



Dank Alternativmethoden zum Tierversuch neuen Entzündungsfaktor entdeckt

M. Baggiolini, B. Dewald, A. Walz

Theodor-Kocher-Institut der Universität Bern,
Freiestrasse 1, 3000 Bern 9

Zusammenfassung

Einfache Testmodelle wurden zur Erfassung von chemischen oder biologischen Substanzen entwickelt, welche die Leukozyten-Aktivität beeinflussen. Es werden neutrophile Leukozyten aus menschlichem Blut verwendet. Die Zellen werden in verschiedener Weise stimuliert und die Wirkung von Testsubstanzen auf die Freisetzung von Enzymen, die Bildung von Sauerstoffradikalen und die Zellschädigung wird gemessen. Alle Analysen werden in Mikrotiterplatten ausgeführt und in Mehrkanal-Messgeräten ausgewertet. Diese Modelle erfassen Substanzen, die Leukozyten stimulieren bzw. hemmen, und Substanzen, welche die Antwort der Leukozyten modifizieren. Die Anwendung dieser Methoden führte zur Entdeckung eines neuen Entzündungsfaktors, NAP-1, der die neutrophilen Leukozyten aktiviert. NAP-1 besteht aus 72 Aminosäuren und wird durch verschiedene Gewebszellen gebildet.

Summary: Alternative methods to animal experimentation lead to the discovery of a novel inflammation factor

Simple testing models have been developed for the evaluation of chemical or biological compounds that influence the activity of leukocytes. Human blood neutrophil leukocytes are used. They are stimulated in various ways, and the effects of test compounds on the release of enzymes, the generation of oxygen radicals and cell damage are quantified. All assays are performed in microtiter plates and the responses are evaluated by multi-well photometry or fluorimetry. The models are apt to detect compounds acting on leukocytes as stimuli, inhibitors, and response modifiers. The use of these methods led to the discovery of a novel inflammatory peptide, NAP-1, which activates neutrophil leukocytes. NAP-1 consists of 72 amino acids and is generated by a variety of tissue cells.



Einleitung

Das auffälligste Merkmal einer Entzündung ist die Ansammlung von zahlreichen Leukozyten (weissen Blutkörperchen) im befallenen Gewebe, die oft durch eine Erhöhung der Leukozytenzahl im Blut begleitet wird. Die Zellen, von denen wir sprechen, nennt man auch Granulozyten, da sie lichtmikroskopisch sichtbare und charakteristische Granula enthalten. Die zwei wichtigsten Vertreter sind die neutrophilen Leukozyten (kurz Neutrophile genannt) und die Monozyten. Beide haben zwei wichtige Eigenschaften: die Fähigkeit, aus der Blutbahn ins Gewebe auszuwandern und die Fähigkeit, zu phagozytieren, d.h. Mikroorganismen und sonstiges biologisches Material einzuverleiben. Durch diese Eigenschaft ähneln die Granulozyten den Amöben, die durch Phagozytose Nährstoffe aufnehmen.

Um in ein Gewebe einwandern und entzündungsfördernde Produkte freisetzen zu können, müssen die Leukozyten, die sonst passiv im Blutstrom kreisen, aktiviert werden. Im Rahmen des Nationalen Forschungsprogrammes 17, mit dem Thema "Alternativmethoden zum Tierversuch", haben wir verschiedene in vitro-Modelle entwickelt, welche die Aktivierung der neutrophilen Leukozyten und die Produktfreisetzung erfassen. Bei der Erarbeitung dieser Modelle hatten wir ein wichtiges Ziel: Die Testsysteme mussten einfach und leicht zu reproduzieren sein, um für grosse Serien von Versuchen geeignet zu sein. Nur dann nämlich würden sie in einem Screening-System als echte Alternative zu den gängigen Tiermodellen, selbst für die pharmazeutische Industrie, attraktiv sein.

Diese Alternativmethoden, die in allen Details in einer kürzlich erschienenen Publikation vorgestellt wurden (1), sind vielfach einsetzbar. Man kann sie verwenden, um potentielle entzündungshemmende Stoffe zu suchen - Stoffe, welche die Aktivierung der Granulozyten verhindern und dadurch möglicherweise als Antiphlogistika in Frage kommen. Sie sind aber auch geeignet, um Granulozyten-aktivierende Stoffe zu erfassen - Aktivatoren, welche die Einwanderung dieser



Die Entdeckung von NAF (NAP-1)

Es war besonders befriedigend, dass die Alternativmethode gerade in unseren Laboratorien zur Entdeckung eines neuen Entzündungsfaktors führte. Wegen der einfachen Ausführung und grossen Kapazität verwendeten wir ein Enzymfreisetzungs-Modell zur Beurteilung von Lymphokinen und Monokinen. Diese Wirkstoffe werden von verschiedenen Leukozyten gebildet (vor allem durch Lymphozyten und Monozyten) und wirken wie Hormone im Rahmen des Immunsystems. Wir waren speziell an Monokinen interessiert, die nach selektiver Stimulierung in Zellkulturen menschlicher Blutmonozyten entstehen. Wir sammelten die Ueberstände aus vielen Kulturen und fraktionierten sie nach den Regeln der Proteinbiochemie, um nach unbekanntem Wirkstoffen zu suchen. Bei solchen Arbeiten fallen viele hundert Proben an, die einzeln evaluiert werden müssen. Unsere Alternativmethoden waren daher ein ideales Testsystem.

Es ging nicht lange, bis wir Indizien für das Vorkommen eines Faktors erhielten, der von den Monozyten gebildet wurde und als Aktivator der neutrophilen Leukozyten wirkte. Nach den ersten biologischen Befunden musste als erstes die Struktur des Faktors ermittelt werden. Die Sequenzanalyse des gereinigten Materials zeigte, dass es sich um ein neues Peptid handelte. Wir nannten es deshalb NAF (Neutrophil Activating Factor) und später, im Einvernehmen mit anderen in diesem Gebiet tätigen Forschern, NAP-1 (Neutrophil Activating Peptide 1). NAP-1 wies keine Strukturähnlichkeit mit bekannten Zytokinen auf und war damit andersartig als Wirkstoffe wie Interleukin-1, Tumornekrosefaktor, Kolonien-stimulierende Faktoren und Interferone (4). Die von uns ermittelte Struktur wurde zur selben Zeit auch von amerikanischen Forschern (5) und kurz danach von einer deutsch-englischen Gruppe veröffentlicht (6). Wie die Abbildung zeigt, besteht NAP-1 aus 72 Aminosäuren, wovon vier Zysteine sind. Sie bilden zwei Disulfidbrücken, welche für die biologische Wirksamkeit unerlässlich sind (7) und dem Peptid eine räumliche Struktur mit zwei Schlaufen verleihen. NAP-1 wurde mittlerweile gentechnisch aus Kolibakterien gewonnen. Das rekombinierte Peptid erwies sich als identisch und gleich wirksam wie das natürliche (8).

NAP-1 wirkt wie ein chemotaktischer Faktor

Die Chemotaxis, d.h. die Bewegung in die Richtung eines chemischen Reizes, ist die Basis der Rekrutierung von Leukozyten aus der Blutbahn in ein Gewebe. Neben der Enzymfreisetzung (4,7) war die Chemotaxis eine der ersten Eigenschaften von NAP-1, die belegt werden konnte (5). Es war daher naheliegend, die Wirkungen von NAP-1 mit derjenigen bekannter chemotaktischer Faktoren zu vergleichen. Wenn zirkulierende Neutrophile einen chemotaktischen Reiz wahrnehmen, heften sie sich an die Endothelzellen, welche die Wand der Kapillargefäße auskleiden, öffnen sich eine Passage zwischen den Wandzellen und wandern zum Ursprung des Reizes ins Gewebe aus. Bei chemotaktisch stimulierten Neutrophilen kann man verschiedene Einzelfunktionen exakt bestimmen. Solche Antworten sind der Gestaltwandel, die Freisetzung von Enzymen aus ihren verschiedenen Speichergranula und die Produktion von Superoxid und Wasserstoffperoxid. Alle diese Antworten haben einen Sinn. Durch den Gestaltwandel nimmt die Zelle, die sonst kugelig ist, eine polarisierte Form an, die sich für die Wanderung eignet. Proteinabbauende Enzyme, die aus den Granula stammen, sind mit grosser Wahrscheinlichkeit für die Passage der Kapillarwand und die Fortbewegung im Gewebe erforderlich. Weitere Enzyme und speziell das Superoxid und weitere daraus entstehenden Sauerstoffradikale sind für das Abtöten von Mikroorganismen notwendig.

Der Vergleich mit bekannten chemotaktischen Faktoren, wie Formylpeptide bakteriellen Ursprungs, das Anaphylatoxin C5a, das im Blutplasma entsteht, sowie das obenerwähnte PAF, bewies, dass NAP-1 bei den Neutrophilen das vollständige Bild einer chemotaktischen aktivierten Zelle hervorruft. Die Ähnlichkeit zwischen NAP-1 und den zum Vergleich herangezogenen chemotaktischen Faktoren erstreckt sich auch auf den Mechanismus, wodurch das Signal, welches der Stimulus auf die Zelloberfläche abgibt, im Zellinneren in eine Antwort (wie z.B. Enzymfreisetzung) umgewandelt wird. Diese Beobachtungen suggerierten, dass die Neutrophilen eine selektive Bindungsstelle für NAP-1, einen sogenannten Rezeptor, haben müssten. Es wurde tatsächlich von amerikanischen Forschern kürzlich gezeigt,



dass ein neutrophiler Leukozyt durchschnittlich etwa 20'000 NAP-1-Rezeptoren aufweist (9).

Nach der weitgehenden Klärung der NAP-1-Wirkungen *in vitro* konnte man gezielte Experimente planen, die mit wenig Aufwand die noch offene Frage der Wirksamkeit *in vivo* beantworten würden. Wir konnten zeigen, dass NAP-1 nicht Spezies-spezifisch ist. Nach Injektion in der Haut beim Kaninchen bewirkt es eine Schwellung und eine ausgeprägte Neutrophilenansammlung, die innerhalb von 24 Stunden wieder verschwindet. Diese Experimente bewiesen, dass NAP-1 auch in einem lebenden Organismus wirkt, und dass die auf Grund der Studien *in vitro* vorausgesagten chemotaktischen und proinflammatorischen Effekte tatsächlich eintreten.

NAP-1 wird von vielen verschiedenen Zellen gebildet

Wenn man früher an die mögliche Bedeutung von NAP-1 bei entzündlichen Krankheiten dachte, war es schwer zu verstehen, wieso ein solcher Faktor von den Monozyten gebildet werden sollte. Heute sind diese Fragen einfacher zu beantworten, da kürzlich gezeigt wurde, dass verschiedene Typen von Gewebszellen nach Stimulierung mit Interleukin-1 oder Tumor-Nekrosefaktor, zwei Monokinen, die oft als Folge einer Gewebsreizung entstehen, fähig sind, NAP-1 zu produzieren (10). Es ist damit zu erwarten, dass NAP-1 als lokaler chemotaktischer Faktor die Rekrutierung von Neutrophilen in krankhaft veränderte Gewebe bewirkt.

Bedeutung von NAP-1

Es gibt klare Hinweise für die Bedeutung von NAP-1 in der Pathophysiologie entzündlicher Erkrankungen. Ein Peptid mit Neutrophilen-aktivierenden Eigenschaften wurde bereits vor einiger Zeit bei der Schuppenflechte gefunden, wo man später auch NAP-1 selbst identifizieren konnte (6). Interleukin-1, das in den Schuppen reichlich

vorkommt, könnte lokal die Produktion von NAP-1 auslösen, was als die Ursache der für die Schuppenflechte charakteristischen Neutrophilenanhäufung anzusehen ist. NAP-1 könnte ebenfalls in verschiedenen Formen von Arthritis auftreten, da es von entzündlich veränderten Gelenkzellen gebildet wird (10). Die Einwanderung von Neutrophilen, die knorpelabbauenden Enzyme enthalten, führt oft zu entzündlichen Gelenkschäden. Gewebszerstörung durch Neutrophilenenzyme ist in der Lunge besonders gefährlich, da die nachfolgende Vernarbung den Gasaustausch beeinträchtigt. Es ist in der Tat wohlbekannt, dass die massive Rekrutierung von Neutrophilen im Alveolarraum eine bleibende Abnahme der Atemfunktion zur Folge haben kann.

Auch wenn diese Vorstellungen zum Teil noch hypothetisch sind, ist es jedoch offensichtlich, dass die Entdeckung von NAP-1 und das Studium seiner Eigenschaften ein neues Verständnis für pathologische Zustände bilden, die früher viel rätselhafter waren. Diese Forschung hat eine neue Basis für die Entwicklung entzündungshemmender Substanzen gebildet, die als Antagonisten oder als Modulatoren der Synthese von NAP-1 wirken können.

Literatur

1. Baggiolini, M., Dewald, B.: Cellular models for the detection and evaluation of drugs that modulate human phagocyte activity. *Experientia* 1988; 44:841-848.
2. Baggiolini, M., Dewald, B., and Thelen, M.: Effects of PAF on neutrophils and mononuclear phagocytes. *Progr. Biochem. Pharmacol. (Karger Series)* 1988; 22:90-105.
3. Dewald, B., Baggiolini, M.: Evaluation of PAF antagonists using human neutrophils in a microtiter plate assay. *Biochem. Pharmacol.* 1987; 36:2505-2510.
4. Walz A., Peveri P., Aschauer H., Baggiolini M.: Purification and amino acid sequencing of NAF a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1987; 149:755-761.
5. Yoshimura T., Matsushima K., Tanaka S., Robinson E.A., Appella E., Oppenheim J.J., Leonard E.J.: Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1987; 84:9233-9237.
6. Gregory H., Young J., Schroder J.M., Mrowietz U., Christophers E.: Structure determination of a human lymphocyte derived neutrophil activating peptide (LYNAP). *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1988; 151:883-890.

7. Peveri P, Walz A., Dewald B, Baggiolini M.: A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. J.Exp.Med. 1988; 167:1547-1559.
8. Lindley I, Aschauer H, Seifert J.M., Lam C, Brunowsky W., Kownatzki E., Thelen M., Peveri P, Dewald B, von Tscharnher V, Walz A., Baggiolini M.: Synthesis and expression in Escherichia coli of the gene encoding monocyte-derived neutrophil-activating factor: biological equivalence between natural and recombinant neutrophil-activating factor. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 1988; 85:9199-9203.
9. Samanta A.K., Oppenheim J.J., Matsushima K.: Identification and characterization of specific receptors for monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) on human neutrophils. J.Exp.Med. 1989; 169:1185-1189.
10. Baggiolini, M., Walz, A., Kunkel, S.L.: Neutrophil-activating peptide-1/ Interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. J.Clin.Invest. 1989 (in press).

