

# Die Freisetzung von Proteinasen aus Neutrophilen Leukozyten und Makrophagen

Autor(en): **Baggiolini, Marco**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie Suisse des Sciences Medicales = Bollettino dell' Accademia Svizzera delle Scienze Mediche**

Band (Jahr): **35 (1979)**

PDF erstellt am: **23.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-309095>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Präklinische Forschung, Sandoz AG, CH-4002 Basel

## DIE FREISETZUNG VON PROTEINASEN AUS NEUTROPHILEN LEUKOZYTEN UND MAKROPHAGEN

MARCO BAGGIOLINI

### Zusammenfassung

Die Hauptquellen der Proteinase, die im Verlaufe einer entzündlichen Reaktion Gewebsstrukturen zerstören, sind die neutrophilen Leukozyten und die Makrophagen. Beide Zellen enthalten und/oder bilden eine grosse Zahl von sauren und neutralen Hydrolasen einschliesslich Vertreter aller vier Klassen von Gewebsproteinase. Die Neutrophilen sind kurzlebige Endzellen mit grossen Enzymspeichern (den azurophilen und spezifischen Granula), die sie in der Regel im Verlaufe der Phagozytose entleeren. Makrophagen sind langlebige Zellen mit einem ausgesprochenen Potential für funktionelle Differenzierung. In den Makrophagen werden Proteinase und andere lytische Enzyme durch Phagozytose oder durch Sekretion freigesetzt (letzteres vor allem bei aktivierten Makrophagen) und durch kontinuierliche Proteinsynthese erneuert.

Die sauren und neutralen Proteinase der Neutrophilen und Makrophagen, ihre subzelluläre Lokalisierung, ihre Eigenschaft in bezug auf Gewebszerstörung und die Mechanismen ihrer Freisetzung werden beschrieben.

### Abstract

The main source of proteinases that degrade tissue components in the course of inflammation are neutrophil leukocytes and macrophages. Both cells contain and/or produce a large variety of acid and neutral hydrolases including representatives of all four classes of tissue proteinases. Neutrophils are short-lived end cells with large enzyme stores (i.e. azurophil and specific granules) which they normally discharge in the course of phagocytosis. Macrophages are long-lived cells with a great potential for functional differentiation. In macrophages, proteinases and other lytic enzymes are released both by phagocytosis and by secretion (the latter particularly in activated macrophages) and replaced continuously by de novo synthesis.

The acid and neutral proteinases of neutrophils and macrophages, their subcellular localization, their properties in relation to tissue damage and the mechanisms of their release are described.

### Die Zellen

Neutrophile Leukozyten und Makrophagen sind die Hauptquellen der Enzyme, die im Verlaufe eines entzündlichen Prozesses extrazelluläres Material verdauen und Bindegewebsstrukturen zerstören. Beide Zellen haben eine ähnliche Ausstattung an sauren und neutralen Hydrolasen und bei beiden ist die Phagozytose die Hauptfunktion.

Die neutralen Leukozyten werden im Knochenmark gebildet. Während ihrer Reifung, die beim Menschen zwei Wochen dauert und damit bei weitem die längste Lebensphase dieser Zellen darstellt, entstehen aus pluripotenten Stammzellen kurzlebige und hochspezialisierte Phagozyten. Der Reifungsprozess ist durch die sequentielle Bildung von zwei Typen von Granula charakterisiert. Die azurophilen Granula werden zuerst, während des Promyelozytstadiums, und die spezifischen Granula etwas später, während des darauffolgenden Myelozytstadiums, gebildet (BAINTON et al., 1971). Mit diesen beiden Phasen ist die Bildung der Enzymspeicher abgeschlossen. Dies hat zur Folge, dass die reifen Neutrophilen freigesetzte Enzyme nicht ersetzen können. Die Ultrastruktur der reifen Zelle ist in Abbildung 1 illustriert. Die Granula sind ihre wichtigsten zytoplasmatischen Organellen. Durch die zytochemische Darstellung des Peroxydase, die ausschliesslich in den azurophilen Granula vorkommt, lassen sich beide Granulapopulationen leicht unterscheiden. Zusätzlich sind einzelne Mitochondrien, Membranen, die zusammen mit der perinukleären Zysterne zum glatten endoplasmatischen Retikulum gehören, und einen kleinen, wahrscheinlich ruhenden Golgi-Apparat zu erkennen. Infolge der präparativen Technik ist in diesem Bild das zytoplasmatische Glykogen nicht erkennbar, das die Hauptenergiequelle der Neutrophilen darstellt.

Die biochemische Charakterisierung der azurophilen und spezifischen Granula war einer der wesentlichen Schritte zum Verständnis der pathophysiologischen Beteiligung der neutrophilen Leukozyten an den destruktiven Prozessen der Entzündung. Beide Granula wurden durch subzelluläre Fraktionierung aus den heterophilen Leukozyten des Kaninchens (BAGGIOLINI et al., 1969; 1970a; 1970b) sowie aus menschlichen Neutrophilen isoliert (BRETZ und BAGGIOLINI 1974; SPITZNAGEL et al., 1974). In beiden Spezies sind die azurophilen Granula grösser und dichter als die spezifischen und können daher sowohl durch differentielle Sedimentation als auch durch Dichteäquilibrierung getrennt werden (BAGGIOLINI et al., 1974). Die erwähnten Arbeiten und die nachfolgenden Studien zur subzellulären Lokalisation der neutralen Proteinase (DEWALD et al., 1975; MURPHY et al., 1977) haben ein umfassendes Bild der Granulazusammen-

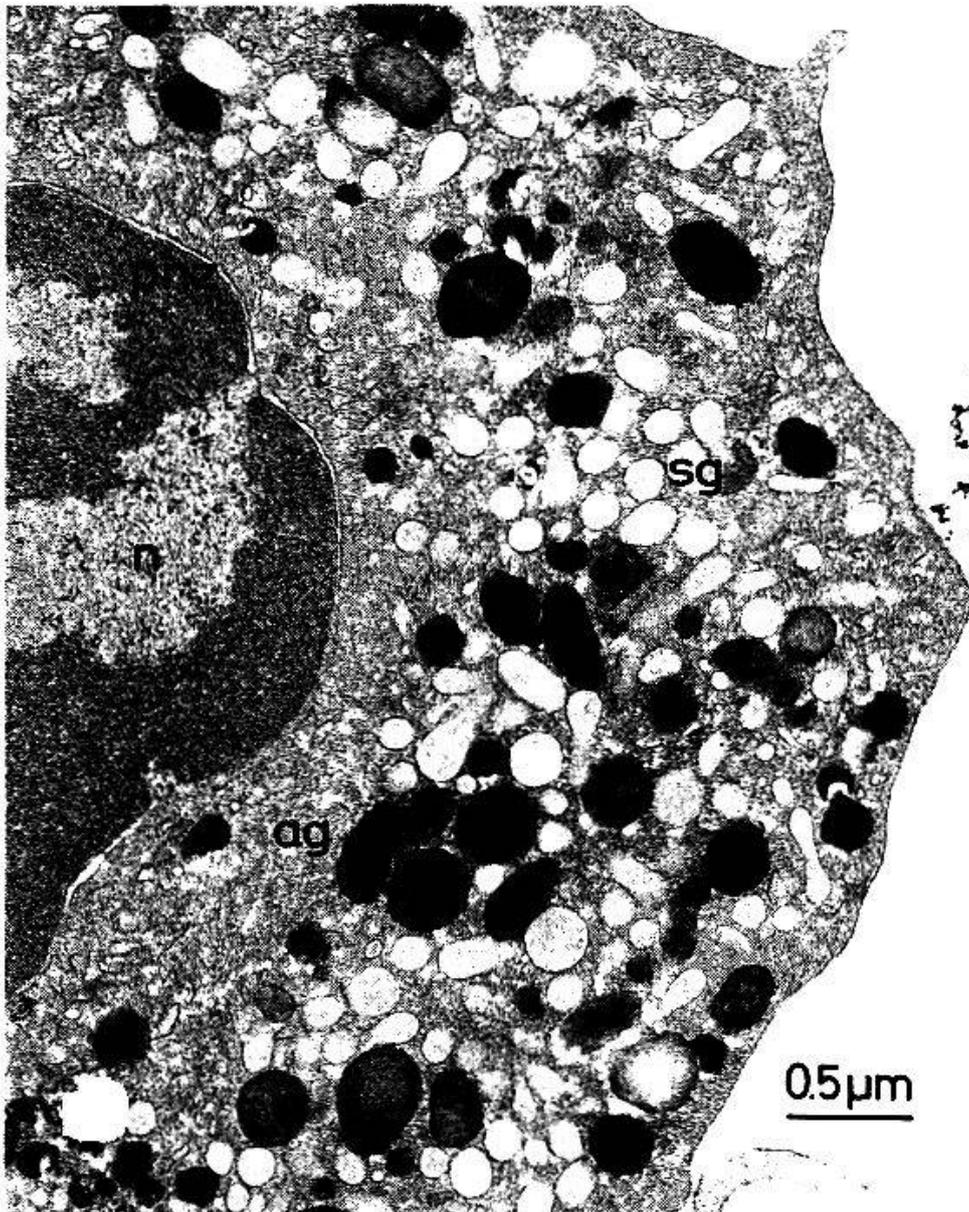


Abb. 1. Elektronenoptische Teilansicht eines neutrophilen Leukozyten aus menschlichem Blut mit zytochemischem Peroxydase-nachweis. Die peroxydase-positive azurophilen Granula und die negativen spezifischen Granula (ag und sg) sind im ganzen Zytoplasma verteilt. Kern (n) mit perinukleärer Zyste (pnz).

setzung ergeben und damit genaue Vorstellungen über die Enzyme vermittelt, die in die phagozytischen Vakuolen und in den extrazellulären Raum freigesetzt werden. Diese Enzyme und einige nicht-enzymatische Komponenten der Granula sind in Tabelle 1 angegeben. In quantitativer Hinsicht sind die Serinproteinasen, die Myeloperoxydase und das Lysozym am wichtigsten (Abb. 2).

Die Makrophagen sind langlebige Phagozyten. Sie stammen aus den Blutmonozyten und kommen in den Geweben und in den Körperhöhlen als freie oder sessile Zellen vor (VAN

Tabelle 1. Komponenten der azurophilen und spezifischen Granula von menschlichen neutrophilen Leukozyten

|                      | Azurophile Granula   | Spezifische Granula                                  |
|----------------------|--|--|
| Saure Hydrolasen     | $\beta$ -Glycerophosphatase<br>N-Acetyl- $\beta$ -glykosaminidase<br>$\beta$ -Glukuronidase<br>$\alpha$ -Mannosidase<br>Kathepsin B<br>Kathepsin D | keine  |
| Neutrale Proteinasen | Elastase<br>Kathepsin G<br>Proteinase 3  | Kollagenase  |
| Mikrobizide Enzyme   | Myeloperoxidase<br>Lysozym   | Lysozym  |
| Andere               |  | Laktoferrin<br>Vit B <sub>12</sub> bindende Proteine |

FURTH et al., 1975). Im Vergleich zu den neutrophilen Leukozyten weisen die Makrophagen relativ kleine, morphologisch unauffällige Enzymspeicher auf. Sie haben jedoch die Möglichkeit, ihre Exportenzyme kontinuierlich zu synthetisieren. Es ist erst in den letzten Jahren gezeigt worden, dass die Makrophagen ausgesprochene sekretorische Eigenschaften besitzen, die unabhängig von ihren wohlbekannten endozytischen Funktionen zum Ausdruck kommen. Menschliche Makrophagen sind experimentell schwer zugänglich. Es liegen Arbeiten über Blutmonozyten und Knochenmarkmakrophagen vor (GORDON et al., 1974; MEERPOHL et al., 1976), aber die Erfahrungen mit diesen Zellen sind noch begrenzt. Das klassische Modell ist der peritoneale Makrophag der Maus. In meinen Ausführungen werde ich mich auf die Pathophysiologie dieser Zelle begrenzen. Mausmakrophagen werden durch Auswaschen des Peritonealraumes mit physiologischer Kochsalzlösung oder mit Kulturmedium gewonnen. Makrophagen haften leicht an den Kulturgefäßen und können von anderen, weniger zum Haften neigenden Zellen getrennt werden. Die haftenden Zellen lassen sich ohne Probleme während mehrerer Wochen in Kultur halten, was das experimentelle Studium ihrer Physiologie erleichtert (SCHNYDER und BAGGIOLINI, 1978a). Abbildung 3 zeigt die wesentlichen strukturellen Merkmale der Mausmakrophagen. Der grosse Golgi-Apparat, das stark entwickelte rauhe endoplasmatische Retikulum und die zahlreichen Mitochondrien verleihen den Eindruck einer in synthetischer und metabolischer Hinsicht hochaktiven Zelle.

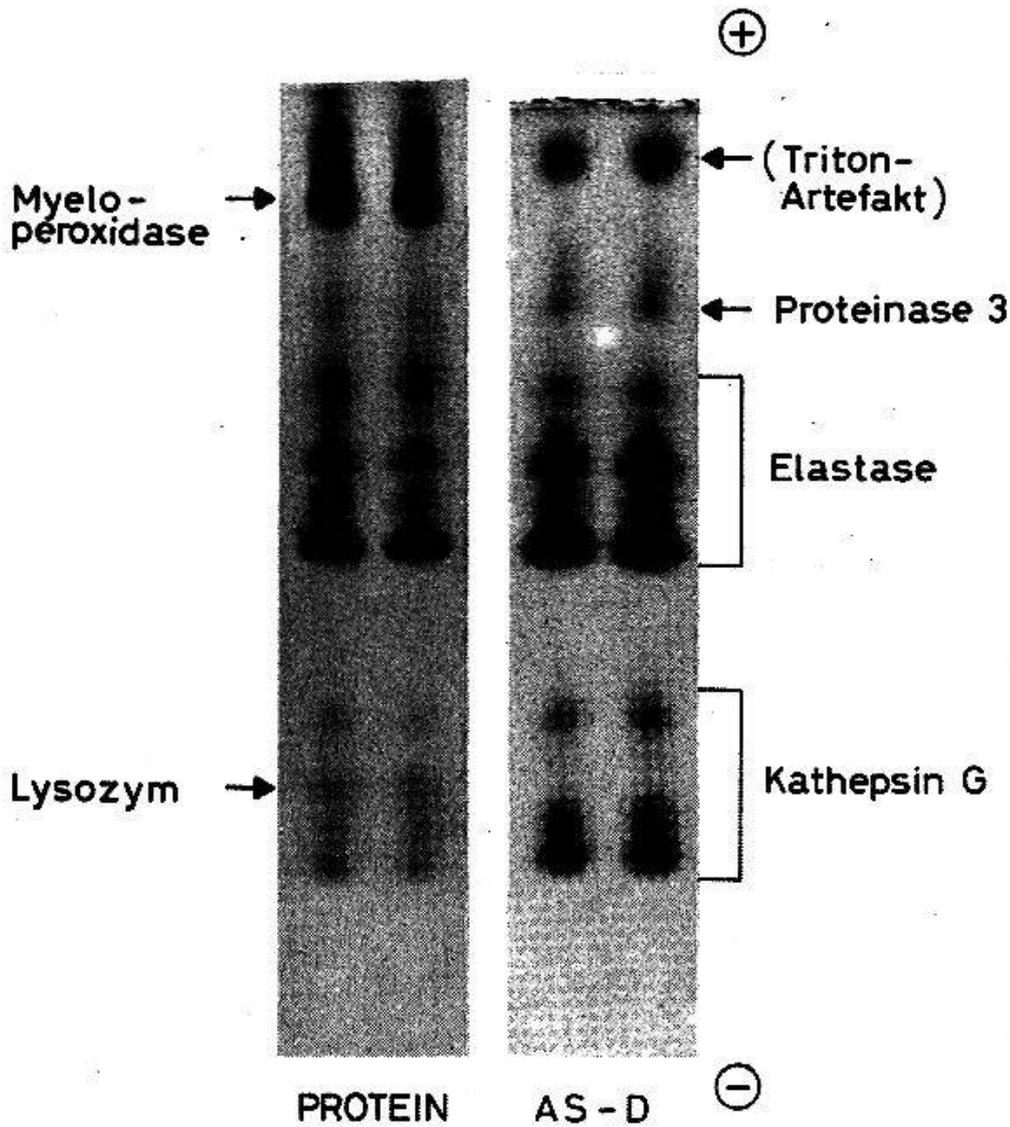


Abb. 2. Elektrophoretische Analyse eines Extraktes aus gereinigten azurophilen Granula aus menschlichen neutrophilen Leukozyten. Gel-elektrophorese in 20-prozentigem Polyacrylamid bei pH 4.3. Nachweis der Proteine mit Coomassie Brilliant Blue und Nachweis der neutralen Proteinase mit Naphthol AS-D-Azetat als Substrat (DEWALD et al., 1975). Werden die Extrakte, wie in diesem Fall, in Anwesenheit von Triton-X-100 hergestellt, so entsteht im Zymogramm eine zusätzliche Bande.

### Die gewebserstörenden Enzyme

Als Proteine sind die wichtigsten strukturellen Makromoleküle des Bindegewebes wie Proteoglykane, Kollagen und Elastin natürliche Proteinasesubstrate. Gewebserstörung ist daher im wesentlichen als die Folge der Freisetzung von Proteinase anzusehen. Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, sind alle vier Klassen von Gewebseproteinase in den Neutrophilen und den Makrophagen vertreten. Wichtige Eigenschaften dieser Enzyme und ihre möglichen pathophysiologischen Auswirkungen sind in der Folge dargestellt.



Abb. 3. Elektronenoptische Teilansicht eines Mausemakrophagen aus der Peritonealhöhle nach siebentägiger Kultur. Oben: Perinukleäre Region mit Golgi-Apparat (Ga) bestehend aus mehreren Gruppen von Zysternen (Gz). Unten: Zytoplasmatische Region reich an rauhem endoplasmatischem Retikulum (rer) und Mitochondrien (m). Phagozytische Vakuole (pv); Kern (n) mit perinukleärer Zyste (pnz).

Serinproteinasen sind die wichtigsten Komponenten der azurophilen Granula der neutrophilen Leukozyten (vgl. Abb. 2). Aufgrund der katalytischen Eigenschaften gegenüber synthetischen Substraten unterscheidet man Elastase, Kathepsin G und ein drittes Enzym, die Proteinase 3 (DEWALD et al., 1975; BAGGIOLINI et al., 1978). Ein weiteres Serinenzym, Plasminogenaktivator, wurde kürzlich an menschlichen Neutrophilen von GRANELLI-PIPERNO et al. (1977) beschrieben. Im Gegensatz zu den anderen ist diese Proteinase nicht in den azurophilen

Tabelle 2. Phagozytenproteinasen

| Typ<br>E.C.                   | Menschliche<br>Neutrophile                                      | Maus-<br>Makrophagen                     |
|-------------------------------|---|--|
| Serinproteinasen<br>3.4.21    | Elastase<br>Kathepsin G<br>Proteinase 3<br>Plasminogenaktivator | Elastase<br><br><br>Plasminogenaktivator |
| Thiolproteinasen<br>3.4.22    | Kathepsin B   | Kathepsin B                              |
| Karboxylproteinasen<br>3.4.23 | Kathepsin D   | Kathepsin D                              |
| Metalloproteinasen<br>3.4.24  | Kollagenase   | Kollagenase                              |

Granula sondern in kleineren, noch nicht charakterisierten Organellen lokalisiert (BRETZ, 1978), die anscheinend durch Sekretion entleert werden (GRANELLI-PIPERNO et al., 1977). Plasminogenaktivator kommt auch in Makrophagen vor. Er wird von aktivierten Makrophagen in grosser Menge sezerniert (UNKELESS et al., 1974). Aktivierte Makrophagen produzieren zusätzlich Elastase (WERB und GORDON, 1975b). Die beiden Serinenzyme der Makrophagen werden nicht intrazellulär gespeichert. Ihre Sekretion ist kontinuierlich und von fortlaufender Neusynthese abhängig.

Wegen ihrer Verfügbarkeit in grosser Menge und ihrer geringen Substratspezifität ist die Elastase der Neutrophilen ein mögliches Schlüsselenzym der entzündlichen Gewebszerstörung. Viele lösliche und strukturelle Proteine sind als ihr Substrat beschrieben worden (HAVEMAN und JANOFF, 1978). Barrett und Mitarbeiter (STARKEY et al., 1977; BARRETT, 1978) haben die Wirkung von gereinigter neutrophiler Elastase und Kathepsin G auf Knorpelfragmente untersucht und dadurch eine eindrucksvolle Darstellung der Prozesse gegeben, die sich bei der entzündlichen Zerstörung von Gelenkknorpeln, Basalmembranen und ähnlichen Strukturen abspielen können. Das Proteingerüst der Proteoglykane ist ein recht empfindliches Substrat. Bereits bei niedrigen Enzymkonzentrationen sind Peptidoglykanbruchstücke im Medium nachzuweisen, und der Abbauprozess lässt sich bis zur vollständigen Extraktion des Proteoglykanmaterials aus dem Knorpel fortführen. Beide Enzyme, aber besonders die Elastase, wirken auch auf das Kollagen. Sie hydrolysieren die nicht-helikalen, N-terminalen Peptide, die die intra- und intermolekulären Bedingungen tragen, und lösen dadurch aus dem fibrillären Kollagen  $\alpha$ -Ketten in monomerer Form heraus. Wir haben vor kurzem gezeigt, dass Elastase und Kathepsin G, wie andere Proteinasen (VISCHER, 1974; KAPLAN und BONA, 1974), B-

Lymphozyten stimulieren und dadurch die Bildung von Immunglobulinen anregen (VISCHEK et al., 1976).

Thiolproteinasen. Kathepsin G, die thiolabhängige saure Proteinase der Lysosomen, wurde in den Neutrophilen (BAGGIOLINI et al., 1978) und in den Makrophagen nachgewiesen (WIENER und CURELARU, 1975). Obschon Kathepsin G nicht in grosser Menge vorliegt, könnte die Proteinase beim Kollagenabbau beteiligt sein, weil sie wie die Elastase die Telo peptide zerstört. Kathepsin B dürfte auch bei der Aktivierung latenter Kollagenase beteiligt sein (ECKHOUT und VAES, 1977), eine Wirkung, die auch Plasmin ausübt (WERB et al., 1977).

Karboxylproteinasen. Der Vertreter dieser Klasse ist Kathepsin D, die bestbekannte saure Proteinase der Lysosomen. Kathepsin D hat eine sehr breite Substratspezifität und ein pH-Optimum von ca. 3. Deshalb wirkt die Proteinase im wesentlichen bei intrazellulären Verdauungsprozessen, da in phagozytischen oder autophagischen Vakuolen eher die Möglichkeit besteht, das Milieu genügend sauer zu halten.

Metalloproteinasen. Menschliche Neutrophile enthalten eine spezifische Kollagenase (MURPHY et al., 1977), die das Kollagenmolekül in die zwei typischen  $TC_A$ - und  $TC_B$ - Fragmente spaltet. Dieses Enzym scheint sich jedoch von den klassischen Gewebekollagenasen zu unterscheiden, da es lösliches Kollagen leichter hydrolysiert als fibrilläres. Eine Kollagenase wird auch von aktivierten Makrophagen produziert und, wie im Falle der Serinproteinasen, fortlaufend sezerniert (WERB und GORDON, 1975a). Die Eigenschaften der Makrophagenkollagenase sind leider weitgehend unbekannt. HAUSER und VAES (1978) haben kürzlich eine Metalloproteinase in Kaninchenmakrophagen beschrieben, die ebenfalls sekretorisch freigesetzt wird und Knorpelproteoglykane abbaut, ohne auf das Kollagen zu wirken.

### Die Mechanismen der Enzymfreisetzung

Unter physiologischen Bedingungen erfolgt die Freisetzung von Enzymen in allen Zellen grundsätzlich nach dem Prinzip einer selektiven Verschmelzung von Enzymspeicher und Plasmamembran. Die Speicherorganellen, die uns im Zusammenhang mit Gewebszerstörung interessieren, sind die azurophilen und spezifischen Granula, primäre und sekundäre Lysosomen und sekretorische Vesikel. Letztere sind die noch hypothetischen Träger von Plasminogenaktivator und neutralen Proteasen der Makrophagen. Zum besseren Verständnis der entzündlichen Gewebszerstörungsprozesse ist es wichtig, zwischen Sekretion und Freisetzung während der Phagozytose zu unterscheiden. Der Unterschied leuchtet sofort ein, wenn man an die auslösenden Stimuli denkt. Die phagozytosebedingte Freisetzung wird durch die Wechselwirkung

zwischen Phagozyten und Partikeln ausgelöst. Es ist dabei wichtig, dass die als Stimulus wirkenden Partikel zugleich auch die Substrate der freigesetzten Enzyme sind. Im Vergleich dazu ist die Sekretion ein allgemeineres Phänomen, das in vielen Zellen vorkommt und das von verschiedenartigen Stimuli ausgelöst wird. Es gibt viele Anzeichen dafür, dass die Entleerung von Enzymspeichern in spezialisierte Bereiche der Plasmamembran erfolgt, und es wird angenommen, dass lokalisierte Veränderungen in der Zellmembran und im ektoplasma-tischen Bereich der Freisetzung selbst vorausgehen.

Selbstverständlich werden lytische Enzyme auch aus absterbenden Zellen abgegeben. Hinsichtlich Gewebszerstörung ist eine solche ungezielte Freisetzung lediglich bei akuten Prozessen von Bedeutung, die durch massives Absterben von Granulozyten gekennzeichnet sind.

Freisetzung von Enzymen aus neutrophilen Leukozyten. Die Enzyme der Granula werden beim Neutrophilen in der Regel während der Phagozytose freigesetzt. Der Prozess beginnt mit der Erkennung einer Partikel (Neutrophile erkennen nur opsonisierte Partikel durch die Fc- und C<sub>3</sub>-Rezeptoren ihrer Membran). Am erkennenden Pol der Zelle bilden sich um die Partikel Pseudopoden und innerhalb weniger Sekunden entleeren sich bereits die ersten Granula in die entstehende phagozytische Vakuole. Diese Sequenz ist sehr rasch und es ist experimentell kaum möglich, die exakte Reihenfolge der einzelnen Phänomene zu bestimmen. In Anlehnung an Befunde mit sekretorischen Zellen (MELDOLESI et al., 1978) wird jedoch angenommen, dass die beobachtete Hyperpolarisation der Membran (KORCHAK und WEISSMANN, 1978) sowie eine Neuverteilung von Kalziumionen im submembranären Raum unmittelbar auf die Partikelerkennung folgen. Die kontraktile Filamente des Ektoplasmas sind für die Bildung der phagozytischen Vakuole massgebend (STOSSEL, 1977). Es ist wahrscheinlich, dass ihre Umordnung im Bereich der entstehenden Vakuole den Kontakt zwischen Granula und Plasmamembran begünstigt und dadurch die Voraussetzungen für eine selektive Enzymfreisetzung schafft. Eine weitere Antwort der stimulierten Neutrophilen, welche die Phagozytose begleitet, ist die Ankurbelung des Pentosephosphatzyklus und die Bildung von Superoxid, das für die antimikrobiellen Wirkungen dieser Zellen von grundlegender Bedeutung ist (BABIOR et al., 1973). Das superoxidproduzierende Enzym ist membrangebunden (DEWALD et al., 1979) und wird beim Kontakt der Zelle mit phagozytierbaren Partikeln aktiviert. Es ist nicht klar, ob die Enzymfreisetzung und die Produktion von Superoxid voneinander abhängig sind. Es steht jedoch fest, dass Neutrophile von Individuen mit chronischer Granulomatose, die kein Superoxid bilden, hinsichtlich Phagozytose normal sind.

Zur Beurteilung der Rolle der neutrophilen Leukozyten bei der Gewebszerstörung ist wesentlich festzuhalten, dass die Freisetzung von Granulaenzymen in der Regel massiv ist (Abb. 4),



Abb. 4. Elektronenoptische Teilansicht eines neutrophilen Leukozyten aus menschlichem Blut, der eine Hefezelle phagozytiert hat. Zytochemischer Nachweis der Peroxydase. Massive Entleerung von azurophilen Granula in die phagozytische Vakuole.

und dass die Granula bereits während der Entstehung der phagozytischen Vakuolen, und nicht erst nach deren Abschluss, entleert werden (Abb. 5). Das hat zur Folge, dass die Phagozytose regelmässig mit mehr oder weniger ausgeprägter extrazellulärer Abgabe von Granulaenzymen einhergeht, und dass die Phagozyten auch Strukturen anbauen können, die zu gross sind, um in eine Vakuole eingeschlossen zu werden. Letzteres ist besonders wichtig bei der Zerstörung von Knorpel oder der Beschädigung der Basalmembran von Gefässen. In der schematischen

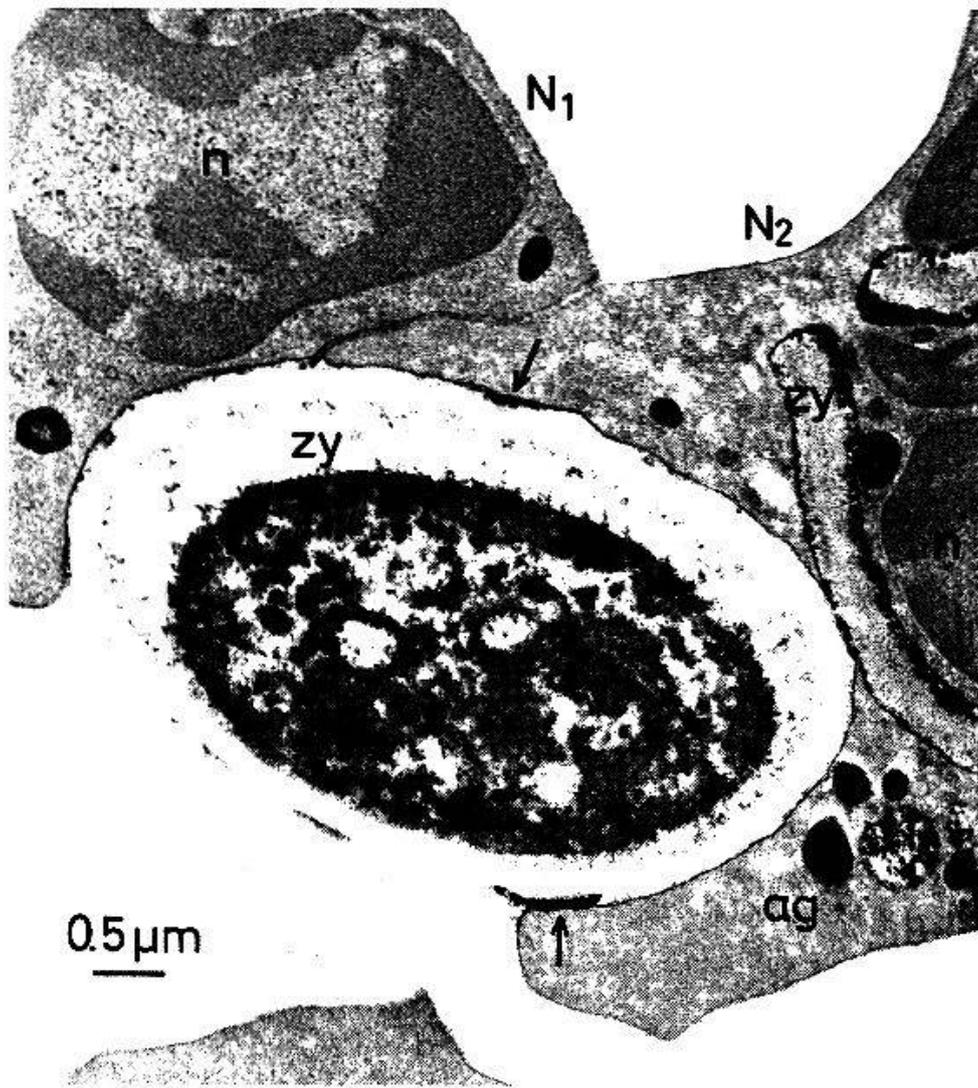


Abb. 5. Elektronenoptische Teilansicht zweier neutrophiler Leukozyten aus menschlichem Blut (N<sub>1</sub> und N<sub>2</sub>), die gemeinsam an der Phagozytose einer Zymosanpartikel (zy) beteiligt sind. Zytochemischer Nachweis der Peroxydase. Freisetzung von peroxydase-positiven Granulainhalte in die noch offene Vakuole (Pfeile). Kern (n); azurophile Granula (ag).

Darstellung von Abbildung 6 sind damit die Zustände A und B in mechanistischer Hinsicht äquivalent. In beiden Fällen wird die Enzymfreisetzung durch ein partikuläres Substrat ausgelöst, das von der Zelle als phagozytierbar erkannt wird. Im Fall A ist das Substrat klein und wird daher vollständig in die Zelle aufgenommen. Im Fall B dagegen ist die Aufnahme des Substrates unmöglich. Wesentlich ist jedoch, dass das Substrat in beiden Fällen einer massiven und gerichteten Enzymfreisetzung ausgesetzt ist. In mancher Hinsicht ist Fall B mit Fall D vergleichbar, der den Abbau von Knochenmatrix durch einen Osteoklasten symbolisiert. Wie bei B bildet sich auch hier eine Hemivakuole, die optimale Bedingungen für den lytischen Vorgang sichert.

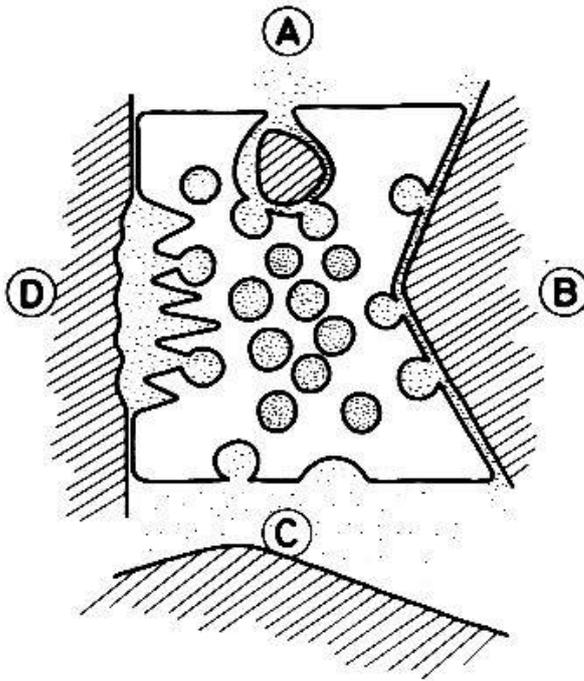


Abb. 6. Freisetzung von Enzymen aus intrazellulären Speichern. (A) und (B), Freisetzung während der Phagozytose, (C) Freisetzung durch Sekretion (Exozytose) und (D) Freisetzung an der Front eines Osteoklasten. Weitere Erläuterungen im Text.

Anders als die Granulaenzyme wird bei den neutrophilen Leukozyten Plasminogenaktivator anscheinend durch Sekretion freigesetzt (GRANELLI-PIPERNO et al., 1977). Wegen ihrer niedrigen Neusynthesekapazität sind diese Zellen jedoch kaum imstande, derartige sekretorische Proteine in Mengen bereitzustellen, die mit denjenigen der Granulaenzyme vergleichbar wären.

Freisetzung von Enzymen aus Makrophagen. Die beiden besprochenen Mechanismen der Enzymfreisetzung, die Freisetzung während der Phagozytose und die Sekretion, sind bei den Makrophagen von Bedeutung. Bei phagozytierenden Makrophagen entleeren sich primäre und sekundäre Lysosomen in die phagozytische Vakuole. Dieser Prozess verläuft grundsätzlich wie bei den neutrophilen Leukozyten (siehe oben). Anders ist jedoch die Zusammensetzung des freigesetzten Enzymgemisches, da die Lysosomen im Gegensatz zu den azurophilen Granula keine neutralen Proteinaseen enthalten. Die neutralen Proteinaseen der Makrophagen werden ausschliesslich durch Sekretion freigesetzt. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren die sekretorischen Mechanismen dieser Zellen besonders aufmerksam untersucht. Enzymsekretion und besonders die Sekretion von neutralen Proteinaseen ist ein charakteristisches Merkmal der entzündlichen oder aktivierten Makrophagen. Aktivierung bezeichnet eine biochemische oder funktionelle Differenzierung dieser Zellen, die durch eine Vielfalt

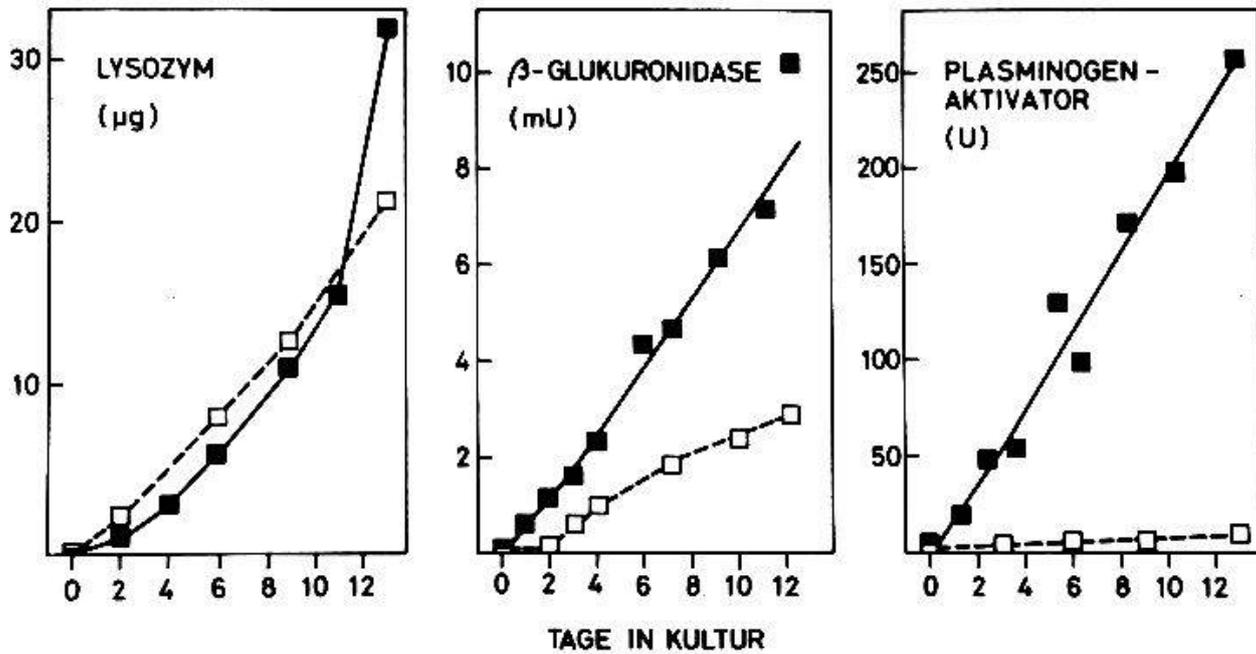


Abb. 7. Enzymsekretion bei aktivierten und nicht-aktivierten Makrophagen. Die Makrophagen wurden aus der Peritonealhöhle von nicht-behandelten (□) und von thioglykolatbehandelten (■) Mäusen entnommen und als haftende Zellen in Kultur gehalten (SCHNYDER und BAGGIOLINI, 1978a). Kumulative Sekretionskurven wurden durch die Bestimmung der entsprechenden Enzymaktivitäten in den Kulturmedien zu verschiedenen Zeiten erhalten. Jeder Punkt entspricht dem Durchschnittswert aus dreifachen Kulturen. Enzymeinheiten sind jeweils pro Million Zellen angegeben.

von oft entzündlichen Stimuli ausgelöst wird (COHN, 1978; BAGGIOLINI und SCHNYDER, 1979). Normale, nicht-aktivierte Makrophagen stammen aus unbehandelten, infektfreien Mäusen und aktivierte Makrophagen aus Mäusen, die durch eine intraperitoneale Gabe von Thioglykolatmedium vorbehandelt werden. Die sekretorischen Aktivitäten dieser Makrophagen sind in Abbildung 7 dargestellt. Aktivierte und nicht-aktivierte Zellen sezernieren ähnliche Mengen von Lysozym, ein charakteristisches Produkt der Makrophagen, das jedoch ihren Aktivierungsgrad nicht widerspiegelt (GORDON et al., 1974). Beide Zellen sezernieren auch lysosomale Hydrolasen, gezeigt hier am Beispiel der  $\beta$ -Glucuronidase. Es sind jedoch deutliche Unterschiede in der Sekretionsrate und Sekretionskinetik sichtbar. In normalen Makrophagen beginnt die Sekretion erst nach einem bis zwei Tagen in Kultur und die Sekretionsrate bleibt eindeutig niedriger als bei den aktivierten Zellen. Die Beobachtung der spontanen Sekretion von lysosomalen Hydrolasen (SCHNYDER und BAGGIOLINI, 1978a) kam überraschend, weil wir aufgrund der üblichen Vorstellungen über die Funktion des lysosomalen Systems die Freisetzung solcher Enzyme lediglich im Zusammenhang mit Phagozytose erwarteten. Der grösste Unterschied zwischen normalen und aktivierten Zellen besteht in der

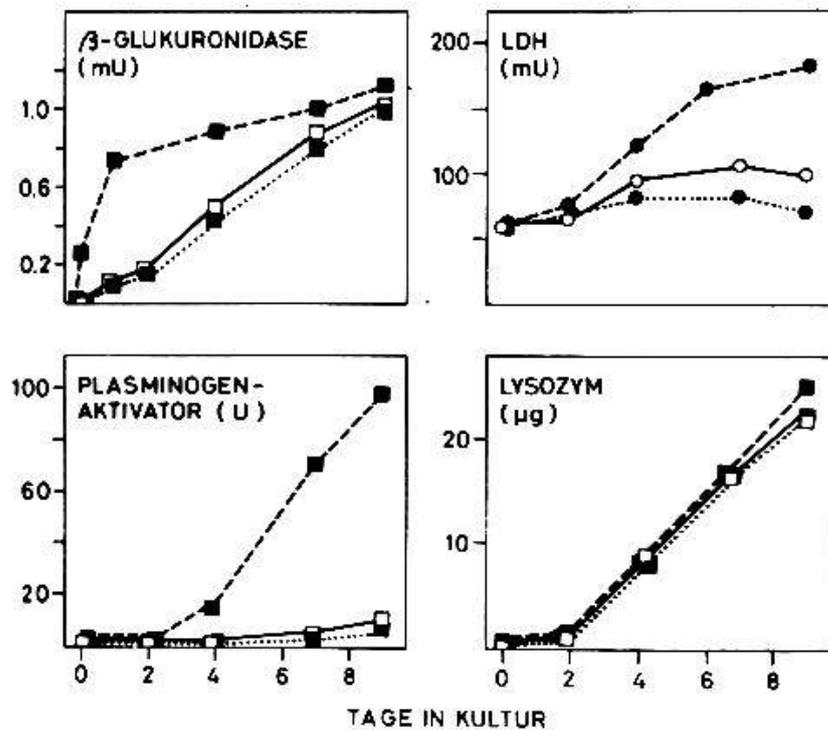


Abb. 8. Makrophagenaktivierung durch Phagozytose. Formaldehyd-behandelte Schaferythrozyten (-----) oder Latex-Partikel von 1.01  $\mu\text{m}$  Querschnitt (.....), 5 bzw. 40 Partikel pro Makrophag, wurden zu Beginn der Kulturperiode den Kulturen zugegeben. Nicht-phagozytierte Partikel wurden nach einer Stunde durch Waschen eliminiert und die Kulturen mit partikelfreiem Medium weitergeföhrt. Die kumulative Freisetzung von  $\beta$ -Glukosaminidase, Plasminogenaktivator und Lysozym und der intrazelluläre LDH-Gehalt wurden bei phagozytierenden (schwarze Symbole) und nicht-phagozytierenden (weisse Symbole) Zellen bestimmt und wie in Abbildung 7 dargestellt. Für methodologische Einzelheiten, siehe SCHNYDER und BAGGIOLINI (1978b).

Sekretion von neutralen Proteinasen wie Plasminogenaktivator (UNKELESS et al., 1974), Kollagenase und Elastase (WERB und GORDON, 1978a; 1978b). Wie die Abbildung 7 zeigt, ist die Sekretion von Plasminogenaktivator sehr stark in den aktivierten und kaum nachweisbar in den normalen Makrophagen.

Untersuchungen zum Mechanismus der Aktivierung von normalen Makrophagen unter Kulturbedingungen (SCHNYDER und BAGGIOLINI, 1978b; BAGGIOLINI und SCHNYDER, 1979) haben die Bedeutung der Phagozytose als Stimulus gezeigt. Die Resultate eines solchen Experimentes sind in Abbildung 8 dargestellt. Normale Makrophagen wurden zu Beginn der Kulturperiode (Zeitpunkt 0) einem Ueberschuss an mit Formaldehyd behandelten Schaferythrozyten ausgesetzt, und die Phagozytose wurde nach einer Stunde, durch Auswaschen der nichtaufgenommenen Partikel, gestoppt. Diese kurze phagozytische Episode bewirkt eine unmittelbare Freisetzung von  $\beta$ -Glukuronidase. Kinetische Ueberlegungen und die Tatsache, dass die Freisetzung die phagozytische Aufnahme sehr lange überdauert, lassen den Schluss

zu, dass es sich dabei um echte Sekretion handelt. In der initialen Phase, die 1 bis 2 Tage dauert, ist die Rate der beobachteten  $\beta$ -Glukuronidasesekretion ähnlich wie diejenige von aktivierten Makrophagen. Dieser ersten sekretorischen Antwort folgt, 3 bis 4 Tage nach der Phagozytose, die Sekretion von Plasminogenaktivator. Als weiteres Zeichen der funktionellen Differenzierung beobachtet man eine Zunahme der zellulären Laktatdehydrogenase, die parallel mit einer Zunahme des gesamten Zellproteins verläuft. Erwartungsgemäss beeinflusst dieser Differenzierungsprozess die Sekretion von Lysozym nicht, die, wie bereits erwähnt, bei aktivierten und nicht-aktivierten Zellen gleich bleibt. Aehnliche Resultate ergeben sich nach der Phagozytose von Zymosan, das im Gegensatz zu den Schaferythrozyten in der Zelle nicht abgebaut wird (SCHNYDER und BAGGIOLINI, 1978b). Durch Latex dagegen lassen sich die Zellen nicht aktivieren. Normale Makrophagen, die Latexpartikeln phagozytieren, verhalten sich genau gleich wie Kontrollzellen (Abb. 8). Weitere Versuche haben gezeigt, dass Latex im Gegensatz zu den beiden andern Partikeln phagozytiert wird, ohne den Pentosephosphatzyklus anzukurbeln. Es scheint damit, dass die drastische Erhöhung der Zyklusaktivität, die in der Regel die Phagozytose begleitet, ein wesentliches Element bei der Auslösung der Makrophagenaktivierung darstellt. Dies wird durch die Beobachtung erhärtet, dass Plasminogenaktivator-Sekretion durch einfache elektrochemische Stimulierung des Pentosephosphatzyklus mittels Methylenblau, ohne gleichzeitige Phagozytose, induziert wird (BAGGIOLINI und SCHNYDER, 1979; SCHNYDER und BAGGIOLINI, Proc. Natl., Acad. Sci. USA, im Druck).

Alle vier Mechanismen der Enzymfreisetzung, die in Abbildung 6 schematisch dargestellt sind, haben - nach dem Gesagten - für den (aktivierten) Makrophagen Gültigkeit. Für Fall A und B gelten im Prinzip die im Zusammenhang mit den Neutrophilen angestellten Ueberlegungen. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass die Makrophagen während der Phagozytose kleinere Enzymmengen in den Extraktzellulärraum abgeben als die Neutrophilen, da ihr lysosomales Kompartiment bedeutend kleiner ist als dasjenige der Granula. Unsere Resultate und diejenigen anderer Laboratorien zeigen, dass Fall C, d.h. echte Sekretion, der wahrscheinlich wichtigste Freisetzungsmechanismus der Makrophagen darstellt. Im Hinblick auf die gezeigte Interrelation zwischen Phagozytose und Sekretion erscheint jedoch Situation D als Modellvorstellung der gewebserstörenden Makrophagen sehr attraktiv. Der Osteoklast, der in D symbolisiert ist, wird im übrigen neuerdings als ein Abkömmling der Monozyten und damit als verwandt mit den Makrophagen angesehen (VAN FURTH et al., 1975).

- Babior B.M., Kipnes R.S. and Curnutte J.T. (1973): Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J.clin.Invest.* 52, 741-744.
- Baggiolini M., Bretz U. and Dewald B. (1978): Subcellular localization of granulocyte enzymes. In: Havemann K. and Janoff A. (Eds) *Neutral Proteases of Human Polymorphonuclear Leukocytes*. Urban & Schwarzenberg, Inc., Baltimore-Munich, 3-17.
- Baggiolini M., Bretz U. and Gusus B. (1974): Biochemical characterization of azurophil and specific granules from human and rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Schweiz.med. Wschr.* 104, 129-132.
- Baggiolini M., de Duve C., Masson P.L. and Heremans J.F. (1970a): Association of lactoferrin with specific granules in rabbit heterophil leukocytes. *J.exp.Med.* 131, 559-570.
- Baggiolini M., Hirsch J.G. and de Duve C. (1969): Resolution of granules from rabbit heterophil leukocytes into distinct populations by zonal sedimentation. *J.Cell Biol.* 40, 529-541.
- Baggiolini M., Hirsch J.G. and de Duve C. (1970b): Further biochemical and morphological studies of granule fractions from rabbit heterophil leukocytes. *J.Cell Biol.* 45, 586-597.
- Baggiolini M. and Schnyder J. (1979): Macrophage activation and the mechanisms of tissue destruction. In: *Review Symposium on Connective Tissue Changes in Rheumatoid Arthritis and the Use of Penicillamine*. AAS, Birkhäuser-Verlag, Basel.
- Bainton D.F., Ulliyot J.L. and Farquhar M.G. (1971): The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. Origin and content of azurophil and specific granules. *J.Exp.Med.* 134, 907-934.
- Barrett A.J. (1978): The possible role of neutrophil proteinases in damage to articular cartilage. *Agents and Actions* 8, 11-18.
- Bretz U. (1978): Subcellular localization of plasminogen activator in human neutrophils. *Experientia* 34, 934.
- Bretz U. and Baggiolini M. (1974): Biochemical and morphological characterization of azurophil and specific granules of human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *J.Cell Biol.* 63, 251-269.
- Cohn Z.A. (1978): The activation of mononuclear phagocytes: Fact, fancy, and future, *J. Immunol.* 121, 813-816.
- Davies P., Page R.C. and Allison A.C. (1974): Changes in cellular enzyme levels and extracellular release of lysosomal acid hydrolases in macrophages exposed to group A streptococcal cell wall substance. *J.Exp.Med.* 139, 1262-1282.
- Dewald B., Baggiolini M., Curnutte J.T. and Babior B.M. (1979): Subcellular localization of the superoxide-forming enzyme in human neutrophils. *J.Clin.Invest.* 63, 21-29.
- Dewald B., Rindler-Ludwig R., Bretz U. and Baggiolini M. (1975): Subcellular localization and heterogeneity of neutral proteases in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *J.Exp.Med.* 141, 709-723.
- Eeckhout Y. and Vaes G. (1977): Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase. Effects of lysosomal cathepsin B, plasmin and kallikrein, and spontaneous activation. *Biochem.J.* 166, 21-31.
- Furth van R., Langevoort H.L. and Schaberg A. (1975): Mononuclear phagocytes in human pathology - proposal for an approach to improved classification. In: van Furth R. (Ed.): *Mononuclear Phagocytes in Immunity, Infection and Pathology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1-15.
- Gordon S., Todd J. and Cohn Z.A. (1974): In vitro synthesis and secretion of lysozyme by mononuclear phagocytes. *J.Exp.Med.* 139, 1228-1248.
- Granelli-Piperno A., Vassalli J.-D. and Reich E. (1977): Secretion of plasminogen activator by human polymorphonuclear leukocytes. Modulation by glucocorticoids and other effectors. *J.Exp.Med.* 146, 1693-1706.

- Hauser P. and Vaes G. (1978): Degradation of cartilage proteoglycans by a neutral proteinase secreted by rabbit bone-marrow macrophages in culture. *Biochem.J.* 172, 275-284.
- Havemann K. and Janoff A. (1978): *Neutral Proteases of Human Polymorphonuclear Leukocytes.* Urban & Schwarzenberg, Baltimore-Munich.
- Kaplan J.G. and Bona C. (1974): Proteases as mitogens. *Exp.Cell Res.* 88, 388-394.
- Korchak H.M. and Weissmann G. (1978): Changes in membrane potential of human granulocytes antecede the metabolic responses to surface stimulation. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 75, 3818-3822.
- Meerpohl H.-G., Lohmann-Matthes M.-L. and Fischer H. (1976): Studies on the activation of mouse bone marrow-derived macrophages by the macrophage cytotoxicity factor (MCF). *Europ.J.Immunol.* 6, 213-217.
- Meldolesi J., Borgese N., De Camilli P. and Ceccarelli B. (1978): Cytoplasmic membranes and the secretory process. In: Poste G. and Nicholson G.L. (Eds.): *Cell Surface Reviews.* Vol. 1, Elsevier, North Holland, New York, 509-627.
- Murphy G., Reynolds J.J., Bretz U. and Baggiolini M. (1977): Collagenase is a component of the specific granules of human neutrophil leukocytes. *Biochem.J.* 162, 195-197.
- Schnyder J. and Baggiolini M. (1978a): Secretion of lysosomal hydrolases by stimulated and nonstimulated macrophages. *J.Exp.Med.* 148, 435-450.
- Schnyder J. and Baggiolini M. (1978b): Role of phagocytosis in the activation of macrophages. *J.Exp.Med.* 148, 1449-1457.
- Spitznagel J.K., Dalldorf F.G., Leffell M.S., Folds J.D., Welsh I.R.H., Cooney M.H. and Martin L.E. (1974): Character of azurophil and specific granules purified from human polymorphonuclear leukocytes. *Lab.Invest.* 30, 774-785.
- Starkey P.M., Barrett A.J. and Burleigh M.C. (1977): The degradation of articular collagen by neutrophil proteinases. *Biochim.Biophys. Acta* 483, 386-397.
- Stossel T.P. (1977): Contractile proteins in phagocytosis. An example of cell surface-to-cytoplasm communication. *Fed.Proc.* 36, 2181-2184.
- Unkeless J.C., Gordon S. and Reich E. (1974): Secretion of plasminogen activator by stimulated macrophages. *J.Exp.Med.* 139, 834-850.
- Vischer T.L. (1974): Stimulation of mouse B lymphocytes by trypsin. *J.Immunol.* 113, 58-62.
- Vischer T.L., Bretz U. and Baggiolini M. (1976): In vitro stimulation of lymphocytes by neutral proteinases from human polymorphonuclear leukocyte granules. *J.Exp.Med.* 144, 863-870.
- Werb Z. and Gordon S. (1975a): Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages. *J.Exp.Med.* 142, 346-360.
- Werb Z. and Gordon S. (1975b): Elastase secretion by stimulated macrophages. *J.Exp.Med.* 142, 361-377.
- Werb Z., Mainardi C.L., Vater C.A. and Harris E.D., Jr. (1977): Endogenous activation of latent collagenase by rheumatoid synovial cells. Evidence for a role of plasminogen activator. *New Engl.J.Med.* 296, 1017-1023.
- Wiener E. and Curelaru Z. (1975): The intracellular distribution of cathepsins and other acid hydrolases in mouse peritoneal macrophages. *J.Reticuloendothel.Soc.* 17, 319-332.

Adresse des Autoren: Prof. Dr. M. Baggiolini, Wander AG, Postfach 2747, CH-3001 Bern (Schweiz)

