein antimikrobielles Arsenal im Rahmen der Degranulation und der »Burst«-Reaktion.

Ein großer Teil des granulozytären Destruktionspotentials wird durch die Inhaltsstoffe abgeschlossener sekretorischer Kompartimente (Granula) im Zytoplasma der Zellen repräsentiert. Basierend auf ihren biochemischen und morphologischen Unterschieden und der Abfolge ihres Erscheinens während der Zellreifung werden drei Hauptklassen von Granula differenziert. Die Sekretion der verschiedenen Granula kann offenbar unabhängig reguliert werden.

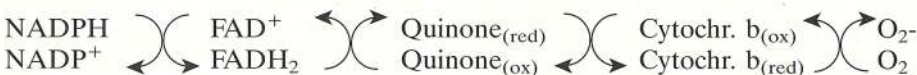
Primäre oder azurophile Granula entstehen zuerst während der Granulozytopoese und werden in erster Linie in das abgeschlossene Kompartiment sich schließender Phagosomen entleert. Sie enthalten u. a. neutrale Proteasen (Elastase, Cathepsin G, Cathepsin D), saure Hydrolasen (β -Glucuronidase, saure Phosphatase, α -Mannosidase, N-Acetyl- β -Glucosaminidase) sowie das Enzym Myeloperoxidase und verschiedene bakterizide kationische Proteine. Neben ihrer Funktion bei der Inaktivierung von phagozytischen Mikroorganismen werden einige dieser Faktoren auch mit der Pathogenese von Gewebeschäden und der Degeneration von Strukturkomponenten der extrazellulären Matrix in Zusammenhang gebracht, die im Rahmen überschießender inflammatorischer Prozesse beobachtet werden (11).

Sekundäre oder spezifische Granula entstehen später im Verlauf der Granulozytopoese und umschließen Inhaltsstoffe, die bei entsprechender Zellaktivierung bevorzugt in den Extrazellulärraum abgegeben werden. Zu ihnen gehören Lysozym, alkalische Phosphatase, Kollagenase, Lactoferrin sowie das Vitamin-B₁₂-bindende Protein (12). Diesen Faktoren wird ein Beitrag zur extrazellulären Bakterizidie gegenüber nicht phagozytischen Keimen zugeschrieben. Die Kolla-

genese ist daneben im Rahmen einer gerichteten Degranulation am Vorderpool der Zelle zur Auflockerung der Bindegewebsfasern nötig, die die interstitielle Motilität chemotaktisch aktivierter Granulozyten behindern. Darüber hinaus sind in der Wand der Granula Rezeptormoleküle für verschiedene chemotaktische Mediatoren enthalten, die im Rahmen der Membranfusion an der Zelloberfläche rekrutiert werden können.

Tertiäre Granula erscheinen gegen Ende der Granulozytopoese und konnten bislang nur oberflächlich charakterisiert werden. Spezifischer Inhalt der tertiären Granula ist die Gelatinase – ein der Kollagenase funktionell ähnliches Enzym (13). In die Wand dieser Membranvesikel ist ein umfangreicher Pool von Glykoproteinen integriert, die im Rahmen einer entsprechenden Degranulationsreaktion durch Fusion mit der Zellmembran an der Oberfläche des Granulozyten in Erscheinung treten. Zu ihnen gehören auch bestimmte Adhärenzmoleküle.

Toxische Sauerstoffspezies: Im Rahmen der Konfrontation mit Bakterien ist eine Zunahme des granulozytären Sauerstoffverbrauches bis um den Faktor 50 des Basalwertes zu erfassen, der von einer Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite begleitet wird (14). Dieses Phänomen beruht auf der Aktivierung der Zellmembran-gebundenen NADPH-Oxidase und dient in erster Linie der Abtötung ingestierter Mikroben. Die NADPH-Oxidase ist ein auf mehreren Ebenen regulierbarer Multienzymkomplex, dessen Aktivität unter dem Einfluß der Kinase C sowie zytoskelettaler Faktoren steht. Sie katalysiert den Transfer eines Elektrons zum Sauerstoff über eine »Mini-Atmungskette«, wobei auf Kosten von NADPH Superoxidanionen generiert werden:



Die primären Produkte dieses sogenannten »respiratorischen Burstes« sind Superoxidanionen und das aus einer nahezu quantitativ ablaufenden spontanen Dismutationsreaktion daraus hervorgehende Hydrogenperoxid (H₂O₂):

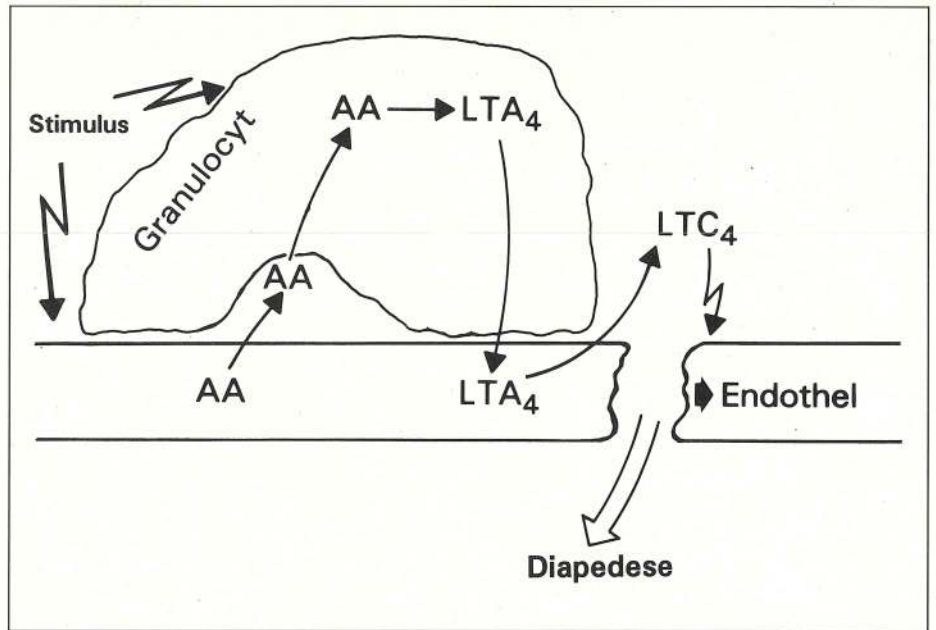
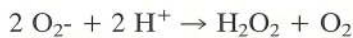
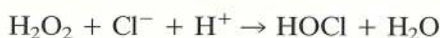


Abb. 4 Schema der kooperativen Leukotriensynthese während der granulozytär-endothelialen Interaktion. Im Rahmen der inflammatorischen Aktivierung wird Arachidonsäure aus den Phospholipidpools der vaskulären Endothelzellen mobilisiert und in den benachbarten Granulozyten transferiert. Dieser setzt das Vorläufermolekül zu dem Leukotrienintermediaten LTA₄ um, aus welchem nach Übertragung in die Endothelzelle durch eine entsprechende enzymatische Ausrüstung das vasoaktive LTC₄ wird. Dieser doppelte Rückkopplungsmechanismus dient dem Granulozyten wahrscheinlich als molekulare Antenne beim Verlassen des Intrasalraumes und vermittelt gleichzeitig eine reversible interendotheliale Spaltbildung für die Diapedese.



Während Superoxidanionen und Hydrogenperoxid selbst nur eine geringe mikrobizide Potenz zeigen, dienen sie als molekulare Vorstufen zur Umwandlung in wesentlich reaktivere Verbindungen. In Gegenwart von Fe³⁺-haltigem Lactoferrin (Inhaltsstoff der sekundären Granula) entsteht das hochtoxische Hydroxylradikal (Haber-Weiss-Reaktion). Weiterhin katalysiert die von den primären Granula abgegebene Myeloperoxidase in Gegenwart von Hydrogenperoxid die Oxidation von Chlorid mit entsprechender Bildung von Hypo-

chlorsäure, einem starken Oxidationsmittel:



HOCl seinerseits kann mit Ammonium oder Aminen reagieren, was zur

Bildung von reaktionsfähigen Chloraminen führt.

Neben ihrer Funktion bei der Inaktivierung von phagozytierbaren Mikroorganismen wird den reaktiven Sauerstoffspezies wie den granulozytären Proteasen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von Gewebeschäden bei entgleisten Entzündungsreaktionen zugeschrieben.

Steuerung des granulozytären Reiz-Antwort-Verhaltens

Das Verhaltensrepertoire des Granulozyten, bestehend aus Adhärenz, Diapedese, Chemotaxis, Phagozytose, Degranulation und respiratorischem Burst, muß in einer koordinierten zeitlichen und räumlichen Sequenz abrufbar sein. Dabei müssen im Dienste einer effektiven Immunantwort die granulozytären Destruktionspotentiale gezielt den infektiösen Organismus erreichen bei gleichzeitiger Minimierung vaskulärer Schäden. Zum

Zwecke dieser Feinabstimmung trägt der Granulozyt auf seiner Oberfläche ein je nach Aktivierungszustand variables Sortiment von Rezeptorstrukturen. Diese sind Bestandteil eines komplexen interzellulären Signalsystems auf der Basis kurzlebiger Mediatormoleküle. Inflammatorische Mediatoren werden sowohl von den Prokaryonten abgesondert (Formylpeptide) als auch aus Plasmabestandteilen freigesetzt (Komplementfaktoren) oder von stimuliertem Wirtsgewebe und anderen Leukozyten synthetisiert (Lipidmediatoren, Interleukine).

Als Mechanismus zur Signaltransduktion in die Zielzelle ist allen Entzündungsmediatoren die von der Rezeptorokkupation induzierte intrazelluläre Entstehung der Second messenger Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃) gemeinsam (15) mit konsekutiver Aktivierung der zellulären Effektorsysteme durch einen Anstieg des zytoplasmatischen Ca²⁺-Spiegels. Eine besondere Stellung innerhalb des Systems der Lipidmediatoren nehmen der Plättchen-aktivierende Faktor (PAF) und die Leukotriene ein, deren Aktivität durch eine extrem kurze Halbwertszeit auf die unmittelbare Umgebung ihrer Freisetzung limitiert bleibt (Lokalmediatoren). Sie wirken sowohl parakrin als Signalmoleküle zwischen eng benachbarten Zellen als auch über autokrine Rückkoppelungsschleifen auf die synthetisierende Zelle zurück.

Die Koordination des inflammatorischen Reiz-Antwort-Verhaltens zwischen adhärennten Granulozyten und dem vaskulären Endothel erfolgt durch den interzellulären Austausch von Leukotrienintermediaten im Rahmen einer transzellulären Synthesekooperation (Abb. 4). Dabei »füttert« die inflammatorisch stimulierte Endothelzelle adhärennte Granulozyten mit dem Substrat der Leukotriensynthese AA (Arachidonsäure) (16). Der aktivierte Granulozyt konvertiert das Vorläufermolekül zu dem Leukotrienintermediaten LTA₄ und transferiert das entstandene Molekül seinerseits zurück in die benachbarte Endothelzelle. Dort wird es schließlich zum vasoaktiven Leukotrien C₄ umgesetzt – eine Syntheseleistung, zu der auf-

grund ihrer komplementären enzymatischen Ausrüstung Granulozyten und Endothelzellen nur kooperativ in der Lage sind (17, 18). Der Mechanismus der interzellulären Mediatorensynthese dient möglicherweise der Feinabstimmung des Reiz-Antwort-Verhaltens während der Kontaktaufnahme zwischen Granulozyten und vaskulärem Endothel im Verlauf von Adhärenz und Diapedese im Sinne einer »molekularen Granulozytenantenne«.

Pathophysiologische Aspekte der granulozytär-endothelialen Interaktion

Die Gefahren einer direkten Interaktion von Granulozyten und Endothelzellen in der mikrovaskulären Strombahn liegen auf der Hand. Ein falsches »Timing« der PMN-Aktivierung an der endothelialen Oberfläche kann gravierende mikrovaskuläre Läsionen induzieren. Dieses pathogenetische Konzept, welches das vaskuläre Gewebe als »innocent bystander« einer überschießenden Granulozytenaktivierung darstellt, ist wahrscheinlich an der Genese unterschiedlicher inflammatorischer Erkrankungen beteiligt. Im folgenden seien beispielhaft einige typische Mechanismen der Fehlsteuerung des granulozytären Destruktionspotentials dargestellt.

Umlenkung des granulozytären Verteidigungspotentials durch bakterielle Toxine (Abb. 5)

Die Extremvariante einer bakteriellen Infektion ist das septische Multiorganversagen. U. a. über eine unkontrollierte Stimulation mikrovaskulär sequestrierter Granulozyten vermögen dabei systemisch eingeschwemmte bakterielle Toxinmoleküle eine schwere Kapillarschädigung zu induzieren (19). Die klinische Konsequenz ist ein Zusammenbruch der Vasoregulation und der kapillären Schrankenfunktion mit systemischer Hypotonie, interstitieller Ödembildung (kapilläres »Leakage«) und einer konsekutiven Beeinträchtigung verschiedener Organfunktionen (akute

respiratorische Insuffizienz, ARDS; akutes Nierenversagen etc.).

Die pathogenetische Sequenz wird eingeleitet durch die intravasale Konfrontation der Leukozyten mit bakteriellen Endotoxinmolekülen (20). Die Interaktion mit spezifischen zytoplasmatischen Rezeptormolekülen führt zu einer Zunahme der granulozytär-endothelialen Affinität, vermittelt über eine Abnahme der Zellflexibilität und eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen. Der mikrovaskuläre Sequestrationspool wird auf diese Weise rasch expandiert und das Destruktionspotential der Leukozyten gleichzeitig durch einen sogenannten »Priming-Effekt« des Endotoxins hochreguliert (21).

Im zweiten Schritt können bakterielle Exotoxine eine diffuse Gefäßschädigung auslösen, indem sie die inflammatorische Aktivierung der intravasalen Granulozyten triggern. Exotoxine werden insbesondere von hochpathogenen Keimen wie hämolyisierenden *E. coli*, Streptokokken, Staphylokokken, Pseudomonaden und Listerien gebildet. Der Wirkmechanismus dieser Faktoren beruht darauf, die motilen Granulozytenfunktionen wie Diapedese, Chemotaxis und Phagozytose zu paralisieren und gleichzeitig das granulozytäre Destruktionspotential zu entkoppeln (22, 23).

Degranulation und »Burstreaktion« erfolgen also noch vor der Extravasation der Leukozyten in unmittelbarer Nähe des vaskulären Endothels, wobei die unkontrollierte Freisetzung granulozytärer Proteasen und Entzündungsmediatoren eine wesentliche Rolle bei der resultierenden Kapillarschädigung spielt (21). Die völlige Erschöpfung des funktionellen Repertoires der Granulozyten erfolgt dabei in sicherer Entfernung von der Toxinsezernierenden Mikrobe und wird gegen das Endothel – den »innocent bystander« dieser Reaktion – umgeleitet.

Der molekulare Wirkmechanismus der Exotoxinmoleküle beruht auf dem sogenannten Porenkonzept (24): Nach Insertion des Toxinmoleküls kommt es zur Ausbildung einer transmembranösen Pore, welche den passiven Influx von Ca²⁺-Ionen entlang dem ins

Zellinnere gerichteten Konzentrationsgradienten erlaubt. Unter Umgehung der mediatorgesteuerten physiologischen Kanal- und Second-messenger-Systeme kommt es zu einer Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger granulozytärer Effektorsysteme, einschließlich der Degranulationsreaktion und der Bildung von toxischen Sauerstoffradikalen an der Zelloberfläche.

Intravasale Granulozytenaktivierung durch Antigranulozyten-Antikörper

Ein Krankheitsbild, das heute selten geworden ist, aber aufgrund seines Modellcharakters hier erwähnt werden soll, ist das »Transfusions-assoziierte Lungenversagen« (TRALI). Es handelt sich um einen ernsten Transfusionszwischenfall, bei dem mit dem Spenderblut ein Antigranulozyten-Antikörper gegen Oberflächenepitope der Empfängergranulozyten übertragen wird. Nach Bindung der Antikörper an das granulozytäre Oberflächenantigen (meist gegen das 5b-Epitop gerichtet) kommt es zu einer lokalen Komplementaktivierung mit Insertion des terminalen Komplementkomplexes C5b-9 in der Zellmembran. Analog zum Mechanismus der porenbildenden bakteriellen Exotoxine erfolgt durch die entstandene Pore ein transmembranöser Ca^{2+} -Influx mit konsekutiver Aktivierung der zellulären Effektorsysteme.

Auch hier werden die physiologischen Steuerungssysteme kurzgeschlossen, und es resultiert eine generalisierte intravaskuläre Granulozytenaktivierung (25). Dies hat insbesondere für die pulmonale Zirkulation akute Konsequenzen, da sich hier ein besonders ausgeprägter marginaler Granulozytenpool in direktem Kontakt mit dem vaskulären Endothel befindet. Als Ausdruck der diffusen Kapillarschädigung kommt es innerhalb weniger Stunden zu einer pulmonalen Schrankenstörung mit interstitieller Ödembildung und einer Beeinträchtigung des Gasaustausches. Dieses Krankheitsbild tritt in seltenen Fällen nach Übertragung von plasmahaltigen Blutbestandteilen auf (Kombination von 5b-positivem Emp-

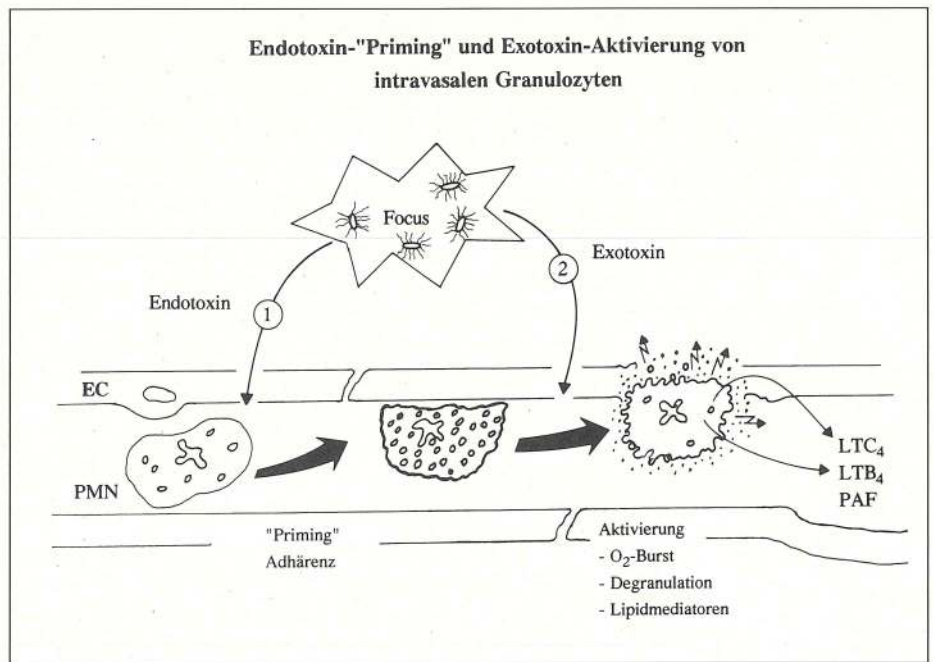


Abb. 5 Umleitung des granulozytären Destruktionspotentials gegen das vaskuläre Endothel durch bakterielle Toxine. In die Zirkulation eingeschwemmtes Endotoxin führt zunächst zu einer granulozytär-endothelialen Kontaktaufnahme und zu einer Aufrüstung des antimikrobiellen Potentials (symbolisiert durch die Vermehrung der zytoplasmatischen Granula). Bei Kontakt mit den ersten Exotoxinmolekülen wird der Granulozyt zunächst paralytisiert und somit an der Diapedese und chemotaktischen Aufspürung des Infektionsherdes gehindert. Im nächsten Schritt wird das granulozytäre Destruktionspotential in Form einer Degranulations- und »Burst«-Reaktion gegen das vaskuläre Gewebe umgeleitet mit entsprechender Kapillarschädigung. Die bei dieser Reaktion entstehenden vasoaktiven Lokalmediatoren führen darüber hinaus zu Zirkulationsstörungen stromabwärts.

fänger und 5b-negativer Spenderin sensibilisiert durch mindestens eine 5b-positiv Schwangerschaft). Das TRALI wird insbesondere bei Massentransfusion leicht mit einem kardiogenen Lungenödem durch Übertransfusion verwechselt. Es ist nach Verbrauch der transfundierten Antikörper innerhalb von 1–2 Tagen reversibel.

Im Gegensatz zur limitierten Zufuhr eines exogenen Granulozytenantikörpers muß die fortgesetzte endogene Bildung eines Autoantikörpers gegen körpereigene Granulozyten potentiell zu einem zeitlich protrahierten Krankheitsbild führen. In diesem Zusammenhang wurden anti-granulozytäre Antikörper u. a. bei der Wegenerschen Granulomatose, der rapid progredienten Glomerulonephritis und der Colitis ulcerosa nachgewiesen. Allerdings konnte bislang nur für die Entstehung der nekrotisierenden Vaskulitis bei der Wegenerschen Granulomatose eine pathogenetische Relevanz der Antikörper-

induzierten Aktivierung endotheladhärenter Granulozyten wahrscheinlich gemacht werden.

Frustrane Phagozytose von vaskulär/perivaskulär abgelagerten Immunkomplexen

Ein anderer Pathomechanismus, der zu einer unkontrollierten Aktivierung granulozytärer Entzündungsreaktionen in der Nähe des Endothels führt, liegt der Gruppe der Immunkomplexvaskulitiden zugrunde. Die Fehlsteuerung des leukozytären Destruktionspotentials wird hier durch die Entstehung von unlöslichen Antigen-Antikörper-Komplexen in der Zirkulation ausgelöst, welche aufgrund ihrer Größe und/oder ihrer molekularen Zusammensetzung (pathologische oder quervernetzte Immunglobuline) oder aber ihrer Masse der phagozytären Clearance entgehen. Die entstandenen Aggregate lagern sich in zahlreichen Mikrozirkulations-

gebieten ab. Es kommt vor Ort zu einer Komplementaktivierung und damit zur chemotaktischen Rekrutierung und Aktivierung von zirkulierenden Granulozyten. Diese unternehmen intra- oder perivaskulär den frustrierten Versuch einer Phagozytose. Dabei kommt es wahrscheinlich durch die Liberation von granulozytären Inhaltsstoffen zu einer Beschädigung der Kapillarwand.

Ein Mikrozirkulationsgebiet, in dem sich unlösliche Immunkomplexe bevorzugt ablagern, sind die glomerulären Kapillaren der Niere. Eine Modellerkrankung, die repräsentativ für Vaskulitiden anderer Genese steht, ist die endokapilläre Glomerulonephritis. Nach einem vorangegangenen Infekt mit betahämolyisierenden Streptokokken kommt es im klassischen Fall zu einer parainfektösen hyperergen Reaktion mit Ablagerung von Immunkomplexen in der renalen Mikrozirkulation. Als Konsequenz der glomerulären Granulozytenaktivierung resultiert eine Beschädigung des vaskulären Endothels und ein Defekt der subendothelialen Basalmembran. Die vaskulär/granulozytäre Entzündungsreaktion gipfelt in einer Beeinträchtigung der glomerulären Filterfunktion – Proteinurie und Hämaturie sind die Leitsymptome der resultierenden Glomerulonephritis.

Eine generalisierte Vaskulitis kann auch iatrogen durch die anhaltende intravaskuläre Zufuhr eines Allergens (etwa im Rahmen einer Infusionstherapie mit einem Antibiotikum, gegen welches der Patient sensibilisiert ist) ausgelöst werden. Die Zirkulation wird dabei bis zum Absetzen der Allergenzufuhr durch unphysiologische Massen von Immunkomplexen überschwemmt. Das pathohistologische Substrat der anhaltenden intra/perivaskulären Granulozytenaktivierung ist die leukoklastische Vaskulitis, welche zu einer schweren Beeinträchtigung verschiedener Organfunktionen führen kann.

Fehlsteuerung der Granulozyten durch Defekte des endogenen Signalsystems

Eine inadäquate Entzündungsreaktion mit Kapillar- und Gewebeschädi-

gung durch entkoppelte Granulozyten liegt auch der Pathogenese der Psoriasis vulgaris zugrunde. Aus ungeklärtem Anlaß – ohne einen mikrobiellen Auslöser – sezernieren die Epidermiszellen dieser Patienten u. a. große Mengen des Chemotaxins Leukotrien B₄ (26). Die Folge ist eine ausgeprägte Rekrutierung von Granulozyten in der Mikrozirkulation der Epidermis und eine massive perivaskuläre Infiltration sowie die Bildung von granulozytären Mikroabszessen unter dem Stratum corneum.

Aktivierung endotheladhärenter Granulozyten beim Reperfusionssyndrom

Die Reperfusion eines zeitweise von der Durchblutung abgeschnittenen Gewebeareals ist bekanntlich begleitet von einer diffusen Kapillarschädigung in der betroffenen Strombahn mit konsekutiver Beeinträchtigung der Organfunktion. Dieses sogenannte Reperfusionssyndrom hat große klinische Bedeutung, da akute und chronische Gefäßverschlüsse heute in zunehmendem Umfang durch perkutane transluminale Angioplastie, chirurgische Techniken der Desobliteration oder fibrinolytische Maßnahmen behandelt werden. Insbesondere die Organzirkulationen von Gehirn, Lunge, Darm und Herz reagieren nach erfolgreicher Wiedereröffnung eines okklusiven Strömungshindernisses mit einer schweren inflammatorischen Endothel- und Gefäßwandreaktion. An dieser Reperfusionsvaskulitis sind aktivierte endotheladhärente Granulozyten zentral beteiligt.

Die überschießende intravaskuläre Granulozytenreaktion beruht auf einer vermehrten Expression von Adhäsionsproteinen auf dem ischämischen Endothel (27). Nach erfolgter Desobliteration kommt es zu einer sofortigen Rekrutierung der einströmenden Entzündungszellen. Auslösender Faktor für die gegen das vaskuläre Endothel gerichtete Autoaggression ist wahrscheinlich die rasche Ausschwemmung der extrazellulären Gewebeazidose in der postischämischen Phase. Hierdurch werden membranständige Protonenpumpen sowohl in

den adhärennten Granulozyten als auch in den betroffenen Endothelzellen aktiviert, um für einen Ausgleich des transmembranösen Gradienten zu sorgen. Die aktivierten Protonenpumpen sind ihrerseits an den Na⁺/Ca²⁺-Exchanger gekoppelt, durch dessen Stimulation ein Anstieg des zytoplasmatischen Ca²⁺-Spiegels erfolgt. Die Konsequenz ist eine Aktivierung der Ca²⁺-abhängigen granulozytär-endothelialen Effektorsysteme, einschließlich der Freisetzung toxischer Sauerstoffspezies und proteolytischer Enzyme in der Gefäßwand.

Zusammenfassend zeigen diese Beispiele, daß das in den zirkulierenden und mikrovaskulär sequestrierten Granulozyten ruhende antimikrobielle Verteidigungsarsenal unter verschiedenen Bedingungen gegen die Gefäßwand fehlgeleitet werden kann. Das vaskuläre Endothel kann dabei sowohl als »innocent bystander« Opfer einer entkoppelten inflammatorischen Granulozytenreaktion sein oder aber über die inadäquate Expression von interzellulären Adhäsionsproteinen selbstverschuldet das granulozytäre Destruktionspotential auf sich lenken. Erste experimentelle und klinische Befunde lassen vermuten, daß mit Hilfe pharmakologischer Modulatoren der Granulozytenflexibilität und mit selektiven Antagonisten der interzellulären Adhäsionsmoleküle die mikrovaskuläre Granulozytensequestration wirksam unterdrückt werden kann. Diese Ansätze bieten die Perspektive, die granulozytär-endotheliale Interaktion unter den oben dargestellten pathologischen Bedingungen therapeutisch zu beeinflussen.

LITERATUR

1. Hogg JC, Doerschuk CM, Wiggs B, Minshall D. Erythrocyte transit and neutrophil concentration in the dog lung. *J Appl Physiol* 1988; 65: 1217–25.
2. Lien DC, Worthen GS, Capen RL, Hanson WL, Checkley LL, Janke SJ, Henson PM, Wagner WW. Neutrophil kinetics in the pulmonary microcirculation. Effects of pressure and flow in the dependent lung. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 953–9.
3. Hogg JC. Neutrophil kinetics and lung injury. *Physiol Rev* 1987; 67: 1249–95.
4. Worthen GS, Schwab BS, Elson EL, Downey GP. Mechanics in stimulated neutrophils: Cell stiffening induces retention in capillaries. *Science* 1989; 245: 183–6.

5. Grimminger F, Sibelius U, Aktories K, Just I, Seeger W. Suppression of cytoskeletal rearrangement in activated human neutrophils by Botulinum C₂ toxin – impact on cellular signal transduction. *J Biol Chem* 1991; 266 (22): 14262–9.
6. Hynes RO. Integrins, a family of cell surface receptors. *Cell* 1987; 48: 549–55.
7. Rosen SD. The LEC-CAMS: An emerging family of cell-cell adhesion receptors based upon carbohydrate. *Am Rev Respir Cell Mol Biol* 1990; 3: 397–402.
8. Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC. Neutrophil MAC-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 1989; 245: 1238–41.
9. Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD, Springer TA. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol* 1986; 137: 1270–4.
10. Wright SD, Detmers PA. Adhesion-promoting receptors on phagocytes. *J Cell Sci Suppl* 1988; 9: 99–120.
11. Carrell RW. α_1 -Antitrypsin: molecular pathology, leukocytes, and tissue damage. *J Clin Invest* 1986; 78: 1427–31.
12. Bretz U, Baggiolini M. Biochemical and morphological characterization of azurophil and specific granules of human neutrophil polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol* 1974; 63: 251–6.
13. Petrequin PR, Todd III RF, Devall LJ, Boxer LA, Curnutte III JT. Association between gelatinase release and increased plasma membrane expression of the Mol glycoprotein. *Blood* 1987; 69: 605–11.
14. Weiss SJ, LoBuglio AF. Biology of disease. Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest* 1982; 47: 5–10.
15. Sandborg RR, Smolen JE. Biology of disease. Early biochemical events in leukocyte activation. *Lab Invest* 1988; 59: 300–10.
16. Grimminger F, Kreuzler B, Schneider U, Becker G, Seeger W. Influence of microvascular adherence on neutrophil leukotriene generation – evidence for cooperative eicosanoid synthesis. *J Immunol* 1990; 144: 1866–72.
17. Grimminger F, Menger M, Becker G, Seeger W. Potentiation of leukotriene generation following sequestration of neutrophils in isolated lungs. *Blood* 1988; 72: 1687–92.
18. Grimminger F, Becker G, Seeger W. High yield enzymatic conversion of intravascular leukotriene A₄ in blood-free perfused lungs. *J Immunol* 1988; 141: 2431–6.
19. Seeger W, Lasch HG. Septic lung. *Rev Infect Dis* 1987; 9: S570–S579.
20. Brigham KL, Meyrick B. Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133: 913–27.
21. Walrath D, Grimminger F, Seeger W. Sepsis und ARDS. Mögliche Rolle bakterieller Exotoxine. *Med Welt* 1993; 44: 23.
22. Grimminger F, Scholz C, Bhakdi S, Seeger W. Subhemolytic doses of *Escherichia coli* hemolysin evoke large quantities of 4- and 5-series leukotrienes in human neutrophils in dependence on exogenous fatty acid supply. *J Biol Chem* 1991; 266: 14262–9.
23. Grimminger F, Thomas M, Obernitz R, Walrath D, Bhakdi S, Seeger W. Inflammatory lipid mediator generation elicited by viable hemolysin-forming *Escherichia coli* in lung vasculature. *J Exp Med* 1990; 172: 1115–25.
24. Bhakdi S, Tranum-Jensen J. Damage to mammalian cells by proteins that form transmembrane pores. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1987; 107: 147–223.
25. Seeger W, Schneider U, Kreuzler B, v. Witzleben E, Walrath D, Grimminger F, Neppert J. Reproduction of transfusion related acute lung injury (TRALI) in an ex vivo lung model. *Blood* 1990; 76: 1438–44.
26. Brain SD, Camp RDR, Dowd PM. Psoriasis and leukotriene B₄. *Lancet* 1982; II: 762–3.
27. Adkins WK, Taylor AE. Role of xanthine oxidase and neutrophils in ischemia-reperfusion injury in rabbit lung. *J Appl Physiol* 1990; 69: 2012–8.

Korrespondenzadresse:
 Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer. nat.
 Friedrich Grimminger
 Zentrum für Innere Medizin der JLU Gießen
 Klinikstraße 36
 D-35385 Gießen