

**Zelluläre Regulation und klinische Aspekte
des monocyten-/macrophagenspezifischen
Proteins CD163**

DISSERTATION

zur Erlangung
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Meike Timmermann
aus Göttingen

Würzburg 2005

Eingereicht am:

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Frau Prof. Dr. Petra Högger

am Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie
des Instituts für Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt.

Meiner Familie

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits an folgenden Stellen veröffentlicht:

Originalpublikationen:

Timmermann M., Buck F., Sorg C., Högger P.

Interaction of soluble CD163 with activated T lymphocytes involves its association with non-muscle myosin heavy chain type A.

Immunol Cell Biol. **2004** Oct; 82(5):479.

Timmermann M., Högger P.

Oxidative stress and 8-iso-prostaglandin F2 alpha induce ectodomain shedding of CD163 and release of tumor necrosis factor-alpha from human monocytes.

Free Radic Biol Med. **2005** Jul 1; 39(1):98.

Posterbeiträge:

Timmermann M., Rietschel E., Högger P.

8-Isoprostane F2 alpha is involved in ectodomain shedding of CD163

DPhG-Jahrestagung 2003, Würzburg.

Attia M. I., Timmermann M., Grimm T., Högger P., Herdeis C.

Design, synthesis and biological activity of aza-sugar-based CD163 ectodomain shedding inhibitors.

DPhG-Jahrestagung 2005, Mainz.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen sehr herzlich danken, die mich direkt oder indirekt bei der Entwicklung und Durchführung der Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Petra Högger für die Aufnahme in ihren Arbeitskreis und die Überlassung eines sehr interessanten und spannenden Themas. Außerdem möchte ich mich sehr herzlich für die vielen Denkanstöße, die aufmerksame Betreuung und die große Hilfsbereitschaft während der Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Bei folgenden Wissenschaftlern bedanke ich mich sehr für die Kooperation und Unterstützung:

Herrn Dr. Ernst Rietschel, Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Köln, für die Überlassung der bronchoalveolären Lavage-Proben aus der BEAT-Studie.

Herrn Prof. Bruno Allolio, Institut für Endokrinologie der Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg, für die Bereitstellung der Steroidhormone.

Herrn Prof. Detlev Schindler und Herrn Richard Friedl, Institut für Humangenetik der Universität Würzburg, für die kompetente Einweisung in die Durchflusszytometrie und die Hilfe bei der Durchführung der ersten Messungen.

Herrn Dr. Christoph Schön, Frau Dr. Sabine Pilgrim und vor allem Herrn Dr. Jörg Slaghuis, Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Würzburg, für die Einweisung in die Bedienung eines weiteren Durchflusszytometers und die Erläuterungen zur Fluoreszenzmikroskopie.

Herrn Dr. Illert und Herrn Knorr, Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes, Wiesentheid, für die Herstellung der Blutzellsuspensionen und Frau Jäger, DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen, Frankfurt, für die Bereitstellung der Buffy Coats.

Frau Doris Moret, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Universität Würzburg, für das Autoklavieren sämtlicher Sterilgüter.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Dr. Tanja „Tänscha“ Grimm für die unersetzliche Zeit, die seelische und moralische Unterstützung und die wundervolle Freundschaft, die mir sehr viel bedeutet.

Sehr bedanken möchte ich mich bei Roswitha „Rosi“ Skrabala für die selbstverständliche Hilfsbereitschaft und die Freundschaft mit der es manchmal möglich war, ein kleines Stück von der Zukunft zu sehen.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Anagnostis „Noti“ Valotis für die stets außerordentlich kompetente fachliche Unterstützung und die Freundschaft, wodurch vieles Unmögliche möglich wurde.

Bedanken möchte ich mich auch bei Nicole Rauschert für die gemeinsame Zeit, in der wir gelernt haben auch über Umwege zum Ziel zu gelangen.

Den Mitgliedern meines Arbeitskreises Samar Afify, Matthias Freiwald, Dr. Tanja Grimm, Nicole Rauschert, Angelika Schäfer, Roswitha Skrabala, Julia Thern und Dr. Anagnostis Valotis danke ich für die gute Zusammenarbeit, das herzliche Arbeitsklima und das freundschaftliche Verhältnis.

Meinen Kollegen aus dem Biochemie-Praktikum Dr. Ralph Deubner, Dr. Ulrich „Uli“ Käppler, Angelika Schäfer, Dr. Anagnostis Valotis und Christine Weber danke ich für die zuverlässige Zusammenarbeit, den Spaß und das freundschaftliche und kollegiale Arbeitsklima.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises von Frau Prof. Schirmeister sowie Michael Kraus und Dr. Eberhard Heller danke ich für die kompromisslose Unterstützung und Betreuung in allen technisch-praktischen und privaten Angelegenheiten.

Für das aufmerksame und intensive Korrekturlesen dieser Arbeit und die Hilfe bei der Formatierung danke ich sehr herzlich Dr. Tanja Grimm, Roswitha Skrabala, Julia Thern, Dr. Anagnostis Valotis und vor allem meinem Vater.

Vor allem jedoch möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich immer unterstützt und mir zur Seite gestanden hat. Lieben Dank Mami, Papi und Silke.

*„Wenn es nur eine Wahrheit gäbe,
könnte man nicht hundert Bilder über dasselbe Thema malen.“*

Pablo Picasso

Inhaltsverzeichnis:

A. Einleitung

1	Einleitung.....	3
1.1	Pathophysiologie der Entzündung.....	3
1.2	Hämatopoetische Zellen des Immunsystems.....	5
1.2.1	Granulocyten	6
1.2.2	Lymphocyten.....	7
1.2.3	Monocyten/Macrophagen.....	8
1.3	Heterogenität von Monocyten/Macrophagen.....	9
1.3.1	Methode zur Charakterisierung von Zellen des Immunsystems.....	10
1.4	CD163 – ein monocyten-/macrophagenspezifisches Oberflächenantigen.....	12
1.4.1	Biochemische Charakterisierung.....	12
1.4.1.1	Die Proteinfamilie der cysteinreichen Scavengerrezeptoren (SRCR).....	13
1.4.2	Heraufregulation von CD163.....	14
1.4.3	Herabregulation von CD163.....	15
1.4.4	Bedeutung und Funktion von CD163.....	16
1.5	Offene Fragen zur Regulation und Bedeutung von sCD163.....	16

B. Allgemeiner Teil

1	<i>In-vitro</i>-Untersuchungen zur Abspaltung des löslichen CD163 von der Monocytenoberfläche	21
1.1	Abspaltung der extrazellulären Domäne transmembranärer Proteine (<i>ectodomain shedding</i>).....	21
1.1.1	Mechanismus des <i>ectodomain shedding</i>	21
1.1.2	Membranprotein-Sekretasen.....	23
1.1.3	Induktion des <i>ectodomain shedding</i>	25
1.2	Untersuchung von Induktoren des <i>ectodomain shedding</i> von CD163.....	27
1.2.1	Untersuchung der Induktion durch oxidativen Stress.....	29
1.2.1.1	Oxidativer Stress.....	29
1.2.1.2	Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).....	30
1.2.1.3	Antioxidative Schutzmechanismen.....	32
1.2.1.4	Untersuchung der Induktion des <i>ectodomain shedding</i> von CD163 durch Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂).....	33
1.2.1.4.1	Prinzip der Bestimmung.....	34
1.2.1.4.2	Induktion des Shedding von CD163 durch Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂).....	35
1.2.1.4.3	Hemmung des wasserstoffperoxidinduzierten Shedding von CD163.....	39

1.2.1.5	Untersuchung der Induktion des <i>ectodomain shedding</i> von CD163 durch Stickstoffmonoxid (NO)....	48
1.2.1.5.1	Induktion des Shedding von CD163 durch Stickstoffmonoxid (NO).....	49
1.2.1.5.2	Hemmung des stickstoffmonoxidinduzierten Shedding von CD163.....	53
1.2.2	Untersuchung der Induktion des <i>ectodomain shedding</i> von CD163 durch Isoprostaglandin.....	55
1.2.2.1	Biosynthese und Bezeichnung von Isoprostaglandinen.....	56
1.2.2.2	Biologische Bedeutung der Isoprostaglandine.....	57
1.2.2.3	Induktion des Shedding von CD163 durch 8-iso-Prostaglandin F _{2α}	58
1.2.2.4	Hemmung des 8-iso Prostaglandin F _{2α} -induzierten Shedding von CD163.....	62
1.2.3	Untersuchung der Induktion des <i>ectodomain shedding</i> von CD163 durch Cyclosporin A.....	65
1.2.3.1	Bedeutung und Wirkung von Cyclosporin A.....	66
1.2.3.2	Induktion des Shedding von CD163 durch Cyclosporin A.....	67
1.2.3.3	Hemmung des Cyclosporin A-induzierten Shedding von CD163.....	70
1.2.4	Untersuchung des Shedding von CD163 durch die Kombination der sheddinginduzierenden Verbindungen.....	74
1.3	Untersuchung der inhibitorischen Wirkung neu entwickelter Hydroxamsäure-Derivate auf H ₂ O ₂ -induziertes Shedding von CD163.....	79
1.4	Untersuchung der Produktion von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).....	82
1.4.1	Luminolsensitive Chemolumineszenz.....	82
1.4.2	Freisetzung von ROS durch sheddinginduzierende Reagenzien.....	83
1.4.3	Inhibierung der H ₂ O ₂ -induzierten ROS-Freisetzung.....	90
1.5	Vergleich der Induktion des Shedding von CD163 mit dem Shedding des Tumor necrosis factor-α (TNF-α).....	95
1.5.1	Tumor necrosis factor-α (TNF-α).....	95
1.5.2	Prinzip der Bestimmung.....	96
1.5.3	Untersuchung der Freisetzung von TNF-α.....	96
2	sCD163 und 8-iso Prostaglandin F_{2α} in bronchoalveolärer Lavage Flüssigkeit (BALF) von Patienten mit Cystischer Fibrose	103
2.1	Cystische Fibrose.....	104
2.2	Rekombinante humane DNase I (Dornase alpha) in der Therapie der Cystischen Fibrose.....	106
2.2.1	Einfluss von rhDNase I auf die Entzündung bei Cystischer Fibrose.....	106
2.3	Untersuchung von sCD163 und 8-iso Prostaglandin F _{2α} in bronchoalveolärer Lavage Flüssigkeit (BALF) von Patienten mit Cystischer Fibrose.....	108
2.3.1	Konzentrationsbestimmung von sCD163 und 8-iso PGF _{2α} in bronchoalveolärer Lavage Flüssigkeit (BALF).....	109
2.3.2	Vergleich und Bewertung der Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung von sCD163 und 8-iso PGF _{2α} in BALF von Patienten mit CF.....	114
3	Interaktion von sCD163 mit aktivierten humanen T-Lymphocyten.....	118
3.1	sCD163 in humanen T-Lymphocyten.....	118
3.1.1	Quantitative Bestimmung von sCD163 in nativen humanen T-Lymphocyten einzelner Spender.....	119

3.1.2	Vergleich der intrazellulären Konzentration an sCD163 in T-Lymphocyten mit der Plasmakonzentration von sCD163 einzelner Spender	121
3.1.3	Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von sCD163 in T-Lymphocyten	124
3.2	Untersuchung zur Interaktion des sCD163 mit seinem spezifischen Interaktionspartner Myosin II Typ A in T-Lymphocyten	126
3.2.1	Myosin II	127
3.2.2	Bildung intrazellulärer sCD163-Myosin-Komplexe	128
3.2.3	Entwicklung eines ELISA zum Nachweis von sCD163-Myosin-Komplexen	129
3.2.4	Nachweis der sCD163-Myosin-Komplexe in T-Lymphocyten	130
3.2.4.1	sCD163-Myosin-Komplexe in aktivierten T-Lymphocyten	131
3.2.4.2	sCD163-Myosin-Komplexe in T-Lymphocyten einzelner Spender	133
3.2.5	Bestimmung der Colokalisation von sCD163 und Myosin in T-Lymphocyten	135
4	<i>In-vitro</i>-Untersuchungen zur Stimulation der Expression von CD163 durch Steroidhormone	142
4.1	Dehydroepiandrosteron (DHEA) und seine Metabolite	143
4.2	Prinzip der Bestimmung	145
4.3	Stimulation der Expression von CD163 durch Dehydroepiandrosteron (DHEA) und dessen Metabolite	146
C.	Experimenteller Teil	
1	Häufig verwendete Puffer	157
2	Zellkultur	157
2.1	Reagenzien für die Zellkultur	157
2.1.1	Trennlösungen für die Dichtezentrifugation	157
2.1.2	Medien und Seren	157
2.1.3	Stimulanz für die CD163 Expression	158
2.1.4	Sonstige Reagenzien für die Zellkultur	158
2.2	Geräte und Materialien für die Zellkultur	159
2.3	Isolierung humaner Monocyten	160
2.4	Isolierung humaner T-Lymphocyten	161
2.5	Stimulation der Monocyten zur CD163-Expression	162
2.6	Zellzahlbestimmung	162
3	Immunhistochemische Methoden	163
3.1	Antikörper	163
3.2	Reagenzien und Lösungen	163
3.3	Bestimmung der CD163-Dichte auf der Monocytenoberfläche mittels Durchflusszytometrie (FACS)	164

3.3.1	Antikörperverdünnungen.....	164
3.3.2	Sonstige Reagenzien und Lösungen.....	164
3.3.3	Geräte und Materialien.....	164
3.3.4	Probenvorbereitung.....	165
3.3.5	Messung der CD163-Dichte auf der Monocytenoberfläche.....	165
3.3.6	Auswertung der FACScan Analyse.....	167
3.4	Bestimmung der Konzentration von sCD163 mittels Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).....	167
3.4.1	Antikörperverdünnungen.....	167
3.4.2	Reagenzien und Lösungen.....	168
3.4.3	Geräte und Materialien.....	168
3.4.4	Probenvorbereitung.....	168
3.4.5	Durchführung des ELISA zur Bestimmung der Konzentration des sCD163.....	169
3.4.6	Auswertung des sCD163-ELISA.....	169
3.5	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) zur Bestimmung von intrazellulären sCD163-Myosin-Komplexen.....	170
3.5.1	Antikörperverdünnungen.....	170
3.5.2	Reagenzien und Lösungen.....	170
3.5.3	Geräte und Materialien.....	171
3.5.4	Probenvorbereitung.....	171
3.5.5	Durchführung des ELISA zur Bestimmung von intrazellulären sCD163-Myosin-Komplexen.....	171
3.6	Bestimmung der anti Myosin IgG-Konzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA).....	172
3.6.1	Reagenzien und Lösungen.....	172
3.6.2	Herstellung der Probe- und Kalibrierlösungen.....	172
3.6.3	Durchführung der BCA-Methode.....	172
3.7	Untersuchung der Lokalisation von sCD163 und Myosin in T-Lymphocyten mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	173
3.7.1	Antikörperverdünnungen.....	173
3.7.2	Sonstige Reagenzien und Lösungen.....	173
3.7.3	Geräte und Materialien.....	174
3.7.4	Zellfixierung.....	174
3.7.5	Zellmarkierung.....	175
3.7.6	Aufnahme der fluoreszenzmikroskopischen Bilder.....	176
3.7.7	Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen.....	176
3.8	Bestimmung der Konzentration von 8-iso Prostaglandin F _{2α} in bronchoalveolärer Lavage Flüssigkeit (BALF).....	177
3.8.1	Reagenzien.....	177
3.8.2	Geräte und Materialien.....	177
3.8.3	Herstellung der Probe- und Kalibrierlösungen.....	177
3.8.4	Bestimmung der Konzentration des 8-iso Prostaglandin F _{2α}	177
3.8.5	Auswertung.....	179

3.9	Bestimmung der Konzentration des Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α)	180
3.9.1	Reagenzien.....	180
3.9.2	Geräte und Materialien	180
3.9.3	Stimulation der Monocyten zur Freisetzung des TNF- α	180
3.9.4	Bestimmung der Konzentration des TNF- α	181
3.9.5	Auswertung.....	182
3.10	Bestimmung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) mittels Chemolumineszenz	182
3.10.1	Reagenzien und Lösungen.....	182
3.10.2	Geräte und Materialien	183
3.10.3	Probenvorbereitung und Messung	183
3.10.3.1	Analyse der Bildung Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).....	183
3.10.3.2	Analyse der Hemmung der H ₂ O ₂ -induzierten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).....	184
3.10.3.3	Auswertung	186
4	Proteinchemische Methoden.....	187
4.1	Herstellung von Proteinextrakten.....	187
4.1.1	Herstellung von Monocyten-Lysaten.....	187
4.1.2	Herstellung von T-Lymphocyten-Lysaten.....	187
4.2	Bestimmung der <i>In-vitro</i> -Bildung von löslichem CD163 (sCD163).....	188
4.2.1	Reagenzien für die Abspaltung des sCD163.....	188
4.2.2	Stimulation der Monocyten zur Abspaltung des sCD163 von der Zelloberfläche.....	188
4.3	Bestimmung der <i>In-vitro</i> -Hemmung der Bildung von löslichem CD163 (sCD163).....	189
4.3.1	Inhibitoren	189
4.3.2	Bestimmung der Wirkung von Inhibitoren auf Abspaltung des sCD163 von der Monocytenoberfläche	190
4.4	<i>In-vitro</i> -Untersuchung zur Hormon-induzierten Expressierung von CD163 auf der Monocytenoberfläche.....	191
4.4.1	Untersuchte Hormone.....	191
4.4.2	Stimulation der Monocyten zur Expression von CD163	191

D. Tabellarischer Anhang

1	<i>In-vitro</i>-Untersuchungen zur Abspaltung des löslichen sCD163 von der Zelloberfläche humaner Monocyten.....	195
1.1	Einzelergbnisse der Bestimmung der CD163-Dichte auf der Monocytenoberfläche	195
1.1.1	Einzelergbnisse des Shedding von CD163 mit Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	195
1.1.2	Einzelergbnisse des Shedding von CD163 mit S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP)	196
1.1.3	Einzelergbnisse der Bestimmung des konzentrationsabhängigen Shedding von CD163 mit 8-iso Prostaglandin F _{2α} (8-iso PGF _{2α}) und Prostaglandin F _{2α} (PGF _{2α}).....	196
1.1.4	Einzelergbnisse des Shedding von CD163 mit 8-iso Prostaglandin F _{2α} (8-iso PGF _{2α}).....	197

1.1.5	Einzelergbnisse des Shedding von CD163 mit Cyclosporin A (CsA).....	197
1.1.6	Einzelergbnisse des Shedding von CD163 durch Kombinationen von Induktoren	198
1.1.7	Einzelergbnisse der Bestimmung des Einflusses der Inhibitoren auf das Shedding von CD163	199
1.1.8	ANOVA-Statistik, einseitige Varianzanalyse der Bestimmung der CD163-Dichte auf der Monocytenoberflche	199
1.1.8.1	Shedding von CD163 mit Wasserstoffperoxid.....	199
1.1.8.2	Shedding von CD163 durch S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP)	200
1.1.8.3	Shedding von CD163 durch 8-iso Prostaglandin F _{2α} (8-iso PGF _{2α})	200
1.1.8.4	Shedding von CD163 durch Cyclosporin A (CsA)	200
1.1.8.5	Einfluss der Inhibitoren auf das Shedding von CD163	201
1.2	Einzelergbnisse der Bestimmung von sCD163 im Zellberstand mittels spezifischem ELISA	201
1.3	Einzelergbnisse der Untersuchung von neuen Hydroxamsure-Derivaten auf H ₂ O ₂ -induziertes Shedding von CD163	202
1.4	Einzelergbnisse der <i>In-vitro</i> -Bestimmung der Produktion von ROS	203
1.4.1	Einzelergbnisse der Produktion von ROS durch sheddinginduzierende Verbindungen	203
1.4.2	Einzelergbnisse des Inhibierung der H ₂ O ₂ -induzierten Chemolumineszenz	204
1.5	Einzelergbnisse des Konzentrationsbestimmung von TNF-α	205
2	Einzelergbnisse der Bestimmung von sCD163 und 8-iso PGF_{2α} in BALF von Patienten mit Cystischer Fibrose	206
2.1	Einzelergbnisse der Proben nach Behandlung mit rhDNase I (Interventionsgruppe)	206
2.2	Einzelergbnisse der Proben nach Behandlung mit rhDNase I (Kontrollgruppe).....	208
3	Interaktion von sCD163 mit aktivierten humanen T-Lymphocyten.....	210
3.1	Einzelergbnisse der Bestimmung der Konzentration von sCD163 in humanen Spezimen verschiedener Blutspender	210
3.2	Einzelergbnisse der Bestimmung der Menge sCD163-Myosin-Komplexe in humanen T-Lymphocyten.....	211
3.2.1	Einzelergbnisse der Bestimmung in T-Lymphocyten verschiedener Spender.....	211
3.2.2	Einzelergbnisse der Bestimmung in humanen T-Lymphocyten gepoolter Spender	212
3.2.2.1	ANOVA-Statistik, einseitige Varianzanalyse	212
4	Stimulation der Expression von CD163 durch Steroidhormone	213
4.1	Einzelergbnisse der Stimulation der Expression von CD163 durch Steroidhormone	213
4.2	ANOVA-Statistik, einseitige Varianzanalyse der Bestimmung der CD163-Dichte auf der Monocytenoberflche	214
E.	Zusammenfassung	215
F.	Abkürzungsverzeichnis	223
G.	Literaturverzeichnis	225

A. Einleitung

1 Einleitung

Das Immunsystem des Menschen dient dazu, Schäden vom Organismus abzuhalten, die dessen Unversehrtheit bedrohen. Es existieren im menschlichen Körper verschiedene Mechanismen, pathogenen Stoffe zu entgiften oder zu inaktivieren und soweit abzubauen, dass sie eliminiert werden können.

Am Ablauf der Immunreaktionen ist ein Netzwerk aus Zellen, löslichen Botenstoffen und Effektormolekülen beteiligt, die über den Körper verteilt sind. Zu den Organen des Immunsystems zählen das lymphatische System, das Knochenmark, die Milz, der Thymus, die Tonsillen sowie die Oberflächen der Haut, der Mukosa und der Alveolen.

Aufgrund seiner Evolution und der unterschiedlichen Funktionen werden die Abwehrmechanismen in das angeborene, unspezifische Immunsystem und das erworbene, spezifische Immunsystem eingeteilt. Die unspezifische Immunantwort erfolgt direkt nach Erstkontakt und ist in ihrer Intensität unabhängig von dem induzierenden Fremdstoff. Außerdem wird kein immunologisches Gedächtnis aufgebaut. Im Gegensatz dazu wird bei der spezifischen Immunantwort ein immunologisches Gedächtnis aufgebaut, so dass bei einem weiteren Kontakt des Organismus mit dem Fremdstoff dieser rascher eliminiert werden kann [1, 2].

Die Immunantwort wird in erster Linie von Zell- und Plasmabestandteilen des zirkulierenden Blutes getragen. Daraus wird eine weitere Gliederung in einen zellulären Teil, der vor allem gegen virusinfizierte Zellen, Pilze, Parasiten und fremde Gewebe gerichtet ist, und in einen humoralen Teil (lat. *humor*, Flüssigkeit), der sich gegen bakterielle Infektionen und die extrazelluläre Phase von Virusinfektionen richtet, abgeleitet.

Reguliert wird das Immunsystem durch eine gegenseitige Stimulation und Repression von jedem seiner Bestandteile.

1.1 Pathophysiologie der Entzündung

Die Entzündung ist ein zentraler Vorgang, durch den der Körper in eine erhöhte Abwehrbereitschaft versetzt wird, schädigende Einflüsse zu neutralisieren und die Integrität des Organismus wieder herzustellen. Die fünf klassischen Symptome einer Entzündung sind der Schmerz (lat. *dolor*), eine lokale Wärmeentwicklung und Fieber (lat. *calor*), die Rötung

(lat. *rubor*), die Schwellung (lat. *tumor*) und die Funktionseinschränkung bzw. -verlust (lat. *functio laesa*) des entsprechenden Gewebes.

Entzündungsreaktionen manifestieren sich zumeist in einem bestimmten Organ. Dabei verlassen die zirkulierenden Immunzellen die Blutbahn und infiltrieren das betroffene Gewebe (lokale Entzündung). In der Regel haben Entzündungsreaktionen einen kurzzeitigen Verlauf und kommen innerhalb weniger Tage oder Wochen auf Grund der Eliminierung der Noxe wieder zum Stillstand. Entzündungsreaktionen mit kurzer Dauer werden auch als akute Entzündungen bezeichnet. Ist eine Entzündung, wie der Septische Schock, sehr intensiv oder dauert sie sehr lange an, können sich die Entzündungsreaktionen gegen den eigenen Körper richten. Die dadurch verursachten Schäden können den Nutzen dieses Prozesses überlagern, so dass die Entzündung selbst einen Krankheitswert erlangt. Lange andauernde chronische Entzündungen treten auf, wenn der Körper das auslösende Agens nicht beseitigen kann oder die Immunreaktionen sich gegen körpereigene Substanzen richten (Autoimmunität) [3].

Pathophysiologisch besteht eine Entzündung aus der Mobilisierung und Aktivierung der Zellen des Immunsystems, von denen während einer Entzündungsreaktion eine Vielzahl an Mediatoren freigesetzt werden (Tab. 1).

Tab. 1: Mediatoren der entzündlichen Reaktionen (Auswahl nach Illes et al. [4]).

Enzyme	Proteasen, Phospholipasen
Lipidmediatoren	Prostaglandine, Leukotriene, Plättchen-aktivierender Faktor (PAF)
Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies	Superoxidradikalanion, Wasserstoffperoxid, Stickstoffmonoxid
Cytokine	Interferon- γ , Interleukine-1, -6, <i>Tumor necrosis factor</i> (TNF), Chemokine, Kolonie-stimulierende Faktoren (CSF)
Komplementfaktoren	
Gerinnungsfaktoren	
Wachstumshormone	

Die Mediatoren bewirken einen Großteil der unspezifischen Immunabwehr und sind gleichzeitig für die Ausbildung der Entzündungssymptome verantwortlich. Einige Mediatoren, wie die Enzyme, sind in den Zellen des Immunsystems gespeichert. Andere, wie die Lipidmediatoren und reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies, werden während einer Entzündung synthetisiert und freigesetzt.

Zu den Zellen des Immunsystems gehören vor allem hämatopoetische Zellen, wie die Leukocyten, die sich in Granulocyten, Lymphocyten und Monocyten untergliedern, sowie dendritische Zellen und einige nichthämatopoetische Zellen [5].

1.2 Hämatopoetische Zellen des Immunsystems

Die Bildung von Blutzellen ist ein dynamischer und streng regulierter Prozess. Alle Blutzellen stammen von einer kleinen Population von Vorläuferzellen ab. Diese Vorläuferzellen sind pluripotente hämatopoetische Stammzellen, die im Knochenmark lokalisiert sind [6] (Abb. 1).

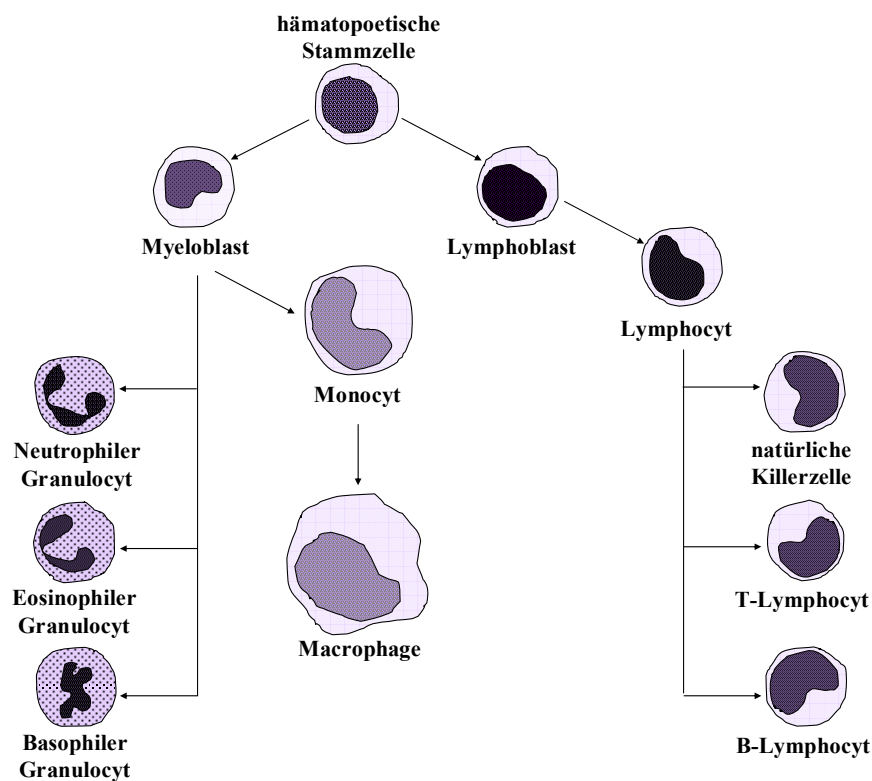


Abb. 1: Hämatopoetisches System der Zellen des Immunsystems. Entwicklung der Granulocyten, Monocyten und Lymphocyten aus hämatopoetischen Stammzellen (modifiziert nach Clark und Kamen [7]).

Aus den hämatopoetischen Stammzellen differenzieren sich zwei Hauptzelllinien aus. Dies sind die lymphatische und die myeloide Zelllinie. Aus der lymphatischen Zelllinie gehen die natürlichen Killerzellen und die T- und B-Lymphocyten hervor. Die myeloiden Vorläufer sind die Ausgangszellen von Granulocyten, Monocyten/Macrophagen, Thrombocyten und Erythrocyten. Die weitere Ausdifferenzierung zu den verschiedenen Blutzellen erfolgt unter dem Einfluss von Cytokinen, wie Interleukinen oder hämatopoetischen Wachstumsfaktoren [8, 9].

Nach histologisch-morphologischen Merkmalen werden die Leukocyten in zwei Gruppen unterteilt. Bei der einen Gruppe, den Granulocyten, handelt es sich um Leukocyten mit spezifischen Granula und vielgestaltigem Zellkern. Die andere Gruppe, die Leukocyten ohne spezifische Granula und mit einem einheitlichen Zellkern umfasst, enthält die Monocyten und Lymphocyten.

Beim Gesunden ist die Zahl der reifen Leukocyten im Blut im Vergleich zu Erythrocyten und Thrombocyten sehr gering, da Leukocyten den Blutstrom lediglich als Transportvehikel benutzen und rasch in die umliegenden Gewebe einwandern (Tab. 2).

Tab. 2: Mengenverteilung der Leukocyten beim gesunden Erwachsenen (nach Begemann [10]).

Zelltyp		Normalwerte in Giga (10^9)/Liter	Mengenverteilung in Prozent [%]
Granulocyten:	Neutrophile	2,2 – 6,3	55 – 70
	Eosinophile	0,08 – 0,36	2 - 4
	Basophile	0,0 – 0,09	0 - 1
Lymphocyten		1 – 3,6	25 - 40
Monocyten		0,08 – 0,54	2 - 6

1.2.1 Granulocyten

Die Granulocyten stellen mengenmäßig den größten Teil der Leukocyten im menschlichen Blut dar.

Je nach Färbeverhalten der spezifischen Granula werden die Granulocyten in Neutrophile, Eosinophile und Basophile unterteilt.

Neutrophile Granulocyten weisen einen stark zerlappten Zellkern auf, so dass sie auch als polymorphkernige Granulocyten bezeichnet werden. Es sind phagozytierende Zellen, die auf Grund einer raschen Einwanderung und Freisetzung von Entzündungsmediatoren eine Abwehr gegen bakterielle Erreger darstellen. In ihren Granula sind große Mengen lysosomaler Enzyme, wie Hydrolasen, Elastase, Myeloperoxidase und Phosphatasen, Kollagenasen und Proteine gespeichert, die an der Abwehr von Fremdstoffen im Körper beteiligt sind [11]. Ein weiteres Kennzeichen von Neutrophilen ist die Aktivierung des oxidativen Stoffwechsels mit der Bildung freier Sauerstoffradikale, über die Pathogene abgetötet werden [12, 13].

Über die basophilen Granulocyten ist nur wenig bekannt. Sie weisen große Ähnlichkeit mit Mastzellen auf, die jedoch aus anderen Vorläuferzellen entstehen. Auf der Oberfläche der Basophilen sind verschiedene Adhäsionsmoleküle lokalisiert, die den gezielten Austritt aus dem Gefäßsystem in das entzündete Gewebe ermöglichen. In den Granula sind verschiedene Enzyme und vasoaktive Verbindungen, wie Histamin und Serotonin, enthalten [14]. Basophile Granulocyten sind an der Allergischen Reaktion vom Soforttyp und an Hypersensibilisierungen beteiligt.

Eosinophile Granulocyten spielen bei der Abwehr von Parasiten eine Rolle. In den Granula werden hierfür Proteine und Enzyme gespeichert. Im Gegensatz zu den Neutrophilen und Basophilen findet von den Eosinophilen keine Phagozytose statt. Nach Aktivierung der Eosinophilen werden Cytokine, Prostaglandine und Leukotrien 4 produziert, gespeichert und nach Transport an die Zelloberfläche über längere Zeiträume freigesetzt [15]. Ebenfalls in den Granula sind entzündungshemmende Enzyme, wie Arylsulfatase, Phospholipase D und Histaminase, enthalten, mit deren Hilfe eine Entzündung abgeschwächt oder beendet werden kann [15].

1.2.2 Lymphocyten

Lymphocyten stellen keine einheitliche Zellpopulation dar, sondern unterscheiden sich in Herkunft, Lokalisation im Lymphsystem, Lebensdauer, Oberflächenmarker und Funktion. Die Funktion der Lymphocyten wird durch die jeweilige Antigenstruktur auf ihrer Zelloberfläche

bestimmt. Oberflächenantigene enthalten Epitope, über die sie von verschiedenen Antikörpern erkannt werden können. Sie werden allgemein nach dem *cluster of differentiation* (CD)-System benannt, das sich speziell auf Oberflächenmoleküle humaner Zellen ausrichtet [16]. Jedes Antigen erhält nach dieser Nomenklatur das Präfix „CD“ mit einer fortlaufenden Nummerierung.

Je nach Bildungsort werden B- und T-Lymphocyten unterschieden. Während die Ausbildung der B-Lymphocyten vollständig im Knochenmark (engl. *bone marrow*) abläuft, wandern die Vorläuferzellen von T-Lymphocyten in den Thymus ab, in dem sie vollständig ausreifen. Von ihren Bildungsorten gelangen die reifen Lymphocyten über die Blutbahn in die lymphatischen Organe, wie Milz, Lymphknoten oder Tonsillen.

Die B-Lymphocyten sind verantwortlich für die humorale Immunantwort. Auf ihrer Zelloberfläche tragen sie Immunglobuline, die als Rezeptoren für Fremdstoffe dienen. Nach Bindung dieser Fremdstoffe proliferieren die B-Lymphocyten zu Plasmazellen, die in der Lage sind, Antikörper gegen diesen Fremdstoff zu produzieren und zu sezernieren.

T-Lymphocyten sind an der zellulären Immunantwort beteiligt. Sie reagieren direkt mit dem pathologischen Antigen, wobei durch die Subpopulation der cytotoxischen T-Lymphocyten die antigentragende Zelle zerstört wird. Eine weitere Subpopulation, die T-Helferzellen (T_H -Lymphocyten), sezernieren verschiedene Mediatoren, die die unspezifischen Zellen des Immunsystems, Monocyten/Macrophagen und Granulocyten, zu erhöhter Aktivität stimulieren [17]. Nach Art der sezernierten Cytokine können zwei Gruppen der T-Helferzellen unterschieden werden. T_H -1-Lymphocyten setzen den Wachstumsfaktor für T-Lymphocyten IL-2 und Interferon- γ frei und fördern so die zellulären Entzündungsreaktionen [18]. T_H -2-Zellen regulieren durch Sekretion verschiedener Interleukine die Antikörpersynthese.

1.2.3 Monocyten/Macrophagen

Monocyten sind mononukleäre Zellen, deren euchromatischer Zellkern auf eine ständige Biosyntheseaktivität hinweist und eine meist ovale bis nierenförmige Gestalt besitzt (Abb. 1). Mit einem Durchmesser von 12 bis 20 μm handelt sich um große Zellen.

Nach der Bildung im Knochenmark zirkulieren Monocyten nur wenige Stunden bis Tage im Blut und wandern dann nach Adhäsion an das Endothel durch Lücken zwischen den

Endothelzellen ins Gewebe (Diapedese) [19]. Nach dieser Transmigration wandeln sie sich gewebespezifisch in Macrophagen um [20]. Macrophagen sind langlebige Zellen, die etwas größer sind als Monocyten und die Fähigkeit zur Phagocytose besitzen. Auf Grund ihrer phagocytierenden Eigenschaften stellen sie einen wichtigen Bestandteil der Infektabwehr dar. Je nach Lokalisation werden die Macrophagen als Alveolar-Macrophagen in der Lunge, Mikroglia-Zellen im Zentralen Nervensystem, Kupffersche Sternzellen in der Leber, Osteoklasten im Knochen oder Histiocyten in sonstigen Geweben bezeichnet [21].

Monocyten/Macrophagen können sowohl als akzessorische Zellen als auch als Effektorzellen tätig werden. Als akzessorische Zellen präsentieren sie auf der Oberfläche Antigene, die von T-Lymphocyten erkannt werden und synthetisieren Proteine, die zur Aktivierung der T-Lymphocyten führen. Als Effektorzellen werden sie selbst von Cytokinen aus stimulierten T-Lymphocyten zur Phagocytose aktiviert. Dabei gelangen sie durch aktive Migration entlang eines aufsteigenden Konzentrationsgradienten der proinflammatorischen Cytokine zum Ort der Phagocytose (Chemotaxis) [22]. Daneben sezernieren sie eine Vielzahl von Enzymen, einen Großteil der Komplementkomponenten, reaktive Sauerstoffspezies, Cytokine, wie IL-1 oder den *Tumor necrosis factor- α* , und verschiedene Wachstumsfaktoren.

Im nichtentzündeten Organismus werden Macrophagen als residente Zellen bezeichnet. Ihre Aufgabe ist die Beseitigung alternder Zellen. Darüber hinaus sind Macrophagen in der Lage, pathogene Fremdstoffe, wie Bakterien, unspezifisch aufzunehmen und zu verdauen. Eine Verknüpfung mit der humoralen Immunantwort besteht auf Grund einer effizienteren Phagocytosefähigkeit, wenn die zu phagocytierenden Verbindungen mit Antikörpern oder Komplementkomponenten beladen sind.

1.3 Heterogenität von Monocyten/Macrophagen

Monocyten/Macrophagen weisen eine große Heterogenität in den von ihnen auf der Zelloberfläche exprimierten Antigenen auf. Über diese Oberflächenantigene können die Monocyten/Macrophagen hinsichtlich eines bestimmten Differenzierungsstadiums oder Aufenthaltsortes charakterisiert werden [23]. Die jeweiligen Antigene können als Marker zur Unterscheidung der verschiedenen Zellpopulationen genutzt werden, indem sie über spezifische Antikörper detektiert werden.

Neben dem Phänotyp der Oberflächenantigene können Monocyten-/Macrophagensubpopulationen auch über Unterschiede in der Fähigkeit zur Phagocytose [24, 25], dem Sekretionsmuster der Cytokine [26, 27], der Zellgröße oder dem Adhäsionsverhalten [28] charakterisiert werden.

Gründe für diese Heterogenität könnten in einer unterschiedlichen Aktivierung der Zellen durch die jeweilige Umgebung liegen [29]. Da die Zellen je nach Gewebe unterschiedliche Aufgaben übernehmen, ist auch eine gewebespezifische Aktivierung der Monocyten/Macrophagen möglich. Ebenfalls denkbar ist eine direkte Abhängigkeit der Heterogenität vom jeweiligen Entwicklungsstadium der Zelle. Die unterschiedliche Differenzierung der Zellen könnte auch bereits im Knochenmark selbst determiniert sein. Möglich sind genetische Unterschiede der Vorläuferzellen oder eine unterschiedliche Bildungsstimulation. Da bekannt ist, dass aus dem Knochenmark Monocyten unter physiologischen Bedingungen freigesetzt werden und eine verstärkte Generierung durch immunologische Veränderungen erfolgen kann, ist es auch denkbar, dass je nach Stimulanz unterschiedlich ausgestattete Zellen freigesetzt werden [30].

1.3.1 Methode zur Charakterisierung von Zellen des Immunsystems

Eine der wichtigsten Methoden der Immunologie zur Unterscheidung der Subpopulationen der Immunzellen ist die Durchflusszytometrie oder FACS-Analyse (engl. *Fluorescence activated cell sorting*). Bei dieser Methode handelt es sich um ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenproteinen [31]. Grundlage hierfür ist die Tatsache, dass Zellen mit unterschiedlichen Funktionen unterschiedliche Oberflächenproteine tragen.

Zur Markierung von Zellen werden an die Oberflächenproteine Antikörper gebunden. In zwei aufeinander folgenden Schritten wird zunächst ein spezifischer Primärantikörper und anschließend ein gegen den Primärantikörper gerichteter Sekundärantikörper gebunden, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist [31].

Zur Analyse werden Zellen in einer Suspension unter Druck durch eine Kapillare geleitet. Dadurch wird ein feiner Tropfenstrahl erzeugt, in dem jeder Tropfen nur eine einzige Zelle enthält (Abb. 2).

Dieser Tropfenstrahl wird an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Durch den monochromatischen Laserstrahl werden die Elektronen des

Fluoreszenzfarbstoffes angeregt. Anschließend fallen die Elektronen unter Energieabgabe auf ihr Ursprungsniveau zurück. Durch die Lichtbeugung und -streuung erhält man Informationen über verschiedene Zellparameter (Zellzahl, Zellgröße, Granularität).

Die Vorwärtsstreuung, die Lichtstreuung entlang der Achse des einfallenden Laserstrahls, wird durch Beugung des Lichtes an der Zelloberfläche erzeugt und gibt Auskunft über die Zellgröße.

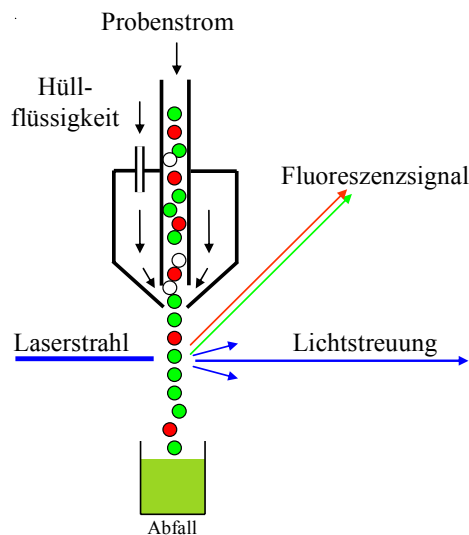


Abb. 2: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers (Modell modifiziert nach Ormerod [31]).

Die Seitwärtsstreuung wird in einem Winkel von 90° zum einfallenden Laserstrahl gemessen und ist ein Maß für die Granularität der Zellen, da sie durch unterschiedliche Zellbestandteile erzeugt wird. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird ebenfalls in einem Winkel von 90° zum einfallenden Laserstrahl detektiert. Seine Intensität ist direkt proportional zur Menge des gebundenen Sekundärantikörpers und somit proportional zur Menge des Oberflächenantigens auf der Zelle.

1.4 CD163 – ein monocyten-/macrophagenspezifisches Oberflächenantigen

Bei Untersuchungen neuartiger Differenzierungsantigene wurde ein monoklonaler Antikörper RM3/1 entwickelt und charakterisiert, der ein Antigen detektiert, das ausschließlich auf der Zelloberfläche humaner Monocyten und Macrophagen exprimiert wird [32]. Genauere Untersuchungen der Monocyten/Macrophagen ergaben, dass etwa 20 % frisch isolierte Zellen das Antigen auf der Oberfläche aufwiesen und die Verteilung im Körper sich auf Gewebe beschränkte, die Zellen monocytären Ursprungs enthielten. Hierzu zählen vor allem die rote Pulpa der Milz, die Leber, Lymphknoten, der Thymus [33] und die Plazenta [34].

Nach Isolierung und Teilsequenzierung des Proteins ergab sich eine Sequenzübereinstimmung mit einem als M130 bekannten Protein [35], das nach der CD-Nomenklatur (Einleitung, 1.3) international als CD163 bezeichnet wurde [36].

1.4.1 Biochemische Charakterisierung

CD163 ist charakterisiert als ein Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von circa 130 kDa, das einen 25 bis 30 kDa großen Anteil N-glycosidisch gebundener mannosereicher Zuckerreste trägt [37]. Als transmembranäres Protein besitzt CD163 einen kurzen intrazellulären C-terminalen Teil, einen transmembranären Abschnitt und einen großen charakteristischen N-terminalen extrazellulären Teil (Abb. 3).

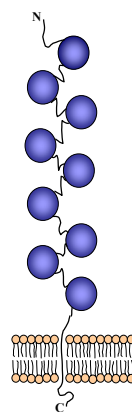


Abb. 3: Schematische Darstellung der Struktur des CD163 auf der Oberfläche eines Monocyten/Macrophagen. Die Kreise repräsentieren charakteristische Proteindomänen (modifiziert nach Resnick et al. [38]).

Neben dem RM3/1 sind weitere Antikörper bekannt, die gegen CD163 gerichtet sind. Hierzu gehören Ki-M8, GHI/61, Ber-Mac3 [39] und Mac2-48 [40].

Nach Isolierung der cDNA aus Monocyten konnte von Högger et al. ein vollständiger DNA-Klon der vorwiegend vorkommenden Variante des CD163 und dreier seltenerer Splicevarianten dargestellt werden [36]. Die Unterschiede in den einzelnen Isoformen liegen vor allem im cytoplasmatischen Bereich.

Neben der membrangebundenen Form konnte in verschiedenen Untersuchungen die Existenz eines löslichen CD163 nachgewiesen werden [41, 42]. Durch Analyse der Aminosäuresequenz konnte für das CD163 eine Zugehörigkeit zur Familie der cysteinreichen Scavengerrezeptoren Gruppe B ermittelt werden [36]. Proteine dieser Familie kommen überwiegend auf Zellen des Immunsystems vor und sind an der Entwicklung des Immunsystems und der Regulation der Immunantwort beteiligt [43].

1.4.1.1 Die Proteinfamilie der cysteinreichen Scavengerrezeptoren (SRCR)

Die cysteinreichen Scavengerrezeptoren (SRCR; engl. *Scavenger receptor cysteine-rich*) gehören zu einer bereits seit langem bekannten Proteinfamilie mit hochkonservierten Proteindomänen. Die einzelnen Domänen bestehen aus circa 110 Aminosäureresten, die sequenzspezifisch positionierte Cysteinreste enthalten. Alle Mitglieder dieser Familie sind entweder membranständige oder lösliche Proteine von Zellen des Immunsystems [38, 43, 44]. Viele dieser Proteine sind an der Entwicklung des Immunsystems oder der Regulation der Immunantwort beteiligt.

Basierend auf der Anzahl der Aminosäure Cystein in den einzelnen Domänen, den Abständen zwischen den Cysteinresten und der Exonkodierung können die SRCR in zwei Gruppen eingeteilt werden [43] (Abb. 4).

Die Mitglieder der Gruppe A enthalten jeweils sechs Cysteinreste pro Domäne und werden von zwei Exons kodiert. Die meisten Proteine der Gruppe B weisen sechs bis acht Cysteinreste und eine Kodierung durch ein einzelnes Exon auf. Proteine der Gruppe A enthalten normalerweise nur eine einzelne SRCR-Domäne, die mit anderen funktionellen Domänen, wie enzymatischen oder kollagenhaltigen Domänen, assoziiert ist. Im Gegensatz dazu besitzen die Proteine der Gruppe B ausschließlich hintereinander geschaltete Wiederholungseinheiten der SRCR-Domäne [43]. CD163 enthält neun der charakteristischen Cysteindomänen [35, 36].

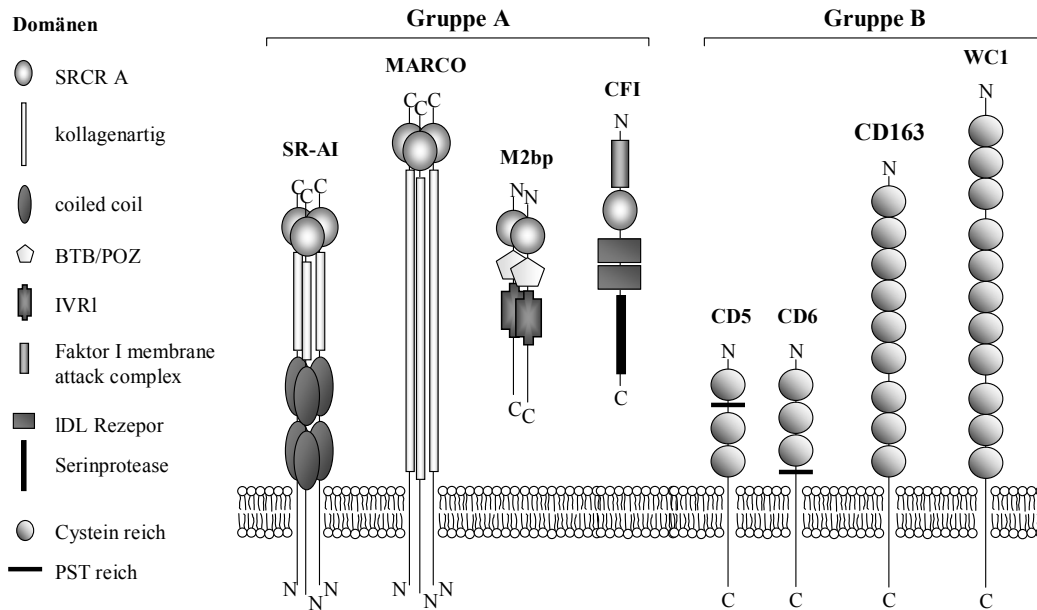


Abb. 4: Strukturmodelle der SRCR-Proteinfamilie. Dargestellt ist eine Auswahl von Proteinen der Gruppe A und B. BTB/POZ: *broad complex, tramtrack, and bric-a-brac/poxvirus and zinc finger*; IVR: *Drosophila kelch protein*, PST: Prolin, Serin, Threonin (modifiziert nach Sarrias et al. [43]).

Zu den Mitgliedern der Gruppe A gehören unter anderem der *Macrophage scavenger receptor A-I* [45], MARCO (*Macrophage receptor with collagenous structure*) [46], M2bp (*MAC-2 binding protein*) [47], CDI (*Complement faktor I*) [48], Enterokinase [49], das *Lysyl oxidase-related protein* [50] und der ausschließlich im Seeigel vorkommende Speract-Rezeptor [51]. Die SRCR-Familie Gruppe B enthält neben CD163 unter anderem das WC1 [52], das dem CD163 strukturell am ähnlichsten ist, sowie CD5 [53], CD6 [54], SP α (*human secretet protein alpha*) [55], M160 [56], PEMA-SREG (*Petromyzon marinus SRCR-EGF protein*) [57], Ebnerin [58], CRP-Duktin [59], Hensin [60] und Mucin der Gallenblase [61].

Neben dem einheitlichen strukturellen Aufbau der einzelnen Domänen der SRCR-Proteine konnten auf funktioneller Basis bisher keine Gemeinsamkeiten ermittelt werden [44].

1.4.2 Heraufregulation von CD163

Die Expression von CD163 kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die basale Expression von Monocyten in Kultur durch Reifung der Zellen zu Macrophagen erhöht wird [32]. Das Maximum der Expression wurde dabei zwischen den Kulturtagen zwei und drei erreicht.

Neben einem konstitutiv vorhandenen Anteil an CD163 auf der Zelloberfläche ist auch eine Induktion der CD163-Expression möglich. Sowohl *in vitro* [32] als auch *in vivo* [36, 62, 63] bewirken Glucocorticoide eine deutliche Erhöhung der CD163-Expression auf der Zelloberfläche von Monocyten/Macrophagen. Andere antiinflammatorische Mediatoren, wie Interleukin-10 oder Interleukin-6, bewirken ebenfalls eine deutliche Induktion der Expression von CD163 [40, 64].

Immunhistologische Analysen von Gewebeschnitten von akut und chronisch entzündeten Geweben zeigten, dass CD163-positive Macrophagen hauptsächlich in chronisch entzündetem Gewebe auftraten und dort vor allem in der Spätphase der Entzündung [65, 66]. Da CD163-positive Macrophagen in hoher Konzentration in der Heilungsphase chronischer Entzündungen zu finden sind [67, 68], wurde vermutet, dass sie eine Bedeutung für die Herabregulation einer Entzündung haben.

1.4.3 Herabregulation von CD163

CD163 wird von der Zelloberfläche von Monocyten und Macrophagen *in vivo* durch einen entzündlichen Reiz der Zellen herabreguliert. *In vitro* erfolgte diese Herabregulation nach Inkubation der Zellen mit inflammatorischen Stimulanzen, wie dem Phorbol ester Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) [36, 37]. Für diesen Vorgang kamen verschiedene Mechanismen in Frage. Zum einen könnte der Phorbol ester die mRNA-Synthese des CD163 beeinflussen. Allerdings trat die beobachtete Verminderung der CD163-Dichte auf der Zelloberfläche bereits nach einer Stunde Inkubation mit dem Phorbol ester auf. Eine Beeinflussung der Proteinsynthese würde eine längere Zeit in Anspruch nehmen und konnte somit als gesuchter Mechanismus ausgeschlossen werden. Die anderen Möglichkeiten waren eine Abspaltung des CD163 von der Zellmembran oder eine Internalisierung des Proteins in die Monocyten/Macrophagen. Droste et al. konnten *in vitro* in Zellüberständen nach Phorbol esterinkubation erhöhte Konzentrationen an CD163 feststellen, nicht jedoch im Zellinneren [41]. Daraus war zu schlussfolgern, dass es sich bei der Herabregulation um eine Abspaltung des CD163 von der Zelloberfläche handeln muss, wodurch die Generierung der löslichen Form des CD163, des sCD163, erfolgt.

1.4.4 Bedeutung und Funktion von CD163

Das monocyten- und macrophagenspezifische CD163 existiert in zwei Formen, von denen beide unterschiedliche Funktionen im Körper ausüben.

Die membrangebundene Form (CD163) wurde als Rezeptor für Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexe identifiziert [69]. Sie ist in der Lage, im Plasma zirkulierendes Hämoglobin durch Endocytose in Macrophagen aufzunehmen [70]. Hämoglobin, das in Erythrocyten und Blut am häufigsten vorkommende Protein, hat in freier Form auf Grund von oxidativen Eigenschaften des Eisens der Hämgruppe eine stark toxische Wirkung. Zur Entgiftung muss Hämoglobin in Macrophagen aufgenommen werden, von denen es zu Bilirubin und Eisen metabolisiert wird (extravaskuläre Hämolyse). Bei Entzündungen, Traumata oder Autoimmunreaktionen können auf Grund von verstärkt ablaufenden Hämolyseprozessen im Blut große Mengen an Hämoglobin freigesetzt werden (intravaskuläre Hämolyse). Haptoglobin, ein in der Leber gebildetes Protein, bindet das freie Hämoglobin irreversibel und transportiert es zu den Macrophagen. Membranständiges CD163 bindet den Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex mit großer Affinität und bewirkt die Aufnahme in die Macrophagen mittels Endocytose. CD163 trägt somit zur Entgiftung des Körpers von oxidativ toxischem Hämoglobin bei.

Über die funktionelle Bedeutung der löslichen Form des CD163 ist bisher wenig bekannt. Da eine Generierung auf Grund eines inflammatorischen Reizes erfolgt [41] und hohe Konzentrationen bei Entzündungen gefunden wurden [71-73], wird dem sCD163 eine antiinflammatorische Bedeutung zugeschrieben. Von Högger et al. wurde gezeigt, dass sCD163 in der Lage ist, die Proliferation von aktivierten T-Lymphocyten zu hemmen [74], wodurch ein antiinflammatorischer Mechanismus für das sCD163 definiert werden konnte. Frings et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass sCD163 die Synthese des proinflammatorischen Enzyms Matrixmetalloproteinase-9 in aktivierten T-Lymphocyten hemmt [75].

1.5 Offene Fragen zur Regulation und Bedeutung von sCD163

Die bisherigen Untersuchungen zur Regulation von CD163 haben gezeigt, dass nach Stimulation von Monocyten mit proinflammatorischen Reagenzien die Zellen *in vitro* zur

Freisetzung des löslichen sCD163 aktiviert werden [41, 76]. *In vivo* wurden hohe Konzentrationen an sCD163 bei entzündlichen Erkrankungen gefunden [71-73]. Deshalb kann angenommen werden, dass die Abspaltung des CD163 auch unter physiologischen bzw. pathophysiologischen Bedingungen stattfindet. Für ein besseres Verständnis der Rolle des sCD163 im Entzündungsgeschehen ist es von Interesse, physiologische Stimulanzen zu identifizieren, die Monocyten/Macrophagen zur Abspaltung des Proteins aktivieren.

Zur Diagnose und Verlaufskontrolle verschiedener Erkrankungen sind biologische Marker von großem Interesse. Das im Entzündungsgeschehen präsente sCD163 bietet gute Voraussetzungen zur Verwendung als Markersubstanz bei chronischen Entzündungen. Es stellte sich somit die Frage, ob eine Korrelation zwischen der Konzentration an sCD163 und dem Verlauf einer entzündlichen Erkrankung besteht. Des Weiteren könnten therapeutische Interventionen vor allem durch antiinflammatorische Substanzen einen Einfluss auf die Konzentration des antientzündlich wirkenden sCD163 haben, wodurch ein Erfolg oder ein Nichtansprechen der medikamentösen Behandlung aufgezeigt werden würde.

Als Mechanismus für die antiinflammatorische Wirkung des sCD163 wurde bisher die Hemmung der T-Lymphocytenproliferation identifiziert [74]. Es konnte noch nicht geklärt werden, auf welche Weise sCD163 mit den T-Lymphocyten interagiert und dieser hemmende Effekt zustande kommt.

Da CD163 konstitutiv auf der Monocyten/Macrophagenoberfläche exprimiert wird, müssen im Körper endogene Verbindungen vorhanden sein, die diese Expression bewirken. Bisher bekannt sind das endogene Glucocorticoid Hydrocortison und Interleukin-10 [40, 64]. Möglicherweise existieren weitere Verbindungen, die zu einer Heraufregulation des CD163 und damit zu immunregulatorischen Vorgängen im Körper beitragen.

Die vorliegende Arbeit sollte einen Beitrag zur Klärung dieser offenen Fragen leisten. Durch Variationen der Monocytenstimulation sollten die Veränderungen der Expression bzw. der Generierung des sCD163 und CD163 untersucht werden und damit die zelluläre Regulation dieses Proteins näher charakterisiert werden.

Zur weiteren Charakterisierung der antiinflammatorischen Wirkung des sCD163 wurden die sCD163-Konzentrationen bei Patienten mit chronischen Entzündungen und die Interaktion des sCD163 mit T-Lymphocyten näher untersucht.

B. Allgemeiner Teil

1 *In-vitro*-Untersuchungen zur Abspaltung des löslichen CD163 von der Monocytenoberfläche

Hohe Konzentrationen der löslichen Form des CD163 (sCD163) wurden *in vivo* vor allem in akuten und chronischen Entzündungen, wie zum Beispiel Rheumatoider Arthritis [72], Leberzirrhose [73] und Spondyloarthropathie [71] gemessen. Voraussetzung für die Generierung des sCD163 ist ein inflammatorischer Reiz der Monocyten/Macrophagen [36, 37].

1.1 Abspaltung der extrazellulären Domäne transmembranärer Proteine (*ectodomain shedding*)

Die Zellantwort auf die Einwirkung exogener Stimulanzen resultiert oft in einem raschen Abfall der Dichte verschiedener regulatorischer Proteine, Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche. Dieser Abfall kann ligandenabhängig in einer Endocytose der Proteine und nachfolgender Degradierung durch lysosomale Proteasen begründet sein (posttranslationale Herabregulation) [77].

Die andere Möglichkeit ist die proteolytische Freisetzung der extrazellulären Domäne transmembranärer Proteine. Dieser Typ der Abspaltung wird als *ectodomain shedding* (Abwerfen der extrazellulären Domäne) bezeichnet.

1.1.1 Mechanismus des *ectodomain shedding*

Der Ausdruck *ectodomain shedding* wurde abgeleitet von der Freisetzung regulatorischer Moleküle auf der Zelloberfläche, die als Substrate für oberflächenaktive Endopeptidasen dienen [78]. Diese Endopeptidasen werden auch *Sheddasen* oder *Secretasen* genannt. Je nach Art der Verankerung des abzuspaltenden Proteins in der Membran handelt es sich bei dem Enzym um eine Protease oder eine Phospholipase [79].

Die Ectodomäne ist der größte, meist sogar der gesamte extrazelluläre Teil des Proteins. Diese Ectodomänen sind normalerweise nicht ligandengebunden und ihre Abspaltung führt zur Bildung biologisch aktiver löslicher Formen der Zellmembranproteine [78]. Die

Abspaltung erfolgt direkt an oder nahe der Zelloberfläche. Durch den Prozess des *ectodomain shedding* kann die Zelle sehr rasch als Reaktion auf Änderungen der Umgebung den Phänotyp der Zelloberfläche ändern und lösliche interzelluläre Regulatoren generieren. Zu den transmembranären Proteinen, von denen bekannt ist, dass eine membrangebundene Form in eine lösliche Form überführt wird, gehören Cytokine, wie der *Tumor necrosis factor- α* (TNF- α) [80, 81], Wachstumsfaktoren, wie der *Transforming growth factor- α* (TGF- α) [82, 83] oder Adhäsionsmoleküle, wie L-Selectin [84, 85] und ICAM-1 [86] (Tab. 3).

Tab. 3: Membranproteine mit löslichen, durch Proteolyse generierten Isoformen (Auswahl nach Hooper et al. [79]).

Typ	Protein	Typ	Protein
Adhäsionsmolekül	CD14	Leukocytäre Antigene	MHC Klasse I
	CD8		CD16
	L-Selektin		CD23
	VCAM-1		CD32
	ICAM-1		CD43
	ICAM-3		CD44
Rezeptoren	IL-6-Rezeptor	Rezeptor-Liganden	TNF- α
	IL-1-Rezeptor		Fas-Ligand
	TNF-Rezeptor I		TGF- α
	TNF-Rezeptor II		CSF-1
	TGF- β -Rezeptor		CD40
	NGF-Rezeptor		
	CD30		
	CD27		
Transferrin-Rezeptor			

Die transmembranären Proteine werden an ihrer so genannten Stielsequenz abgespalten. Diese Stielsequenz ist ein bisher wenig charakterisierter Bereich, der sich zwischen der zelloberflächennahen, extrazellulären Domäne und der transmembranären Region befindet [87]. Bisher konnte noch nicht geklärt werden, ob diese Stielregion ein Erkennungsmotiv für die Spaltung trägt oder ob die Spaltung unabhängig von der Beschaffenheit der Stielregion abläuft [88]. Brakebusch et al. konnten für den TNF- α -Rezeptor I zeigen, dass die Abspaltung weitgehend von einer Spacer-Region zwischen der transmembranären Sequenz und der extrazellulären cysteinreichen Domäne abhängt [89]. Für andere Proteine konnte eine mindestens elf Aminosäuren große Stielregion direkt neben der Zellmembran als

Voraussetzung für eine Spaltung definiert werden [90]. Über die genaue Länge und die Charakteristik dieser Region gibt es allerdings bisher keine Hinweise.

Obwohl *ectodomain shedding* offenbar konstitutiv unter physiologischen Bedingungen abläuft, ist der Vorgang unter pathologischen Verhältnissen, wie Entzündungen, Apoptose und Arthritis, beschleunigt. Der physiologische Mechanismus und die Signalwege, die diesen Prozess regulieren, sind weitgehend unbekannt [79].

1.1.2 Membranprotein-Sekretasen

Die abgespaltenen Proteine sind sehr vielfältig und gehören unterschiedlichen Proteinfamilien an, die keine Sequenzhomologien im Bereich der Spaltstellen aufweisen. Darum wurde angenommen, dass eine Vielzahl verschiedener Proteasen, die als Membranprotein-Sekretasen zusammengefasst werden [79], am Spaltungsprozess beteiligt ist [91]. Der Großteil der bisher bekannten Sekretasen sind Metalloproteinasen, die zur Familie der *α disintegrin and metalloproteinases* (ADAMs) oder zu den Matrixmetalloproteinasen (MMPs) gehören [92].

ADAMs sind transmembranäre Proteine aus der Superfamilie der Zink-Proteasen. Der strukturelle Aufbau gliedert sich in verschiedene Domänen: eine Prodomäne, eine Metalloprotease-, eine Disintegrin-, eine cysteinreiche, eine EGF-ähnliche und eine transmembranäre Domäne sowie einen cytoplasmatischen Schwanz (Abb. 5).

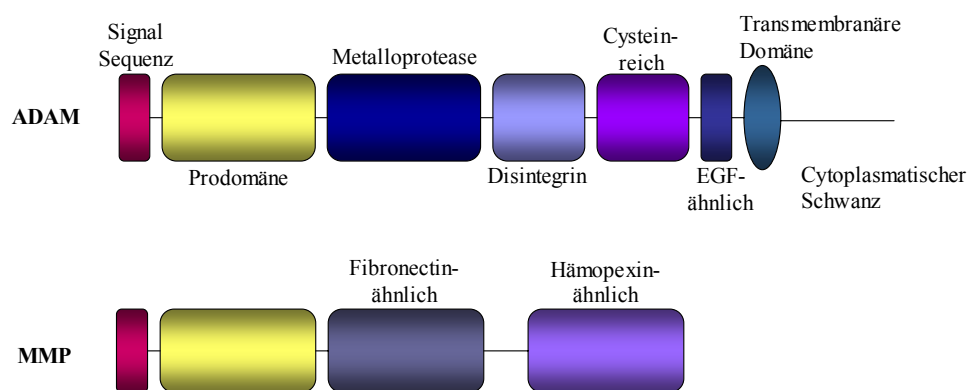


Abb. 5: Schematische Darstellung des Aufbaus von ADAMs und MMPs. Dargestellt sind die Domänen (nach Seals und Courtneidge [93]).

Neben der Bedeutung einiger ADAMs als Sheddasen spielen Enzyme dieser Familie eine Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion, Zellmigration, Muskelentwicklung oder Fertilisation [94].

Durch ihre Wirkung in der Abspaltung von Cytokinen und Cytokin-Rezeptoren tragen sie zur Entstehung entzündlicher Erkrankungen bei. Als Sheddasen identifiziert sind ADAM9, ADAM12, ADAM17 (TACE) und ADAM19 [93]. Die Familie der MMPs gehört zur Metzincin-Superfamilie. Bei den Enzymen handelt es sich um Endopeptidasen, die, wie die ADAMs, ein Zink-Ion im aktiven Zentrum besitzen. Strukturell haben sie große Ähnlichkeit mit den ADAMs (Abb. 5). MMPs bestehen aus einer Zink enthaltenden katalytischen Domäne, einer aminoterminalen Prodomäne und einer carboxyterminalen hämopexinähnlichen Domäne, die für die Substraterkennung wichtig ist. Derzeit sind 26 Vertreter der Familie der MMPs bekannt, die sich je nach Art ihres bevorzugten Substrates in verschiedene Unterfamilien gliedern. MMPs haben sowohl biologische als auch pathologische Bedeutung. Zu den MMP-katalysierten biologischen Prozessen gehören zum Beispiel die embryonale Entwicklung, Nervenwachstum, Ovulation, Knochenumwandlung und Wundheilung [95]. Pathologisch spielen sie bei verschiedenen chronischen entzündlichen Erkrankungen, wie Asthma oder Rheumatoider Arthritis, eine Rolle [96, 97] und sind an der Entstehung von Krebs, der Bildung von Metastasen und an verschiedenen cardiovaskulären und neurologischen Erkrankungen beteiligt [95].

Am Shedding sind vor allem die transmembranären Metalloproteinasen beteiligt [92]. Viele dieser Abspaltungsreaktionen sind durch kompetitive Inhibitoren auf der strukturellen Basis der Hydroxamsäure hemmbar (Abb. 6).

Eine weitere Möglichkeit die Aktivität der ADAMs und MMPs zu regulieren, ist die Hemmung der Enzyme durch endogen vorkommende *Tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs) [98]. Bisher wurden vier TIMPs, TIMP-1 bis -4, identifiziert. Es stellte sich heraus, dass ADAMs nur durch TIMP-3 gehemmt werden können. MMPs dagegen lassen sich mit unterschiedlicher Effizienz unspezifischer von TIMP-1 bis -4 hemmen.

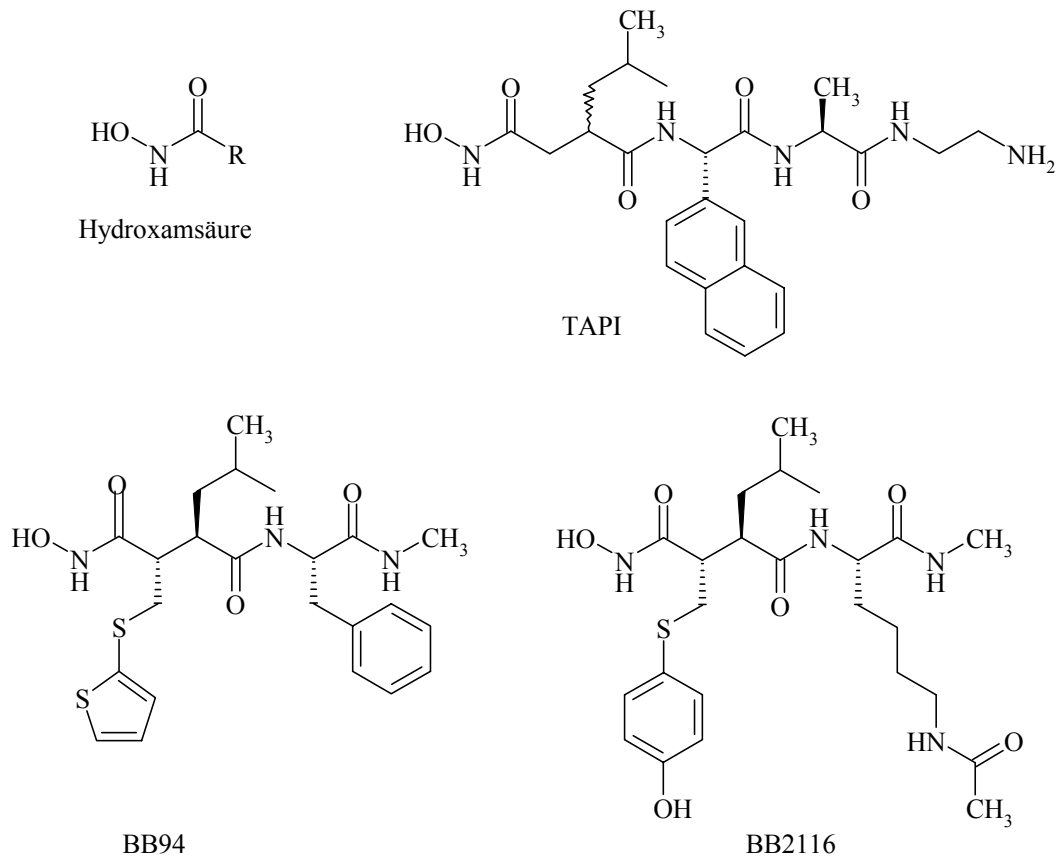


Abb. 6: Struktur der Hydroxamsäure und einiger Metalloproteinaseinhibitoren.

1.1.3 Induktion des *ectodomain shedding*

Ectodomain shedding findet zu einem gewissen Grad auch in unstimulierten Zellen statt. Diese physiologische Abspaltung wird auch als basales Shedding bezeichnet [92]. Zusätzlich kann die Abspaltung durch verschiedene Reagenzien und somit auch durch unterschiedliche Mechanismen verstärkt werden.

In den meisten Fällen ist der Phorbolster PMA als potenter Induktor des Shedding in der Lage, eine Abspaltung des jeweiligen Proteins herbeizuführen (Abb. 7).

Phorbolster gehören zur Gruppe der Diterpene und kommen in der Natur als Inhaltsstoffe von Wolfsmilchgewächsen (Euphorbiaceae) vor, in denen sie Bestandteile des giftigen Milchsafte sind. Der Phorbolster PMA ist ein unphysiologisches Reagenz, das unter anderem die Fähigkeit besitzt, die Proteinkinase C (PKC) zu aktivieren.

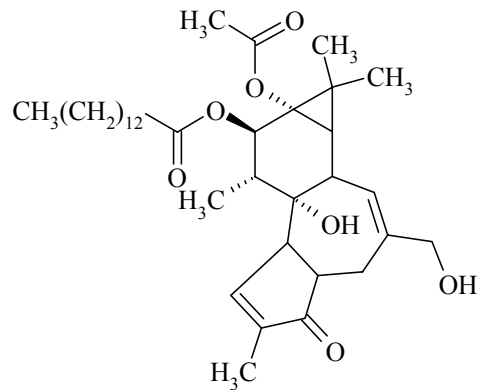


Abb. 7: Struktur des Phorbolesters Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA).

Shedding erfolgt nach Zugabe von PMA generell sehr rasch (ungefähr nach 10 Minuten). Der auf den Zellen zurückbleibende Anteil der *ectodomain* beträgt nach PMA-Inkubation meistens nur circa 2 % der Ausgangsmenge [92]. Zu den transmembranären Proteinen, deren Abspaltung durch PMA induziert wird, gehören unter anderem L-Selektin [85] und der Interleukin-1 (IL-1) Rezeptor Typ II [99].

Der Wirkmechanismus, mit dem PMA Shedding induzieren kann, ist weitgehend unbekannt. Verschiedene Anhaltspunkte deuten jedoch darauf hin, dass die Wirkung des PMA wahrscheinlich nicht in einer PKC-induzierten unspezifischen Aktivierung der verschiedenen Sekretasen liegt. Wahrscheinlich sind vielmehr verschiedene Signalwege involviert, die zur Abspaltung führen können. Einer von diesen Signalwegen ist der Mitogen-aktivierte Proteinkinase Signalweg (MAP-Kinase-Signalweg) [100]. Durch den Einsatz verschiedener Inhibitoren von Enzymen dieses Signalweges konnte für mehrere Proteine eine Hemmung der Abspaltung von der Zelloberfläche gezeigt werden [100]. Wie jedoch die PKC oder die intrazellulär ablaufende MAP-Kinase-Kaskade zu einer Aktivierung der Sekretasen führen kann, wurde bisher noch nicht aufgeklärt.

Weitere Substanzen, die bei vielen Proteinen Shedding induzieren können, sind Calcium-Ionophore. Substanzen dieser Gruppe, wie Ionomycin oder Calcimycin (Abb. 8), sind mobile Ionencarrier. Sie binden Calcium im Komplex 1:1, lagern sich in Membrane ein und transportieren so Calcium durch biologische Membrane. Auf diese Weise können die Calcium-Ionophore die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöhen und zu einer Aktivierung der Sekretasen führen.

ICAM-3 [86], der TNF- α -Rezeptor II [101] oder der IL-6-Rezeptor [102, 103] sind Beispiele für Proteine, von denen bekannt ist, dass ihre Abspaltung, neben PMA, auch durch Calcium-Ionophore induziert werden kann.

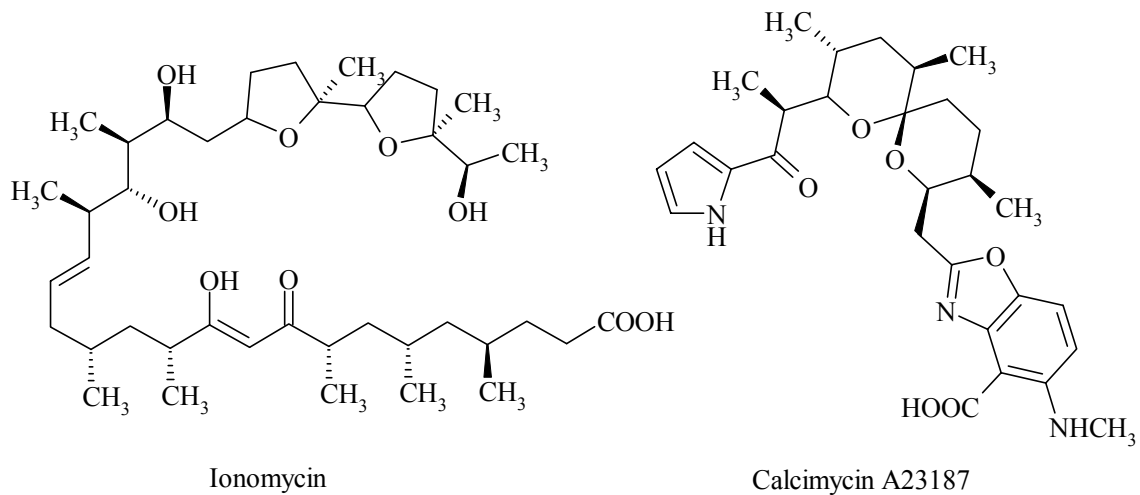


Abb. 8: Strukturen der Calcium-Ionophore Ionomycin und Calcimycin (A23187).

1.2 Untersuchung von Induktoren des *ectodomain shedding* von CD163

Bisher sind *in vitro* der Phorbol-13-Myristat-9-Acetat (PMA) und die Calcium-Ionophore als Induktoren des Shedding von CD163 bekannt [41]. Die Abspaltung des CD163 von der Monocyten-/Macrophagenoberfläche konnte *in vitro* durch einen Protease-Inhibitor-Cocktail gegen Serin-, Cystein- und Metalloproteinasen und durch den Proteinkinase C-Inhibitor Bisindolylmaleimid I (BIM) gehemmt werden [41]. Vermutlich ist eine Metalloprotease, entweder eine MMP oder ein Enzym aus der Familie der ADAM, an der Abspaltung beteiligt. Basierend auf diesen Ergebnissen untersuchten Matsushita et al. die Hemmung der Abspaltung durch TIMP-1 bis -4. Von den natürlich vorkommenden Metalloproteaseinhibitoren konnte ausschließlich TIMP-3 eine phorbol-13-Myristat-9-Acetat-induzierte Abspaltung des CD163 verhindern [72]. Da eine ausschließlich TIMP-3-sensitive Enzymhemmung bisher nur für Enzyme der Familie der ADAMs beobachtet wurde, wurde angenommen, dass es sich bei der CD163-spezifischen Sheddase wahrscheinlich um eine Metalloprotease aus der Familie der ADAMs handelt.

Bei PMA und den Calcium-Ionophoren handelt es sich um exogene, synthetisch hergestellte Substanzen. Für *In-vivo*-Verhältnisse haben sie keine Relevanz. sCD163 wurde jedoch auch *in vivo* im Plasma von gesunden Personen und in höheren Konzentrationen bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen gefunden. Es muss folglich auch endogene Substanzen geben, die eine Abspaltung des CD163 bewirken.

Hintz et al. näherten sich den *In-vivo*-Verhältnissen an, indem sie in Plasma von Patienten mit experimentell hervorgerufener bakterieller Infektion hohe Konzentrationen an sCD163 identifizieren konnten [76]. Die Abspaltung des CD163 wurde bei dieser speziellen Art der Infektion durch Lipopolysaccharid (LPS), einem bakteriellen Endotoxin, das Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien ist, hervorgerufen. Es ist bekannt, dass LPS zu einem Konzentrationsanstieg des endogenen Glucocorticoids Hydrocortison und von Interleukin-10 führen kann [104]. Dadurch wäre LPS in der Lage, bei bakterieller Infektion sowohl die Induktion des CD163 auf der Zelloberfläche einzuleiten als auch seine Abspaltung zur antiinflammatorischen Komponente zu induzieren. Von Hintz et al. konnte in Untersuchungen an humanen Monocyten auch eine hemmende Wirkung auf die Abspaltung durch einen Inhibitor des *Tumor necrosis factor- α converting enzyme* (TACE) auf die LPS-induzierte Abspaltung des CD163 ermittelt werden [76].

Eine weitere Aktivierung der Abspaltung des CD163, die *in vivo* relevant ist, wurde durch die Ausbildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes identifiziert [105]. Das beteiligte Antigen ist dabei der Fc γ -Rezeptor (Fc γ R). Dieser Rezeptor wird auf der Oberfläche von Leukocyten exprimiert und bindet Immunglobuline vom Typ G (IgG). Nach Wechselwirkung des IgG mit dem Fc γ R ist IgG in der Lage, verschiedene Fremdstoffe, wie Viren, Bakterien und andere körperfremde Zellen, abzufangen. Somit dient der Fc γ R als Verbindung des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Sulahian et al. konnten nach Bildung des Fc γ R-IgG-Komplexes eine Abspaltung des CD163 von der Monocytenoberfläche nachweisen [105]. Diese Induktion der Abspaltung konnte durch Inhibitoren der Proteinkinase C und Tyrosinkinasen aufgehoben werden [105].

Diese *in vivo* vorkommenden Verbindungen sind allerdings nur bedingt als Auslöser der Abspaltung des CD163 anzusehen, da sie nur unter speziellen entzündlichen Bedingungen im Körper vorhanden sind. LPS wird ausschließlich bei Entzündungen bakteriellen Ursprungs freigesetzt und die Bildung des Fc γ R-IgG-Komplexes beruht auf dem Eindringen von Fremdstoffen, gegen die der Körper IgG gebildet hat.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen sollte die Identifizierung von weiteren Aktivatoren der Abspaltung von CD163 sein, die *in vivo* im Körper vorkommen und immer während einer Entzündung präsent sind

1.2.1 Untersuchung der Induktion durch oxidativen Stress

Reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) spielen als Signalmoleküle eine bedeutende Rolle im Entzündungsgeschehen. Als Signalstoffe können sie zur Bildung von Zellschäden und degenerativen Prozessen, wie zum Beispiel der Degeneration von Knorpelgewebe oder rheumatoiden Erkrankungen, beitragen [106]. Über längere Zeiträume akkumulierte reaktive Sauerstoffspezies führen zu oxidativen Schäden und zur Funktionseinschränkung der Zellen.

Reaktive Sauerstoffspezies wurden in verschiedenen Untersuchungen als Aktivatoren für MMPs [107-109] und für das *Tumor necrosis factor- α converting enzyme* (TACE) nachgewiesen [110, 111]. Die Aktivierung der Metalloproteinasen durch ROS erfolgt entweder über die Induktion der Transkription, zum Beispiel über eine Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK) Signalkaskade oder direkt über posttranslationale Aktivierung [107-109].

Neben ihrer zelltoxischen Wirkung sind ROS essentiell bei der Erfüllung wichtiger physiologischer Aufgaben und Reaktionen des Organismus [112].

1.2.1.1 Oxidativer Stress

Aerobe Stoffwechselfvorgänge, pathobiologische Effekte, körpereigene Abwehrprozesse und exogene Noxen führen zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) im Organismus [113]. Zu diesen reaktiven Intermediaten zählen freie Radikale, wie das Superoxidradikalanion ($O_2^{\bullet-}$), das Hydroxylradikal (OH^{\bullet}), das Peroxylradikal (RO_2^{\bullet}), das Nitroxylradikal (NO^{\bullet}), das Alkoxy-Radikal (RO^{\bullet}) und das Hydroxyperoxyl-Radikal (HO_2^{\bullet}), aber auch nichtradikalische Verbindungen, wie Singulett-Sauerstoff ($^1\Delta_g$ singlet), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Peroxynitrit ($ONOO^{-x}$), hypochlorige Säure ($HOCl^x$) und Ozon (O_3).

ROS können durch Oxidationsreaktionen ihre Zielstrukturen, das sind vor allem Zellmembrane, DNA und Proteine, modifizieren und in ihrer Funktion beeinträchtigen. Oxidative Veränderungen an biologisch bedeutsamen Makromolekülen spielen eine Rolle in der Pathogenese zahlreicher Krankheiten, wie zum Beispiel Krebs, Arteriosklerose und neurodegenerativen Erkrankungen oder sogar beim normalen Alterungsprozess.

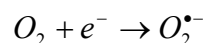
ROS werden jedoch auch gezielt vom Organismus synthetisiert und freigesetzt. Das Superoxid wird bei Entzündungsreaktionen der unspezifischen Abwehr, wie dem *respiratory burst* in Monocyten, Macrophagen oder polymorphkernigen Leukocyten, zur Bekämpfung von Bakterien genutzt. Außerdem konnte in zahlreichen Versuchen gezeigt werden, dass die Bildung von ROS durch Wachstumsfaktoren und Cytokine induziert wird [114, 115]. Den Mitgliedern der ROS wird daher eine Funktion bei der Signaltransduktion eingeräumt [116-118]. In humanen Chondrocyten konnte eine antiinflammatorische Wirkung von ROS, wahrscheinlich durch die Unterdrückung der Expression inflammatorischer Gene, ermittelt werden [112].

Der Körper verfügt außerdem über eine Reihe von körpereigenen antioxidativen Abwehrmechanismen, die vor zu hohen Konzentrationen an ROS und somit vor Schädigungen schützen.

Unter oxidativem Stress versteht man das Ungleichgewicht zwischen der Produktion und dem Abbau von ROS. Die Verschiebung der Gleichgewichtslage liegt dabei auf der Seite der Produktion der ROS, wobei geringfügige Auslenkungen im Rahmen eines Normbereiches als „physiologischer oxidativer Stress“ bezeichnet werden. Stärkere Auslenkungen können zu Adaptionsprozessen, zum Beispiel der Induktion antioxidativ wirksamer Enzyme oder von Prozessen, wie der Apoptose oder Nekrose, führen. Die Verschiebung des Gleichgewichtes kann zum einen durch eine ROS-Akkumulation, bewirkt durch äußere Einflüsse, wie zum Beispiel durch Glutamat oder Wasserstoffperoxid, oder durch intrazelluläre Störungen, wie Gendefekte, hervorgerufen werden. Zum anderen kann sie in verminderten Abbauraten der ROS auf Grund von reduzierenden Antioxidationsmechanismen begründet sein.

1.2.1.2 Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Die ROS-Bildung beruht auf der oxidativen Funktion des Sauerstoffs, Elektronen von anderen Molekülen aufzunehmen [119].



Die Übertragung von Elektronen auf molekularen Sauerstoff erfolgt im Körper beim Elektronentransport in den Mitochondrien im Rahmen der Atmungskette [120] unter

Beteiligung der NADH-Ubiquinon-Reduktase (Komplex I) und der Ubiquinol-Cytochrom-C-Reduktase (Komplex III) [121] (Abb. 9).

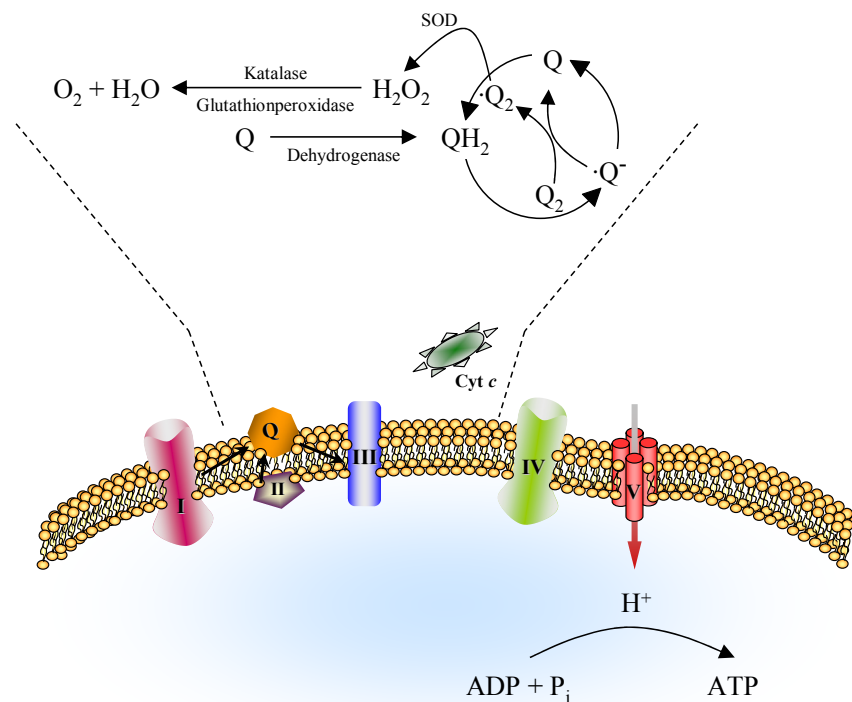


Abb. 9: Bildung von mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (modifiziert nach Finkel und Holbrook [118]).

Unter normalen metabolischen Bedingungen ist der Komplex III der zentrale Ort der ROS-Produktion [122]. Elektronen werden von Komplex I und II auf das Coenzym Q (Ubiquinon) übertragen. Die reduzierte Form des Coenzym Q (QH₂, Ubiquinol) überträgt ein Elektron auf Cytochrom c und wird selber zum Semichinonanion (Q^{•-}). Q^{•-} kann nichtenzymatisch ein Elektron auf molekularen Sauerstoff (O₂) übertragen, wobei das Superoxidradikalanion (O₂^{•-}) entsteht. Das gebildete O₂^{•-} kann über die Superoxiddismutase (SOD) zu H₂O₂ umgesetzt werden. Liegen hohe H₂O₂-Konzentrationen vor, katalysiert das Enzym Katalase die Umsetzung von H₂O₂ zu H₂O und O₂ (Abb. 9). Die Mitochondrien sind deshalb die Hauptquelle für die Bildung von ROS *in vivo* [123]. Das Superoxid wird auch von immunaktiven Zellen, wie den Macrophagen oder Neutrophilen, gebildet. Die Bildung erfolgt hier zur Abwehr von Bakterien [124].

Das Superoxid kann sowohl als Oxidations- als auch als Reduktionsmittel wirken und wird durch Superoxiddismutase in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff dismutiert (Abb. 10). Seine effektive Halbwertszeit liegt im Bereich von Millisekunden. Als Folgeprodukte können Wasserstoffperoxid, Peroxynitrite und Hydroxylradikale entstehen. Der Komplementfaktor

C5a, Leukotrien B4 und Phorbol ester gelten neben anderen als endogene Aktivatoren der phagocytären Superoxidradikalbildung [125].

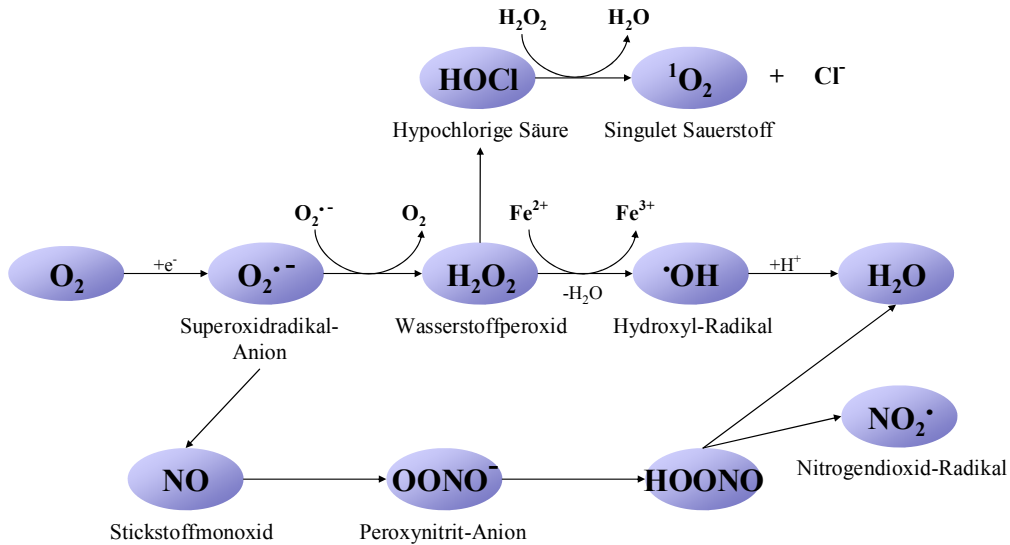


Abb. 10: Schematische Darstellung der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (nach Haddad [126]).

Im Körper existiert außerdem eine Vielzahl an Enzymen, die ROS generieren können. Zu ihnen gehören Oxidasen, Oxygenasen, Peroxidasen und Cytochrom P450 [127].

1.2.1.3 Antioxidative Schutzmechanismen

Da die ROS-Bildung eine Begleiterscheinung aerober Lebensweise ist, besteht bei normalen Bedingungen in Säugetierzellen ein Gleichgewicht zwischen Oxidantien und antioxidativ wirkenden Substanzen. Zu diesen Substanzen gehören Enzyme, wie die Superoxiddismutasen (SOD), Katalasen und das Glutathionredoxsystem (Abb. 11), sowie die Thioredoxin/Thioredoxinreduktase-Redoxkette, die Hämoxigenase und Hitzeschockproteine.

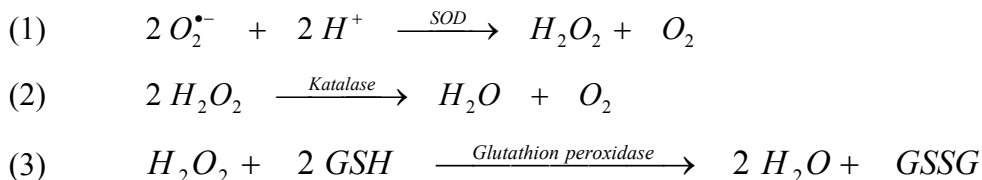


Abb. 11: Enzymkatalysierte Reaktionen zum Abbau reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Reaktion (1) wird durch das Enzym Superoxiddismutase (SOD), Reaktion (2) durch die Katalase und Reaktion (3) durch die Glutathionperoxidase, Bestandteil des Glutathionredoxsystems, katalysiert. GSH: Glutathion; GSSG: Glutathiondisulfid.

Daneben gibt es noch andere nichtenzymatische Antioxidantien, zu denen Glutathion, Vitamin A, C und E, Harnstoff oder Bilirubin, gezählt werden.

1.2.1.4 Untersuchung der Induktion des *ectodomain shedding* von CD163 durch Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

ROS erfüllen beide Anforderungen des gesuchten Aktivators des Shedding von CD163. Es sind endogene Substanzen, die im Entzündungsgeschehen präsent sind. Es sollte untersucht werden, ob Vertreter dieser Gruppe auch die Abspaltung des extrazellulären Teils des CD163 von der Zelloberfläche bewirken können. Hierzu wurde Wasserstoffperoxid (H₂O₂) als Modellsubstanz der ROS verwendet.

ROS und speziell H₂O₂ sind bereits als Mediatoren des Shedding von anderen Proteinen bekannt. Shedding wurde dabei durch Aktivierung der entsprechenden Sheddase ausgelöst.

Wasserstoffperoxid als ein Vertreter der nichtradikalischen ROS entsteht unter physiologischen Bedingungen vorrangig in Peroxisomen bei verschiedenen Enzymreaktionen als Endprodukt vieler Oxidationsreaktionen [128] (Abb. 10). Es ist sehr gut wasserlöslich und membranpermeabel. Die biologische Halbwertszeit ist abhängig von den H₂O₂-abbauenden Enzymen, wie Katalase und Glutathionperoxidase, die für eine Gleichgewichtseinstellung sorgen. H₂O₂ selbst kann nur bedingt oxidative Schäden auslösen. Durch metallionenkatalysierte Fenton-Reaktionen können jedoch sehr reaktionsfreudige Hydroxylradikale generiert werden, die indirekt für DNA-Schäden sorgen [129] (Abb. 12).

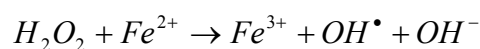


Abb. 12: Fenton-Reaktion zur Generierung von Hydroxylradikalen durch Oxidation mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und zweiwertigem Eisen (Fe²⁺; Fenton-Reagenz).

H₂O₂ wird im Körper bei nahezu allen Oxidations- und Reduktionsreaktionen der ROS gebildet. Vor allem im Entzündungsgeschehen können lokal hohe H₂O₂-Konzentrationen vorkommen.

Shedding von Proteinen zeigt sich in einer Abnahme der Antigendichte von der Zelloberfläche durch Freisetzung einer löslichen Variante des Proteins in den Extrazellulärraum. Zur Bestimmung des Shedding sollte deshalb zum einen die Veränderung

der Antigendichte auf der Zelloberfläche und zum andern die Konzentration des löslichen Proteins im Zellüberstand untersucht werden.

1.2.1.4.1 Prinzip der Bestimmung

Zur Untersuchung des ROS-Einflusses auf das Shedding von CD163 wurden isolierte Monocyten mit dem Glucocorticoid Fluticasonpropionat (FP) zur maximalen CD163-Expression angeregt (Experimenteller Teil, 2.5). Ein Teil der CD163-positiven Zellen wurde anschließend eine definierte Zeit mit H₂O₂ inkubiert.

Der membranständige Anteil an CD163 auf der Oberfläche der Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Dabei wurde ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierter Antikörper an das CD163 gebunden. Nach Anregung des Farbstoffes zur Fluoreszenz wurde die emittierte Lichtintensität gemessen, die direkt proportional der Antigendichte auf der Zelloberfläche war. Die Auswertung erfolgte über ein Histogramm, in dem die jeweilige Fluoreszenzintensität der Zellpopulation gegen die gemessene Zellzahl dargestellt war. Bestimmt wurde daraus die Änderung der Fluoreszenzintensität der unterschiedlich behandelten Monocyten im Vergleich zu Kontrollzellen (Kontrolle). Die Kontrollzellen wurden zur Ermittlung unspezifischer Bindungen des fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpers mit einem Isotyp-Kontrollantikörper als Primärantikörper versetzt. Die Änderung der Fluoreszenzintensität gab den Anteil an Zellen wieder, der im Vergleich zu den Kontrollzellen über den spezifischen Antikörper Fluoreszenzfarbstoff gebunden hatte und somit CD163 auf ihrer Oberfläche exprimiert hatte.

Die ausschließlich mit FP stimulierten Zellen repräsentierten den größten Anteil CD163 auf ihrer Oberfläche, der für die jeweilige Charge an gepoolten Blutzellen exprimiert wurde, und stellten damit die Antigendichte dar, die als Ausgangssituation für die jeweils nachfolgende Behandlung der Zellen diente. Deshalb wurde die CD163-Dichte dieser Zellen jeweils auf 100 % CD163-Expression gesetzt. Die ermittelten Anteile aller anderen Zellen wurden immer auf den 100 %-Wert der mit FP stimulierten Zellen bezogen.

Um sicherzustellen, dass die Änderung der Antigendichte auf der Monocytenoberfläche auf dem Prozess der Abspaltung beruhte, wurde als Gegenkontrolle die sCD163-Konzentration im Überstand der Zellen bestimmt. Die Bestimmung erfolgte mittels spezifischem ELISA auf sCD163 (Experimenteller Teil, 3.4). Auf diese Weise konnte

beobachtet werden, ob eine Abnahme der Antigendichte des membranständigen CD163 auf der Zelloberfläche auch gleichzeitig eine Zunahme der Konzentration an sCD163 im Zellüberstand nach sich zog.

1.2.1.4.2 Induktion des Shedding von CD163 durch Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

Bei der Aufnahme der Fluoreszenzintensitäten der unterschiedlich behandelten Zellen wurde das Signal der jeweiligen Zellpopulation separat aufgenommen. Anschließend konnte durch ein Übereinanderlegen der Histogramme die Verschiebungen graphisch dargestellt werden (Abb. 13). Die Angabe der CD163-positiven Monocyten erfolgte jeweils in Prozent der insgesamt vermessenen Zellen.

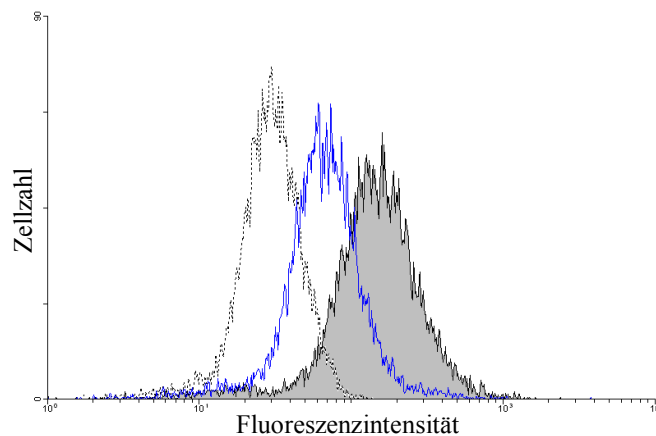


Abb. 13: Durchflusszytometrische Analyse humaner Monocyten nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Abgebildet sind die übereinander gelegten Histogramme der Kontrollzellen (gepunktete Linie), der ausschließlich mit FP stimulierten Zellen (grau unterlegt) und der Zellen, die nach FP-Stimulation zusätzlich mit H₂O₂ inkubiert wurden (blaue Linie). Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Histogramm, bei dem die Fluoreszenzintensität logarithmisch gegen die Zellzahl aufgetragen ist.

Die Intensität des Signals der Kontrollzellen lag am niedrigsten von allen und spiegelte die unspezifische Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes an die Zelloberfläche wider (Abb. 13, gepunktete Linie). Für die ausschließlich FP-stimulierten Zellen, die die maximale Expression an CD163 darstellten, konnte eine deutliche Verschiebung der Fluoreszenz zu höheren Intensitäten festgestellt werden. So waren in diesem Versuchsansatz 55,6 % der untersuchten Zellen CD163-positiv. Mit einer Standardabweichung [130] von $\pm 8,8$ % CD163-positiven Zellen in sechs Ansätzen war die Expression ausreichend homogen.

Der Rest (circa 44 %) wies auch nach der FP-Stimulation keine CD163-Expression auf der Oberfläche auf. Da es sich bei den untersuchten Zellen um gepoolte Humanzellen verschiedener Blutspender handelte, lagen die Zellen höchstwahrscheinlich in unterschiedlichen Differenzierungsstadien vor. Das könnte der Grund dafür sein, dass nicht alle Zellen in der Lage waren, CD163 auf ihrer Oberfläche zu exprimieren.

Nach Inkubation von FP-stimulierten Monocyten mit H_2O_2 konnte bei den analysierten Zellen eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität festgestellt werden (Abb. 13, blaue Linie). Daraus war zu erkennen, dass im Vergleich zur maximal möglichen Expression mit FP nach dem Zusatz von H_2O_2 auf der Oberfläche einer analogen Anzahl Monocyten eine geringere Menge CD163 vorhanden war. Somit führte der Zusatz von H_2O_2 zu einer Reduktion der Antigendichte des CD163 auf der Zelloberfläche.

Zur genaueren Analyse und Veranschaulichung des auf der Zelloberfläche vorhandenen Anteils an CD163 wurden die FP-stimulierten Zellen als maximal zur CD163-Expression angeregte Zellen auf einen Wert von 100 % CD163-positiver Zellen gesetzt (Abb. 14, Zelloberfläche, FP). Die equivalente Stimulation der Monocyten zur CD163-Expression konnte anhand von Sechsfachbestimmungen der 100 %-Stimulation sichergestellt werden.

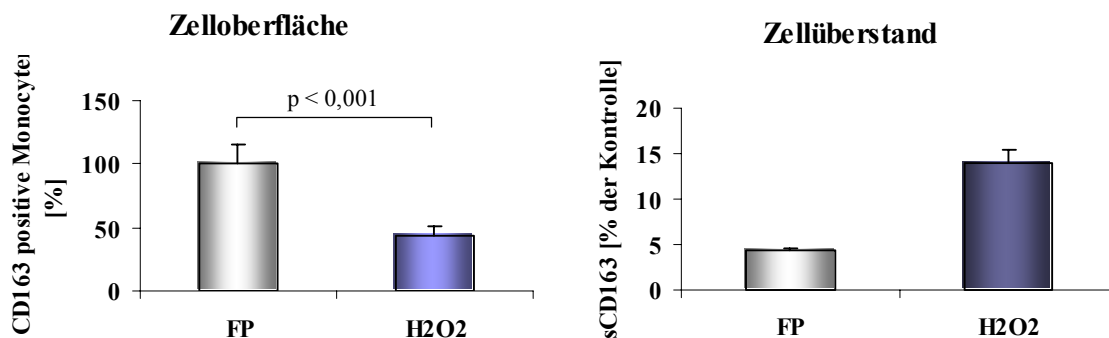


Abb. 14: Shedding von CD163, induziert durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2). **Zelloberfläche:** Prozentuale Darstellung der Antigendichte auf der Zelloberfläche bei maximal CD163-positiven Zellen (FP) und nach Inkubation mit H_2O_2 . Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von Sechsfachmessungen. Statistische Signifikanz $p < 0,05$ (ANOVA, Tukey's Test). **Zellüberstand:** Darstellung der Konzentration von sCD163 im Zellüberstand von je $1 \cdot 10^6$ vitaler Zellen nach FP-Stimulation und H_2O_2 -Inkubation im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Mittlere Abweichung vom Mittelwert (MA) [131] von Dreifachbestimmungen.

Der Anteil CD163-positiver Zellen nach H_2O_2 -Inkubation (Abb. 14, Zelloberfläche, H_2O_2) betrug $43,4 \pm 7,1$ %. Die Inkubation der Monocyten mit H_2O_2 hatte folglich eine signifikante Abnahme der Oberflächendichte des CD163 um 57 % bewirkt.

Darüber hinaus war noch zu untersuchen, ob es sich bei der Abnahme der Antigendichte von der Zelloberfläche durch H_2O_2 tatsächlich um eine Abspaltung des Proteins handelt. Eine

andere Möglichkeit wäre eine Denaturierung des CD163 durch das Reagenz Wasserstoffperoxid, wodurch CD163 durch seinen spezifischen Antikörper nicht mehr erkannt und so auch nicht über den fluoreszenzfarbstoffgebundenen Antikörper markiert werden könnte. Hierfür wurde zusätzlich zu der Bestimmung der Antigendichte der Monocyten der Anteil des sCD163 im Zellüberstand bestimmt (Abb. 14, Zellüberstand). Die Konzentrationen des sCD163 im Zellüberstand wurden jeweils auf die Zellüberstände unstimulierter Monocyten als Kontrolle bezogen.

In den Zellüberständen der FP-stimulierten Zellen war eine leichte Erhöhung der Konzentration an sCD163 im Vergleich zu den unstimulierten Zellen zu erkennen ($4,3 \pm 0,3$ %). Nach H_2O_2 -Stimulation wies der Überstand dieser Monocyten einen signifikant höheren Anteil sCD163 auf. Der ermittelte sCD163-Anteil betrug im Vergleich zu den unstimulierten Zellen $13,9 \pm 0,2$ %. Nach H_2O_2 -Behandlung konnte also ein circa dreifach höherer Anteil an sCD163 detektiert werden. Die Abnahme der CD163-Antigendichte von der Zelloberfläche, hervorgerufen durch die Behandlung mit H_2O_2 , zusammen mit einer Zunahme der sCD163-Konzentration im Zellüberstand zeigten, dass durch Wasserstoffperoxid ein Shedding von CD163 induziert werden konnte. Durch das vermehrte Auftreten der löslichen Form im Zellüberstand konnte auch bewiesen werden, dass es sich dabei nicht um eine Denaturierung des Proteins durch Wasserstoffperoxid handelte. Im Falle der Denaturierung würde weniger fluoreszenzfarbstoffmarkierter Antikörper an die Zelloberfläche gebunden werden, so dass die Fluoreszenzintensität dieser Zellen möglicherweise ähnlich niedrig wie nach einer Abnahme der Antigendichte gelegen hätte. Da jedoch intaktes Protein im Zellüberstand gefunden wurde, konnte eine Denaturierung des CD163 ausgeschlossen werden.

Ein Grund für das Auftreten eines geringen Anteils sCD163 im Überstand der ausschließlich mit FP stimulierten Zellen ($4,3 \pm 0,3$ %) könnte eine Aktivierung der Zellen zur Abspaltung während der Aufarbeitungsphase gewesen sein. Durch wiederholten Mediumwechsel, Waschen und Zentrifugieren der Zellen könnte möglicherweise ein schwacher proinflammatorischer Reiz auf die Zellen ausgeübt worden sein, der die Abspaltung dieses geringen Anteils an sCD163 veranlasste. Andererseits könnte es sich auch um einen physiologischen Vorgang handeln. Bei Untersuchungen des Plasmas gesunder Probanden konnte immer eine gewisse Menge sCD163 gefunden werden, so dass davon auszugehen war, dass sCD163 auch konstitutiv unter physiologischen Bedingungen abgespalten wird [42, 72].

Wasserstoffperoxid gilt als potenter und wichtiger Effektor sowohl von physiologischen als auch pathologischen Prozessen. Die Wirkung des H_2O_2 als Induktor des Shedding konnte bereits von Hino et al. für den membranständigen *Tumor necrose factor* Rezeptor Typ I (TNF-RI) an einer humanen pulmonalen Epithelzelllinie bestätigt werden [132]. H_2O_2 bewirkte in diesen Untersuchungen eine dosisabhängige Freisetzung des Rezeptors mit einem Maximum bei 500 μM H_2O_2 . Der Einsatz von 1 mM H_2O_2 führte bei Hino et al. zu keiner signifikant geringeren Freisetzung des löslichen TNF-RI. In den eigenen Versuchen wurde eine Konzentration von 1 mM gewählt, da Monocyten als Immunzellen mit einem stark ausgebildeten antioxidativen Abwehrsystem ausgestattet sind. Geringere Konzentrationen könnten somit auf Grund schneller zellulärer Abbaumechanismen zu einer abgeschwächten bis keiner Wirkung führen. Von einer anderen Arbeitsgruppe, die ebenfalls mit humanen Monocyten arbeitete, wurde H_2O_2 sogar in einer Konzentration von 4 mM eingesetzt, da die Abwehrmechanismen dieser Zellen zu einer vollständigen Aufhebung der Effekte bei niedrigeren Konzentrationen führten [111].

Einer geringen Effektivität auf Grund einer zu niedrigen H_2O_2 -Konzentration steht die Gefahr einer durch H_2O_2 eingeleiteten Apoptose der Zellen gegenüber. Zu hohe Konzentrationen des Reagenzes können zum Tod der behandelten Zellen führen [133, 134]. In den eigenen Versuchen lag die Sterblichkeitsrate bei circa 10 % und war unabhängig von der Art der Stimulation. Zur Auswertung wurden ausschließlich lebende Zellen herangezogen.

Als Mechanismus des Shedding von TNF-RI durch H_2O_2 wurde von Hino et al. die Aktivierung einer bisher unbekannt Matrixmetalloproteinase vermutet [132]. Das Shedding von TNF-RI und CD163 wies noch weitere Gemeinsamkeiten auf. So konnten neben der Induktion des Shedding beider Proteine durch ROS auch Induktionen durch Lipopolysaccharid und TNF *in vivo* und *in vitro* durch Phorbolster beobachtet werden [135]. Auf Grund der teilweisen Hemmung des phorbolsterinduzierten Shedding von TNF-RI durch den Hydroxyl-Radikalfänger Dimethylsulfoxid wurde vermutet, dass ROS möglicherweise Signaltransduktoren im Reaktionsweg der Proteinkinase C sind [132].

Eine Freisetzung des *Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor* (HB-EGF) kann ebenfalls durch Phorbolster und durch eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bewirkt werden [136]. In Untersuchungen an einer Ratten-Krebszelllinie wurde von Kim et al. ein ROS-abhängiger Shedding-Mechanismus identifiziert. Interessanterweise konnte die Abspaltung von HB-EGF sowohl durch einen Aktivator der Proteinkinase C, dem Phorbolster, als auch durch einen Inhibitor der

Proteinkinase C, Chelerythrin, induziert werden. Das Shedding von HB-EGF läuft nach Induktion durch den Phorbolster über den p38 *Mitogen activated protein kinase* (p38 MAPK) Signalweg. Zusätzlich konnte von Kim et al. ein bisher unbekannter aber vom p38 MAPK-Signalweg unabhängiger Mechanismus des Shedding von HB-EGF, eingeleitet durch Chelerythrin, gezeigt werden [136].

Der große Einfluss von ROS auf die Regulation einer Vielzahl unterschiedlicher membranständiger Signalproteine konnte von Zhang et al. nachgewiesen werden [111]. Phorbolster sind in der Lage, die Bildung von ROS in humanen Monocyten und T-Zellen zu induzieren. Auf der Basis dieser Erkenntnis konnte sowohl der Einfluss von Phorbolster induziertem endogenem als auch exogenem Wasserstoffperoxid zugesetztem ROS auf die Abspaltung des TNF-Rezeptors p75 und L-Selectin gezeigt werden. Sowohl durch die endogen gebildeten Sauerstoffverbindungen als auch durch die exogene Zugabe von H₂O₂ konnte ein deutliches Shedding der beiden Proteine bewirkt werden. Weitere Versuche von Zhang et al. zielten darauf ab, eine gemeinsame Beteiligung des Phorbolsters und ROS an der Abspaltung zu untersuchen. Voraussetzung für ROS als sheddinginduzierende Verbindungen ist das intrazelluläre Vorkommen dieser Verbindungen. In Hemmversuchen des ROS-induzierten Shedding mittels antioxidativer Superoxiddismutase (SOD) (Abb. 11) war ausschließlich ein membranpermeables Enzym in der Lage, sheddinginduzierende ROS zu eliminieren. Eine nicht membranpermeable Enzymvariante zeigte kaum eine Wirkung [111].

Das bereits als Aktivator des Shedding anderer membranständiger Proteine bekannte H₂O₂ aus der Gruppe der ROS konnte auch in den eigenen Untersuchungen als endogener Induktor des Shedding für CD163 identifiziert werden. Obwohl ROS vor allem eine Bedeutung als proinflammatorische Verbindungen zugeschrieben werden, können ihnen durch die Beteiligung an der Generierung des antiinflammatorischen Faktors sCD163 auch antiinflammatorische Eigenschaften beigemessen werden.

1.2.1.4.3 Hemmung des wasserstoffperoxidinduzierten Shedding von CD163

Unter der Annahme, dass ROS als intrazelluläre Mediatoren die Aktivierung einer Sheddase bewirken, sollte das ROS-induzierte Shedding durch Radikalfänger aufgehoben werden können. Als Radikalfänger wurde N-Acetylcystein (NALC) eingesetzt (Abb. 15). NALC

besitzt auf Grund seiner reduzierenden Eigenschaften antioxidative Kapazität und ist in der Lage, Substrate für die zelluläre Glutathion-Synthese bereitzustellen [137-139].

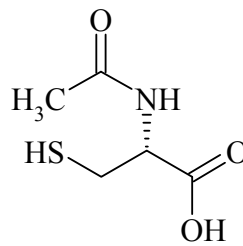
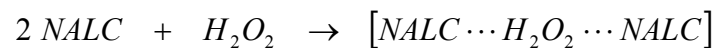


Abb. 15: Strukturformel des Radikalfängers N-Acetylcystein (NALC).

Außerdem kann NALC mit H_2O_2 direkt zu einem NALC- H_2O_2 -Komplex reagieren, wobei die Stöchiometrie des Komplexes abhängig von der Konzentration des NALC ist.



Die Komplexbildung wurde von Picquart et al. durch Infrarot- und Raman-Spektroskopie nachgewiesen [140]. Der entstandene Komplex wird anschließend zu Cystin und Wasser konvertiert. $R = -CH_2CHNHCOCH_3COOH$



Ebenso sollte der Einfluss von Calcium auf die ROS-induzierte Abspaltung bestimmt werden. Durch eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration können Sheddasen aktiviert werden [141]. Da eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration zum Shedding von CD163 führen kann [142] und ROS in der Lage sind, diese intrazelluläre Erhöhung von Calcium zu bewirken [143], wurde die Rolle des Calciums beim Shedding von CD163 durch H_2O_2 beleuchtet. Hierzu wurde der Calciumchelator 1,2-bis(o-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure, tetra-acetoxymethyl-ester (BAPTA/AM) eingesetzt (Abb. 16). BAPTA/AM ist eine membranpermeable Verbindung, die intrazellulär durch cytosolische Esterasen zu BAPTA hydrolysiert wird. In der hydrolysierten Form ist es in der Lage aktiv Calcium zu chelatisieren und dadurch die intrazelluläre Calciumkonzentration so zu vermindern, dass dessen Funktion als *second messenger* nicht mehr ausgeübt werden kann.

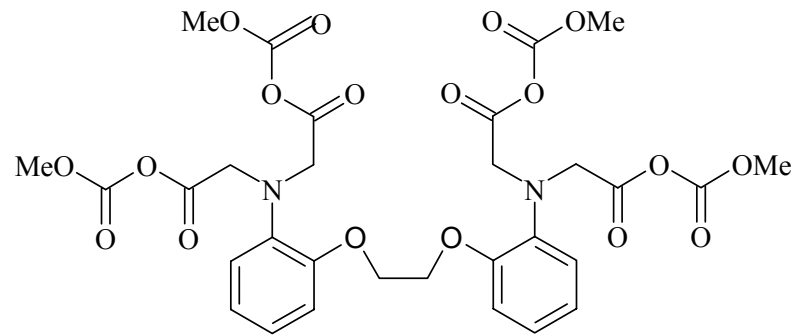


Abb. 16: Struktur des Calciumchelators 1,2-bis(o-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetra-essigsäure, tetraacetoxymethyl-ester (BAPTA/AM).

Eine Hemmung des phorbolsterinduzierten Shedding von CD163 durch den Proteinkinase C-Inhibitor Bisindolylmaleimid I konnte bereits von Droste et al. gezeigt werden [41]. Ebenso bewirkte ein Cocktail verschiedener Serin-, Cystein- und Metalloproteasen eine Hemmung der Abspaltung des CD163, was auf die Beteiligung einer Metalloproteinase am Sheddingmechanismus hindeutete [41].

Die Aktivierung der Sheddase TACE durch ROS ist bekannt [111]. Es ist denkbar, dass TACE auch für das Shedding von CD163 eine Rolle spielt, da es eine Metalloproteinase aus der Familie der ADAMs und ein TIMP-3-sensitives Enzym ist.

Für zwei Substrate von TACE, den p75 Rezeptor und L-Selektin, konnte gezeigt werden, dass H_2O_2 direkt zu einer TACE-vermittelten Abspaltung und Generierung der löslichen Formen führt. Als Aktivierungsmechanismus wird eine Oxidationsreaktion des aktiven Zentrums von TACE angenommen. Die latente Form des TACE enthält in der inhibitorischen Prodomäne die reduzierte Thiolgruppe eines Cysteinrestes, die das Zink-Atom im aktiven Zentrum maskiert [144]. ROS oxidieren diese Thiolgruppe, zerstören die Cystein-Zink-Bindung und aktivieren das Enzym. Auch andere Metalloproteinasen können über den so genannten „*cystein switch*“ durch freie Radikale aktiviert werden [145].

Zhang et al. konnten zeigen, dass die Aktivität von TACE nicht auf einer verstärkten Transkription und Expression des Enzyms zurückzuführen ist, sondern dass es sich ausschließlich um einen posttranslationalen Prozess handelt [111]. Ob TACE oder eine nahe verwandte Matrixmetalloproteinase auch eine Rolle bei der Abspaltung des durch H_2O_2 -induzierten Shedding führt, sollte durch direkte Hemmung des Enzyms durch TAPI-1, einem Inhibitor TIMP-3-sensitiver Metalloproteinasen, untersucht werden (Abb. 17).

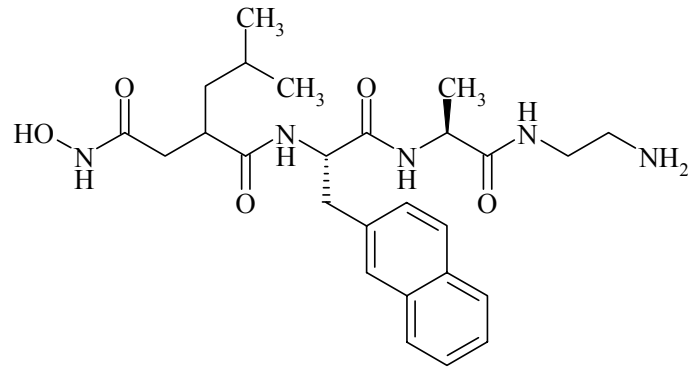


Abb. 17: Struktur des Metalloproteinaseinhibitors N-(R)-[2-Hydroxyaminocarbonylmethyl]-4-methylpentanoyl-L-naphthylalanin-L-alanin, 2-aminoethylamid (TAPI-1).

Die Untersuchung dieser Einflüsse auf das H_2O_2 -induzierte Shedding erfolgte wieder über die Bestimmung der CD163-Antigendichte mittels Durchflusszytometrie. Hierzu wurden FP-stimulierte Monocyten jeweils 30 Minuten mit dem jeweiligen Inhibitor vorinkubiert. Anschließend wurde versucht, mit H_2O_2 unter denselben Bedingungen wie bei der Inkubation unter 1.2.1.4.1 beschrieben, das Shedding von CD163 einzuleiten. Im Falle einer erfolgreichen Inhibierung des Shedding sollte die Fluoreszenzintensität hoch, das heißt nahe der ermittelten Intensität der mit FP zur maximalen Expression angeregten Zellen liegen. Je geringer der Einfluss des Inhibitors, desto mehr CD163 kann durch H_2O_2 abgespalten werden und desto geringer ist die Fluoreszenzintensität der untersuchten Zellen.

Im Vergleich zu der signifikanten Abnahme der Antigendichte durch H_2O_2 konnte eine deutlich geringere Abnahme der Fluoreszenzintensität und damit eine größere CD163-Dichte auf der Monocytenoberfläche nach Vorinkubation mit den untersuchten Inhibitoren beobachtet werden (Abb. 18).

Die maximal stimulierten Zellen (FP) wurden wiederum auf 100 % CD163-positive Zellen gesetzt. Nach Zusatz des Radikalfängers NALC konnte das durch H_2O_2 induzierte Shedding von CD163 weitgehend aufgehoben werden. Der Anteil CD163 auf der Zelloberfläche betrug nach Behandlung mit NALC und anschließender H_2O_2 -Inkubation $85,9 \pm 14,3$ %. Durch die Bindung des freien H_2O_2 und durch das Abfangen der generierten ROS konnte somit die aktivierende Wirkung aufgehoben werden.

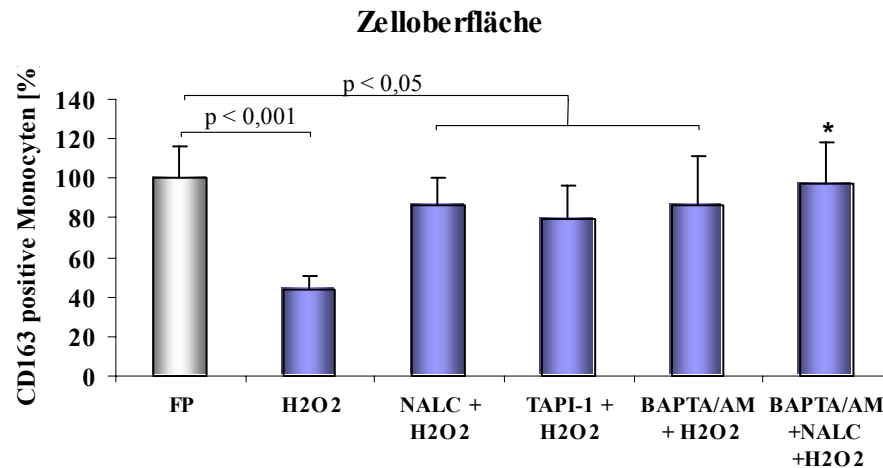


Abb. 18: Hemmung des H₂O₂-induzierten Shedding von CD163 von der Oberfläche humaner Monocyten. Im Vergleich zur Inkubation mit H₂O₂ konnte die Vorinkubation der Monocyten mit N-Acetylcystein (NALC), einem TACE-Inhibitor (TAPI-1), einem Calciumchelator (BAPTA/AM) oder einer Kombination aus BAPTA/AM und NALC die Abnahme der Antigendichte reduzieren. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen von Sechsfachbestimmungen. Statistische Signifikanz: $p < 0,05$, statistisch nicht signifikant verschieden von FP: $p > 0,05$ (*.) (ANOVA, Tukey's Test).

Die Chelatierung von intrazellulärem Calcium durch BAPTA/AM führte ähnlich wie NALC zu einer deutlichen Verringerung des durch H₂O₂-induzierten Shedding. Der Einsatz des Chelators ergab eine Antigendichte des CD163 von $86,9 \pm 24,1$ % und zeigte damit eine mit NALC vergleichbare Hemmung auf die Abspaltung des CD163. Interessanterweise konnte die Abnahme der Antigendichte durch eine Kombination beider Reagenzien, NALC und BAPTA/AM, nahezu vollständig unterbunden werden.

Die Anzahl CD163-positiver Zellen nach Inkubation mit einer Mischung der beiden Inhibitoren lag bei $97,0 \pm 21,3$ % und war damit nicht signifikant von den maximal stimulierten Zellen (FP) verschieden. Daraus wurde abgeleitet, dass die Aktivierung des für das Shedding verantwortlichen Enzyms sowohl durch reaktive Sauerstoffverbindungen als auch durch eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration vermittelt wird.

Eine Beteiligung des TACE oder einer nahe verwandten Metalloproteinase erscheint auf Grund der ermittelten Hemmung des H₂O₂-induzierten Shedding wahrscheinlich. So konnte bei der durchflusszytometrischen Analyse eine signifikant geringere Abspaltung des CD163 von der Monocytenoberfläche nach Vorbehandlung der Zellen mit dem Inhibitor TAPI-1 gezeigt werden als nach ausschließlicher H₂O₂-Behandlung. Die Antigendichte betrug $79,3 \pm 16,7$ %. Damit erwies sich der Metalloproteinaseinhibitor ebenfalls als ein potenter Hemmstoff des H₂O₂-induzierten Shedding von CD163.

Um eine aktivierende Wirkung auf das CD163-Shedding durch die eingesetzten Inhibitoren selbst auszuschließen, wurden Zellen unter einheitlichen Bedingungen mit den Inhibitoren ohne weiteren Zusatz von H_2O_2 inkubiert und die CD163-Antigendichte auf der Zelloberfläche bestimmt (Abb. 19).

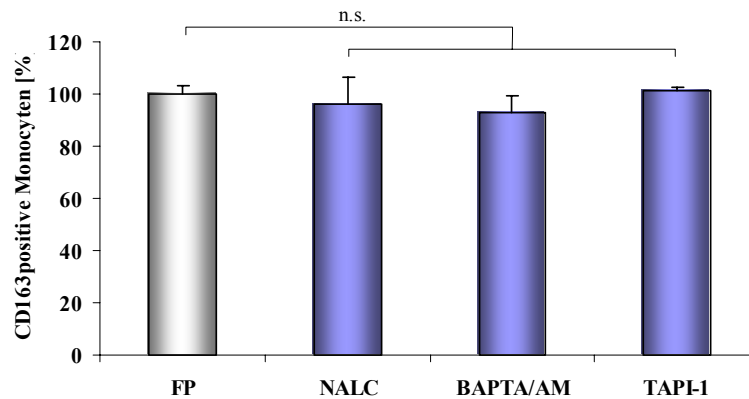


Abb. 19: Wirkung der untersuchten Inhibitoren N-Acetylcystein (NALC), des Calciumchelator (BAPTA/AM) und des TACE-Inhibitors (TAPI-1) auf die Abspaltung von CD163 von der Oberfläche humaner Monocyten. Dargestellt ist das prozentuale Verhältnis der CD163-Antigendichte auf der Zelloberfläche im Vergleich zu maximal stimulierten Zellen (FP). Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von Sechsfachbestimmungen. Statistisch nicht signifikant bei $p > 0,05$ (n.s.) (ANOVA, Tukey's Test).

Es konnte festgestellt werden, dass durch Behandlung der Zellen mit den als Inhibitoren verwendeten Substanzen keine signifikanten Änderungen in der Antigendichte im Vergleich zu den maximal stimulierten Zellen auftraten. Mit CD163-positiven Monocyten von $96,5 \pm 6,2$ % für NALC, $93,0 \pm 9,7$ % für BAPTA/AM und $101,3 \pm 1,2$ % für TAPI-1 übten die Substanzen selbst keinen signifikanten Einfluss auf die CD163-Antigendichte der Zellen aus. Die Effekte, die durch die zusätzliche Inkubation der Zellen mit H_2O_2 zu erkennen waren, sind folglich ausschließlich auf die Reaktion der Inhibitoren mit endogenen Verbindungen, die durch H_2O_2 aktiviert wurden, zurückzuführen.

Durch die Hemmung des Shedding von CD163 mit dem Radikalfänger NALC konnte bestätigt werden, dass ROS als Mediatoren des Shedding von CD163 fungieren. Die Unvollständigkeit der Hemmung kann in einer nicht ausreichend hoch gewählten Konzentration des Radikalfängers begründet sein. Zhang et al. setzten bei ihren Untersuchungen des ROS-induzierten Shedding in einer Monocytenzelllinie eine NALC-Konzentration von 5 mM ein, mit der das Shedding vollständig unterbunden werden konnte [111]. In den eigenen Versuchen wurde eine Konzentration des Radikalfängers von 1 mM verwendet. Eine höhere NALC-Konzentration war in diesen Versuchen nicht möglich, da beobachtet werden konnte, dass diese zum Zelltod der Monocyten führte.

Bei der Untersuchung des Shedding des *Tumor necrosis factor receptor* Typ I (TNF-RI) durch ROS, speziell durch H₂O₂, konnte das Shedding durch eine Vorinkubation mit dem Radikalfänger Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgehoben werden [132]. Hino et al. inkubierten pulmonale Epithelzellen mit einer 1 %igen DMSO-Lösung vor. Die nachfolgende Inkubation mit H₂O₂ führte im Vergleich zu ausschließlich mit H₂O₂ versetzten Zellen zu einer signifikant geringeren Freisetzung des löslichen TNF-RI. Vor allem Hydroxylradikale, die über die H₂O₂-abhängige Fenton-Reaktion gebildet werden, dürften an der Abspaltung als *second messenger* beteiligt sein.

In der Untersuchung zur Hemmung des H₂O₂-induzierten Shedding von CD163 konnte diese Induktion auch durch Chelatisierung von intrazellulären Calciumionen aufgehoben werden (Abb. 18). Dies lässt eine direkte Wechselwirkung von ROS und Calcium bei der Abspaltung vermuten. In verschiedenen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass die ROS und Calcium sich gegenseitig beeinflussen können. Zum einen ist eine erhöhte Calciumkonzentration in der Lage die Produktion von ROS zu stimulieren [146, 147]. Umgekehrt können ROS zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führen [143]. Die Stimulation von Endothelzellen mit exogenem H₂O₂, aber auch durch enzymatisch produzierte endogene ROS, führte zu einem deutlichen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration.

Diese Beobachtungen gehen konform mit den Befunden für die ebenfalls als sheddinginduzierende Verbindungen von CD163 bekannten Substanzen Phorbolster und Lipopolysaccharid [41, 76]. Sowohl die Mobilisierung von Calcium als auch die Bildung von ROS wurden nach Behandlung von mononukleären Zellen mit Phorbolster oder LPS beobachtet. Valdez und Boveris konnten in ruhenden humanen Zellen eine spontane Stickstoffmonoxid- und Superoxidradikalanion-Bildung feststellen [148]. Nach einer Stimulation dieser Zellen mit Phorbolster wurde die Produktion der Sauerstoffspezies um ein Vielfaches gesteigert. Diese verstärkte Produktion der ROS nach Aktivierung der Zellen dient wahrscheinlich sowohl der Induktion der durch ROS bekannten intrazellulären Signaltransduktionen als auch der ROS-bedingten Zelltoxizität. Die Phorbolsterkonzentration der experimentellen Untersuchungen bei der Aktivierung der humanen Monocyten zum Shedding von CD163 war ausreichend niedrig, so dass kaum eine toxische Wirkung auf die Zellen ausgeübt wurde. Es ist wahrscheinlich, dass der Mechanismus des phorbolsterinduzierten Shedding von CD163 ebenfalls über eine ausgeprägte ROS-Bildung verläuft.

Wheeler et al. stellten einen Zusammenhang zwischen einer ausgeprägten Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und der Zellaktivierung durch LPS her [149]. In alveolaren Macrophagen aus Ratten wurde bereits nach 60 Sekunden Stimulation eine hohe Calciumkonzentration detektiert, die rasch wieder auf einen Basalwert zurückfiel. Als effektivste LPS-Dosis erwies sich eine Konzentration von 1 µg/ml. Ein erhöhter Calciumeinstrom konnte durch Vorinkubation der Zellen mit Glycin unterdrückt werden. Es wurde angenommen, dass Glycin über einen Chloridkanal seine Wirkung ausübt, worauf es zu einem spannungsabhängigen Calciumeinstrom in die Zellen kommt. Möglicherweise kommt es zu einer Aktivierung der NADPH-Oxidase, durch die Sauerstoff in Superoxidradikalanionen umgewandelt werden kann [147].

Das H₂O₂-induzierte Shedding von CD163 konnte auch zu einem großen Teil durch den TACE-Inhibitor TAPI-1 unterbunden werden. Eine inhibitorische Wirkung von TAPI auf die Abspaltung von CD163 konnte bereits an LPS-stimulierten Monocyten gezeigt werden [76]. Bei diesen Untersuchungen des durch LPS-induzierten Shedding von CD163 konnte die Abspaltung durch TAPI-0, einem Strukturanalogon des in den eigenen Versuchen eingesetzten TAPI-1, vollständig gehemmt werden. Da die Aktivierung der Metalloproteinase der letzte Schritt der Induktion des Shedding von CD163 sein sollte, konnte die Abspaltung des CD163 unabhängig von dem jeweiligen Stimulanz, LPS oder H₂O₂, durch Hemmung der Metalloproteinase wieder unterbunden werden.

Da die Hemmung durch den Enzyminhibitor TAPI-1 in den eigenen Versuchen nicht vollständig verlief, ist anzunehmen, dass noch weitere Faktoren und/oder Enzyme bei der Abspaltung eine Rolle spielen könnten. Als Enzyme kommen dabei hauptsächlich Enzyme der Familie der ADAMs in Frage. Wie von Matsushita et al. ermittelt, wurde Shedding von CD163 nur durch den endogenen Inhibitor von Metalloproteinasen TIMP-3 gehemmt [72]. Es ist bekannt, dass eine ausschließliche Hemmung durch TIMP-3 auf eine Beteiligung eines Enzyms aus der Familie der ADAMs hindeutet, da Matrixmetalloproteinasen unspezifisch auch durch die anderen Vertreter TIMP-1, -2 und -4 gehemmt werden können. TACE ist bisher das einzige aus der Familie der ADAMs bekannte Enzym, von dem sicher bekannt ist, dass eine Hemmung ausschließlich durch TIMP-3 erfolgt [150]. Die unvollständige Hemmung der Abspaltung des CD163 durch TAPI-1 in den eigenen Untersuchungen ist entweder eine Frage der Konzentration des Inhibitors oder das Shedding basiert auf der Beteiligung weiterer Enzyme. Hintz et al. konnten nach LPS-Stimulation eine vollständige Hemmung des Shedding von CD163 erreichen [76], jedoch wurden in diesen Versuchen

höhere Konzentrationen des Inhibitors eingesetzt. Möglicherweise führt die Aktivierung des Shedding durch LPS zur Aktivierung von anderen in der Abspaltung von CD163 von der Zelloberfläche resultierenden Signalwegen als die Induktion durch H_2O_2 .

Ein TACE-unabhängiger Shedding-Mechanismus konnte bereits für andere membranständige Proteine gezeigt werden, deren Abspaltung ausschließlich durch TIMP-3 als endogenen Inhibitor gehemmt wurde. Ein Beispiel hierfür ist das Shedding des hepatocytären Wachstumsfaktor-Rezeptors Met von humanen Lungenkarzinomzellen durch Phorbol ester oder Shedding von Syndecan-1 und -4 sowie von L-Selectin [151-153]. Die Abspaltung dieser Proteine wurde durch einen TIMP-3-sensitiven Prozess gehemmt. Interessanterweise fand PMA-induziertes Shedding in einem vergleichbaren Ausmaß jedoch auch in Zellen statt, die kein TACE enthielten. Somit konnte TACE als Sheddase für diese membranständigen Proteine ausgeschlossen werden. Eine andere Metalloproteinase wurde jedoch nicht identifiziert.

Parkin et al. versuchten mit Hilfe verschiedener Hydroxamat-Inhibitoren ein Struktur-Aktivitäts-Verhältnis für am Shedding beteiligte Enzyme zu ermitteln [154]. Ziel dieser Analysen war eine genauere Identifizierung der an Sheddingprozessen beteiligten Proteinasen. Die bisher entwickelten Inhibitoren hemmten unspezifisch mehrere Proteinasen. In den Untersuchungen von Parkin et al. konnten bestimmte Strukturtypen von Hydroxamat-basierten Inhibitoren gefunden werden, die in der Tat zwischen verschiedenen Enzymen, wie zum Beispiel Sekretasen, und anderen zinkhaltigen Metalloproteinasen unterscheiden können [154].

Von Zhang et al. konnte eine Verbindung zwischen dem phorbol ester induzierten Shedding und der Beteiligung von ROS am Abspaltungsprozess aufgezeigt werden [111]. In Hemmversuchen des Shedding des p75 Rezeptors wurde sowohl eine H_2O_2 - als auch eine phorbol ester induzierte Abspaltung durch den Radikalfänger NALC inhibiert. ROS scheinen folglich im Sheddingmechanismus des Phorbol esters eine Rolle zu spielen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass H_2O_2 -induziertes Shedding von CD163 in direktem Zusammenhang mit der intrazellulären Calciumkonzentration steht. ROS führen zur Aktivierung einer oder mehrerer Sheddasen, wahrscheinlich Enzyme aus der Familie der ADAMs, die in der Lage sind, CD163 von der Zelloberfläche abzuspalten. Durch die erfolgreiche Inhibierung des H_2O_2 -induzierten Shedding konnte dargestellt werden, dass an der Aktivierung durch H_2O_2 wahrscheinlich mehrere Mechanismen gemeinsam beteiligt sind. Durch Kombination aus Radikalfänger und Calciumchelator wurde die Abspaltung

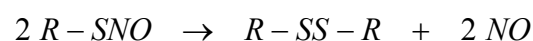
vollständig aufgehoben, so dass ein Zusammenwirken von ROS und Calcium als intrazelluläre Mediatoren bzw. Aktivatoren der Sheddase impliziert werden kann. Obwohl bisher keine Sheddase für das CD163 identifiziert wurde, kann auf Grund der gezeigten Hemmung durch den Inhibitor der Metalloproteinasen davon ausgegangen werden, dass es sich um eine Metalloproteinase handelt.

1.2.1.5 Untersuchung der Induktion des *ectodomain shedding* von CD163 durch Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid (NO) hat als universeller Botenstoff in verschiedenen biologischen Systemen wie dem vaskulären, dem neuronalen und dem Immunsystem eine große regulatorische Bedeutung. Effekte des NO sind die endothelabhängige Relaxation von Blutgefäßen, die Regulation der Freisetzung von Neurotransmittern und die zelluläre Immunantwort. Als Radikal ist es wasserlöslich und kann Membrane weitgehend frei passieren. NO selbst hat in wässrigen Lösungen nur eine sehr kurze Halbwertszeit von drei bis fünf Sekunden, da es schnell zu Nitrit und Nitrat metabolisiert und durch Reaktionen mit körpereigenen Verbindungen neutralisiert wird [155]. Die wichtigsten Reaktionspartner des NO in biologischen Systemen sind Sauerstoff, das Superoxidradikalanion und Übergangsmetalle in freier oder komplexierter Form, wie zum Beispiel Fe^{2+} im Häm (Abb. 10) [156]. Darüber hinaus reagiert NO mit nucleophilen Zentren in Peptiden und Proteinen, wobei an erster Stelle die Reaktionen mit SH-Gruppen der Cysteinreste zu nennen sind [157].

Ebenso wie der Einfluss von H_2O_2 auf das Shedding von CD163 sollte die sheddinginduzierende Wirkung von NO untersucht werden. Auf Grund der kurzen Halbwertszeit des NO in wässrigen Lösungen wurde in den Versuchen der synthetisch hergestellte NO-Donator S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP) eingesetzt, der in der Lage ist, NO *in vivo* zu generieren (Abb. 20).

Es handelt sich dabei um ein S-Nitrosothiol (R-SNO), das gelöst in wässrigem Puffer rasch zerfällt und unter hydrolytischem Aufbrechen der S-N-Bindung NO freisetzt.



Weitere NO-Donatoren sind Trinitroglycerin (GTN), Nitroprussid-Natrium (SNP), 3-Morpholinosydnonim (SIN-1), Dietyltriämin/NO (DETA/NO) oder die von der Acetylsalicylsäure abgeleiteten Verbindungen NCX 4016 und NCX 4215 [158].

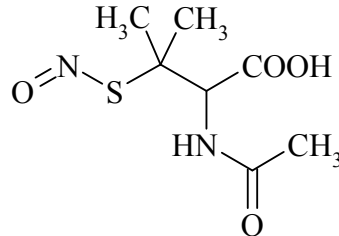


Abb. 20: Struktur des NO-Donators S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP).

Die Bestimmung der Wirkung des NO auf die Abspaltung von CD163 von humanen Monocyten erfolgte analog den Untersuchungen mit H₂O₂ (Allgemeiner Teil, 1.2.1.4.2).

1.2.1.5.1 Induktion des Shedding von CD163 durch Stickstoffmonoxid (NO)

Zur Bestimmung der CD163-Antigendichte auf der Monocytenoberfläche wurde die Intensität der fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörper, die spezifisch an membranständiges CD163 gebunden hatten, bestimmt. In einem Histogramm wurde die Fluoreszenzintensität der unspezifischen Bindung des Fluoreszenzantikörpers (Kontrolle) im Vergleich zu ausschließlich mit FP stimulierten Zellen und den FP-stimulierten Zellen mit zusätzlicher SNAP-Behandlung gegen die gemessene Zellzahl dargestellt (Abb. 21).

Die Monocyten zeigten nach Inkubation mit dem NO-Donator eine geringe, aber deutlich erkennbar verminderte Fluoreszenzintensität (Abb. 21, blaue Linie) gegenüber den maximal stimulierten Zellen (Abb. 21, grau unterlegt). Für die Bindung des fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpers stand nach SNAP-Inkubation weniger CD163 als spezifischer Bindungspartner zur Verfügung als bei den Zellen, die ausschließlich mit FP stimuliert worden waren. SNAP und daraus abgeleitet NO war somit in der Lage, die Antigendichte auf der Oberfläche zu verringern.

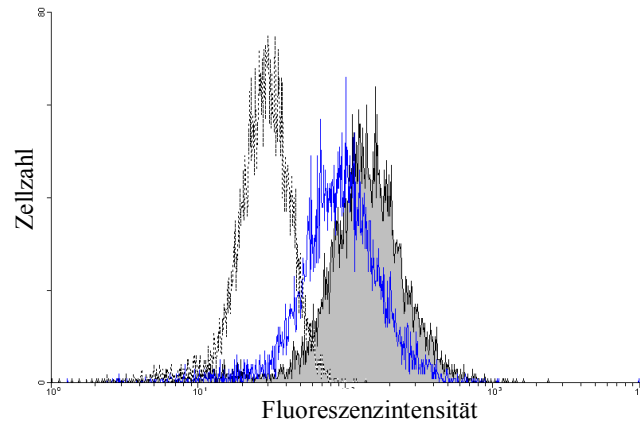


Abb. 21: Durchflusszytometrische Analyse humaner Monocyten nach Inkubation mit S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP). Abgebildet sind die übereinander gelegten Histogramme der Kontrollzellen (gepunktete Linie), der ausschließlich mit FP stimulierten Zellen (grau unterlegt) und der Zellen die nach FP-Stimulation zusätzlich mit SNAP inkubiert wurden (blaue Linie). Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Histogramm, bei dem die Fluoreszenzintensität logarithmisch gegen die Zellzahl aufgetragen ist.

Für die quantitative Bestimmung der Anzahl CD163-positiver Zellen, ermittelt über die jeweilige Fluoreszenzintensität der unterschiedlich behandelten Zellproben, wurden die mit FP zur maximalen Expression angeregten Zellen auf einen Wert von 100 % CD163-positiver Monocyten gesetzt (Abb. 22 Zelloberfläche, FP).

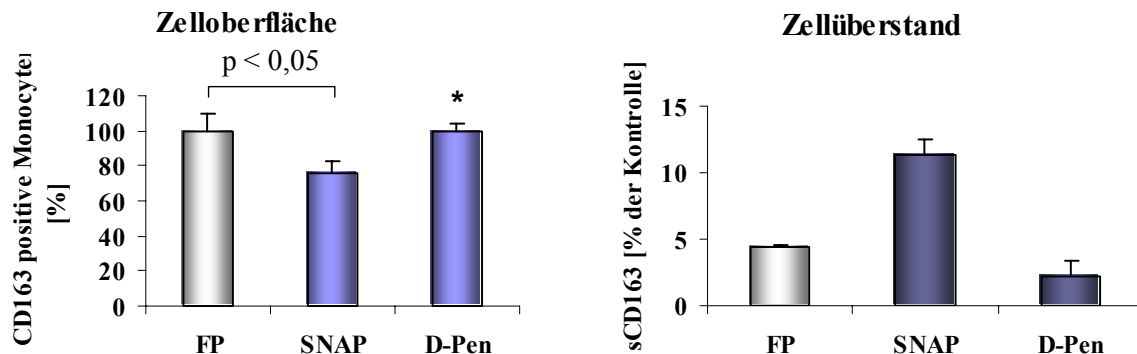


Abb. 22: Shedding von CD163, induziert durch NO. **Zelloberfläche:** Prozentuale Darstellung der Antigendichte auf der Zelloberfläche bei maximal CD163-positiven Zellen (FP) und nach Inkubation mit S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP) und Penicillamin (D-Pen). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von Sechsfachmessungen. Statistische Signifikanz: $p < 0,05$, statistisch nicht signifikant verschieden von FP (*) (ANOVA, Tukey's Test). **Zellüberstand:** Darstellung der Konzentration von sCD163 im Zellüberstand von je $1 \cdot 10^6$ vitaler Zellen nach FP-Stimulation und Inkubation mit SNAP und D-Pen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Mittleren Abweichungen vom Mittelwert (MA) von Dreifachbestimmungen.

Zur Kontrolle, ob NO und nicht der Molekülrest, der bei der Freisetzung des NO generiert wird, oder eine andere funktionelle Gruppe des SNAP für diesen Effekt verantwortlich war, wurde als Kontrollsubstanz das D-Penicillamin (D-Pen), das diesen Molekülrest darstellt, in die Untersuchungen mit aufgenommen (Abb. 23).

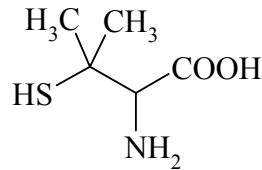


Abb. 23: Struktur des D-Penicillamin (2-Amino-3-mercapto-3-methylbuttersäure, D-Pen).

Auf den Maximalwert der FP-stimulierten Zellen bezogen konnte nach SNAP-Stimulation ein Anteil an CD163 positiven Zellen von $76,1 \pm 6,9$ % ermittelt werden (Abb. 22 Zelloberfläche, SNAP). Die Fluoreszenzintensität dieser Zellen war damit signifikant unterschiedlich zu den FP-stimulierten Zellen ($p < 0,05$). Durch die Inkubation mit SNAP und der daraus erfolgten Freisetzung des NO konnte eine Abnahme der Fluoreszenzintensität von circa 24 % bewirkt werden.

Nach Inkubation der Zellen mit D-Pen konnte dagegen keine signifikante Änderung der Fluoreszenzintensität festgestellt werden ($99,4 \pm 5,3$ %). Daraus ließ sich schließen, dass für die stimulierende Wirkung des SNAP auf das Shedding von CD163 ausschließlich NO verantwortlich ist und nicht ein anderes Strukturelement dieser Verbindung.

Als Gegenkontrolle zur Untersuchung der Abnahme der Antigendichte auf der Zelloberfläche wurde die Konzentration des sCD163 im Zellüberstand nach Behandlung der Zellen mit SNAP und der Kontrollsubstanz D-Pen bestimmt (Abb. 22 Zellüberstand). Bezogen auf die Zellüberstände unstimulierter Monocyten konnte neben einer geringen Konzentration an sCD163 im Überstand der mit FP-stimulierten Zellen eine bedeutend größere Konzentration sCD163 im Zellüberstand der mit SNAP-behandelten Zellen detektiert werden. Die Konzentration des sCD163 im Überstand der mit D-Pen inkubierten Zellen war ähnlich den FP-stimulierten Zellen.

Damit konnte gezeigt werden, dass NO das Shedding von CD163 induzieren kann. Im Gegensatz zu den FP-stimulierten Zellen mit $4,3 \pm 0,3$ % lag die Menge sCD163 im Überstand der mit NO-behandelten Zellen bei $11,4 \pm 1,1$ %. Da auch bei der Bestimmung der CD163-Dichte auf der Oberfläche der Monocyten eine signifikante Abnahme durch NO erreicht werden konnte, ist ein NO-induziertes Shedding anzunehmen. Die Kontrollsubstanz D-Pen bewirkte im Zellüberstand keine Erhöhung der sCD163-Konzentration. Der geringe ermittelte Anteil von $2,3 \pm 1,1$ % rührt wahrscheinlich ebenso wie bei den FP-stimulierten Zellen von einer spontanen Abspaltung des sCD163 entweder physiologisch oder auf Grund von Zellreizungen bei der Aufarbeitung her.

Neben H_2O_2 konnte mit NO eine weitere endogene Substanz identifiziert werden, die zu einem Shedding von CD163 führt. Die Effektivität dieser Verbindung war allerdings weniger stark ausgeprägt als bei H_2O_2 , obwohl beide Verbindungen in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt wurden. Der von H_2O_2 erzielte Effekt auf die Abspaltung lag nahezu doppelt so hoch. Möglicherweise ist diese geringere Wirkung des NO in einer verminderten oder verzögerten Freisetzung aus der Donorverbindung SNAP begründet. Andererseits weisen H_2O_2 und NO, obwohl beide Vertreter der ROS sind, große Unterschiede in Art und Ausmaß ihrer physiologischen und pathologischen Bedeutung im Körper auf, so dass die unterschiedliche Intensität der Induktion dieses Shedding, wahrscheinlich auf Grund unterschiedlicher Aktivierungsmechanismen, nicht ungewöhnlich ist.

Die NO-induzierte Abspaltung von CD163 könnte von einer intrazellulären Bildung weiterer ROS durch NO herrühren. Bei Untersuchungen zur Apoptose neuronaler Zellen durch hohe NO-Konzentrationen konnten Wei et al. einen starken Konzentrationsanstieg an ROS in diesen Zellen nach Inkubation mit SNAP zeigen [159]. Dieser Effekt wurde durch eine Hemmung des Elektronentransfers in der Atmungskette der Mitochondrien durch NO hervorgerufen. NO kann die Aktivität verschiedener Enzyme in der Atmungskette hemmen, wodurch ein Elektronenleck induziert wird, das in einer verstärkten Bildung von endogenen ROS mündet [160].

Auch zwischen NO und Calcium lassen sich direkte Verbindungen herstellen [161]. Die endogene Bildung des NO beruht auf der Umsetzung von L-Arginin mittels NO-Synthase (NOS) zu NO [162]. Zellspezifisch existieren verschiedene Isoenzyme der NOS. Die Aktivierung dieser Enzyme ist stark calmodulinabhängig und eine Bindung der Enzyme an Calmodulin erfolgt ausschließlich in Anwesenheit von Calcium. Somit ist für die endogene Synthese des NO das Vorhandensein von Calcium essentiell. Eine Chelatierung von Calcium führt zu einer eingeschränkten endogenen NO-Synthese und einer geringeren NO-Konzentration in der Zelle.

1.2.1.5.2 Hemmung des stickstoffmonoxidinduzierten Shedding von CD163

Da NO in ähnlicher Weise wie H₂O₂ die Abspaltung von CD163 induzieren konnte, sollte für NO ebenfalls die Hemmung dieses Vorgangs analog der Inhibierung des H₂O₂-induzierten Shedding (Allgemeiner Teil, 1.2.1.4.3) untersucht werden. In Anbetracht der geringeren abspaltenden Wirkung des aus S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP) freigesetzten NO wurden die Hemmversuche auf die Untersuchung der Radikalfängereigenschaften von N-Acetylcystein (NALC) (Allgemeiner Teil, 1.2.1.4.3) und die Hemmung des *Tumor necrosis factor- α converting enzyme* (TACE) (Allgemeiner Teil, 1.2.1.4.3) beschränkt.

Über die Ermittlung der Fluoreszenzintensität mittels Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass beide Inhibitoren in der Lage waren, das NO-induzierte Shedding von CD163 nahezu aufzuheben (Abb. 24).

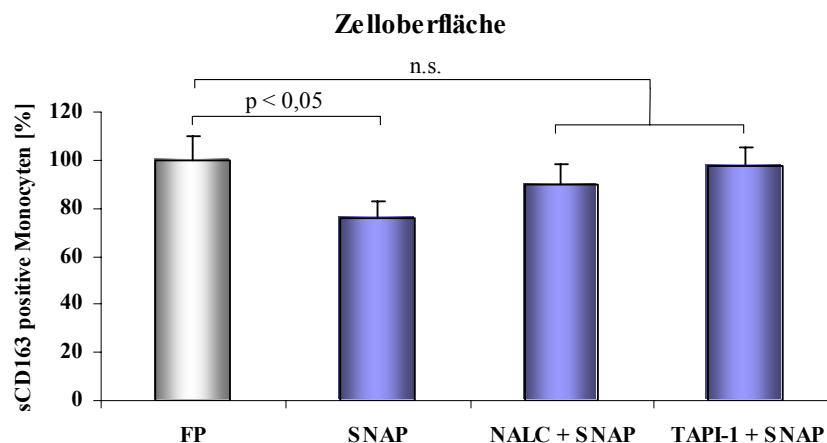


Abb. 24: Hemmung des NO-induzierten Shedding von CD163 von der Oberfläche humaner Monocyten. Im Vergleich zur Inkubation mit dem NO-Donator S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP) konnte die Vorinkubation der Monocyten mit N-Acetylcystein (NALC) und dem TACE-Inhibitor (TAPI-1) die Abnahme der Antigendichte reduzieren. Die Ergebnisse wurden auf Zellen mit maximaler Expression an CD163 nach FP-Stimulation (FP) bezogen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von Sechsfachbestimmungen. Statistische Signifikanz: $p < 0,05$, statistisch nicht signifikant $p > 0,05$ (n.s.) (ANOVA, Tukey's Test).

Sowohl nach Vorinkubation mit NALC als auch mit TAPI-1 unterschied sich die Antigendichte des CD163 auf der Zelloberfläche der Monocyten durch nachfolgende Inkubation mit SNAP nicht signifikant von den FP-stimulierten Zellen (FP) ($p > 0,05$, n.s.). Nach TAPI-1-Vorbehandlung konnten $97,8 \pm 7,5$ % CD163-positive Zellen detektiert werden, für die Inhibierung des Shedding durch Abfangen des NO oder daraus generierter ROS durch NALC waren es $89,9 \pm 8,1$ %.

Im Vergleich mit H₂O₂-induziertem Shedding schienen die Inhibitoren auf das NO-induzierte Shedding stärkeren Einfluss zu nehmen, da es nahezu vollständig aufgehoben werden konnte. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass von dem NO-Donator SNAP freigesetztes NO in den Untersuchungen zur Abspaltung des CD163 an sich bereits eine viel geringere Sheddingeffizienz gezeigt hat als H₂O₂. Theoretisch wäre eine langsame Freisetzung des NO aus SNAP denkbar, wodurch auch die Zunahme der Konzentration an NO in der Inkubationslösung langsamer verlief. Das entstandene NO könnte so von den Inhibitoren leichter und schneller abgefangen werden.

Es konnte schon früher gezeigt werden, dass NALC in der Lage ist, als Radikalfänger NO-induzierte Effekte aufzuheben [163]. Ebenfalls ist bekannt, dass NO ein TACE-abhängiges Shedding induzieren kann [110].

Neben einer Verstärkung der absplattenden Wirkung durch NO in LPS/Phorbolster stimulierten Zellen konnte für die Abspaltung des *Tumor necrosis factor* Rezeptors p75 und L-Selectin durch NO eine direkte Beteiligung von TACE nachgewiesen werden [110]. Ebenfalls war über einen Donator freigesetztes NO in der Lage, in einer dosisabhängigen Weise die Abspaltung beider Proteine von der Zelloberfläche zu bewirken, ohne die Transkription des TACE zu beeinflussen. Dieser Effekt war *in vitro* auf der Bildung eines Nitrosothiols mit dem Cysteinrest in der inhibitorischen Prodomäne des TACE, ähnlich wie bei der Inhibierung des H₂O₂-induzierten Shedding, begründet. Die Aktivierung von TACE verläuft über den „*cystein switch*“. Da es sich bei NO um ein membranpermeables Molekül handelt, wurde von Zhang et al. die Aktivierung eines intrazellulären Pools an latentem TACE postuliert [110].

Neben der Aktivierung von TACE konnte in verschiedenen Untersuchungen die Aktivierung anderer Metalloproteinasen durch NO gezeigt werden. Trachtman et al. konnten zeigen, dass aus S-Nitroso-N-acetylpenicillamin freigesetztes NO in Rattenzellen dosisabhängig zur Aktivierung einer 72-kDa großen neutralen Matrixmetalloproteinase (MMP) führt. Ein ebensolcher Effekt konnte auch durch Inkubation der Zellen mit Lipopolysaccharid und dem Interferon- γ (IFN- γ) ausgelöst werden. Beide Verbindungen können zur NO-Freisetzung in Zellen führen, die in einer direkten Stimulation der NO-Synthase durch Lipopolysaccharid und IFN- γ begründet ist [164]. Eine Inhibierung der NO-Synthase konnte zu einer Umkehrung der Lipopolysaccharid/IFN- γ -induzierten Effekte führen.

Okamoto et al. konnten eine Aktivierung von humaner Prokollagenase (MMP-8) durch NO in humanen Neutrophilen nachweisen [165]. Darüber hinaus konnte die NO-induzierte Aktivierung von MMP in Gelenkknorpeln und in rheumatoiden Synovialzellen nachgewiesen werden [166, 167]. Hierbei führte die Aktivierung der MMP zu Degradierungen der Zellulärmatrix. Gleichzeitig wurde nach NO-Zusatz keine Aktivierung der endogenen Inhibitoren der MMPs TIMP-1 und TIMP-2 detektiert, wodurch NO Bedeutung als proinflammatorisches Stimulanz erhielt.

Mit der in den eigenen Untersuchungen gezeigten sheddinginduzierenden Wirkung auf das membranständige CD163 erhält NO auch antiinflammatorische Bedeutung. Es ist wie H₂O₂ in der Lage, sowohl eine Entzündung zu initiieren als auch die Generierung des antiinflammatorisch wirksamen sCD163 einzuleiten, das dieser Entzündung entgegenwirkt.

1.2.2 Untersuchung der Induktion des *ectodomain shedding* von CD163 durch Isoprostaglandin

Reaktive Sauerstoffspezies können im Körper zur Bildung von Verbindungen führen, die unter anderem als Marker für oxidativen Stress genutzt werden können. Eine der bekannten Zielstrukturen für oxidative Angriffe sind mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Beispiele für Endprodukte einer solchen Oxidation sind die Isoprostaglandine [168].

In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Isoprostaglandine zuverlässige und sensible Marker für oxidativen Stress *in vivo* bei verschiedenen Erkrankungen sind [169]. Beispiele sind kardiovaskuläre und neurodegenerative Erkrankungen, Entzündungen und Arteriosklerose.

Isoprostaglandine können sowohl im Plasma als auch im Urin detektiert werden. Die Konzentration der Isoprostaglandine korreliert dabei direkt mit dem Ausmaß der ROS-abhängigen Lipidoxidation. Ein Vorteil der Isoprostaglandine gegenüber anderen Parametern der quantitativen Bestimmung von oxidativem Stress ist ihre große Stabilität in verschiedenen Körperflüssigkeiten, wie Plasma und Urin, aber auch in Cerebrospinal-, Pericardial- und Bronchoalveolarflüssigkeiten [170]. Andere Produkte der Lipidoxidation, wie Malondialdehyd, andere Peroxide oder konjugierte Diene sind zumeist metabolisch oder chemisch instabil, oder, wie bei Ethanol, leicht flüchtig. Ihre Konzentration spiegelt das Ausmaß des oxidativen Stresses und damit die Schwere der damit korrelierten Erkrankung wider.

Eine besondere Bedeutung kommt dem 8-iso Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (8-iso $PGF_{2\alpha}$) zu. Diese Verbindung hat sich als der am besten geeignete Marker für oxidativen Stress erwiesen. Von den unterschiedlichen Isomeren wurden besonders hohe Konzentrationen an 8-iso $PGF_{2\alpha}$ bei pathologischen Zuständen gefunden [171].

Da 8-iso $PGF_{2\alpha}$ ebenfalls regelmäßig im Zusammenhang mit Entzündungen zu finden ist, sollte untersucht werden, ob auch Isoprostaglandine, und hier speziell das 8-iso $PGF_{2\alpha}$, als endogene Produkte von Oxidationsreaktionen mit ROS, ebenfalls zu einem Shedding von CD163 führen können.

1.2.2.1 Biosynthese und Bezeichnung von Isoprostaglandinen

Isoprostaglandine gehören zur Familie der Eicosanoide. Es handelt sich dabei um prostaglandinähnliche Verbindungen, die im Gegensatz zu den Prostaglandinen nichtenzymatisch über eine radikalkatalysierte Oxidation gebildet werden [172]. Edukte dieser Reaktion sind die Arachidonsäure, aber auch andere mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Der allgemein postulierte Mechanismus der Bildung dieser Isoprostaglandine aus einer Fettsäure führt über die Abstraktion eines allylischen Wasserstoffatoms zuerst zur Bildung eines Arachidonyl-Radikals [173]. Durch Insertion von molekularem Sauerstoff erfolgt anschließend die Generierung von Peroxylradikalen. Abhängig von der Angriffsstelle des Sauerstoffs können bei dieser Reaktion vier verschiedene Isomere entstehen. Durch Zyklisierung der Radikale und nachfolgende Addition eines weiteren Sauerstoffmoleküls entstehen Bicyclo-Endoperoxide. Diese Intermediate können schließlich zu den Isoprostaglandinen reduziert werden. Aus jedem der vier Isomere können theoretisch acht racemische Diastereomere gebildet werden, so dass aus einer Fettsäure über diesen Mechanismus insgesamt 64 verschiedene Verbindungen entstehen könnten.

Isoprostaglandine kommen in nahezu allen Körperflüssigkeiten vor, wobei ihre Konzentration die der Prostaglandine weit übersteigt [174].

Neben der unterschiedlichen Entstehung unterscheiden sich die Isoprostaglandine von den Prostaglandinen auch strukturell. Wichtigstes Merkmal ist die Stellung der Seitenketten am Cyclopentanring. Bei den Isoprostaglandinen sind die Ketten in *cis*-Stellung zueinander angeordnet, während Prostaglandine eine *trans*-Stellung aufweisen (Abb. 25).

Auf Grund der Vielfalt der Isoprostaglandine wurde ein eigenes Nomenklatorsystem eingeführt. Dieses System lehnt sich an das bekannte System der Prostaglandine an, wurde aber durch eine Klassifizierung der Regioisomere erweitert [175].

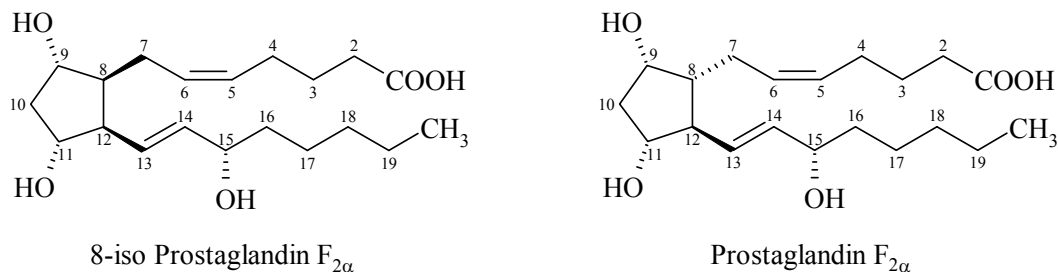


Abb. 25: Strukturvergleich von Isoprostaglandinen und Prostaglandinen am Beispiel von 8-iso Prostaglandin $F_{2\alpha}$ und Prostaglandin $F_{2\alpha}$. Bei 8-iso Prostaglandin $F_{2\alpha}$ stehen die Seitenketten an Position 8 und 12 *cis* zueinander, bei dem isomeren Prostaglandin $F_{2\alpha}$ stehen die Seitenketten an den Positionen 8 und 12 *trans* zueinander.

1.2.2.2 Biologische Bedeutung der Isoprostaglandine

Neben ihrer Eigenschaft als Markersubstanzen entfalten Isoprostaglandine biologische Aktivitäten und übernehmen Aufgaben als Mediatoren. Untersuchungen der Isoprostaglandine 8-iso Prostaglandin E_2 und 8-iso Prostaglandin $F_{2\alpha}$ zeigten, dass beide Substanzen *in vitro* auf viele Gewebe als potente Vasokonstriktoren wirken [170, 172]. Für 8-iso $PGF_{2\alpha}$ konnte eine ausgeprägte konstriktorische Eigenschaft auf renale und pulmonale Gefäße und auf die Bronchien festgestellt werden [176, 177]. Ebenso konnte für das E-Ring-Isoprostaglandin eine renale vasokonstriktorische Wirkung gezeigt werden, die der Wirkung des F_2 -Isoprostaglandins nahezu equipotent war [171]. Dies ist umso bedeutender, als die beiden isomeren Prostaglandine Prostaglandin E_2 und $F_{2\alpha}$ entgegengesetzte biologische Effekte aufweisen. Prostaglandin E_2 ist ein potenter Vasodilator, wogegen Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ein Vasokonstriktor ist.

Daneben konnten Pratico et al. *in vitro* durch 8-iso $PGF_{2\alpha}$ eine Aktivierung humaner Blutplättchen zu einer verstärkten Aggregation feststellen [178]. Jedoch lagen die Konzentrationen, die für diesen Effekt nötig waren, so hoch, dass es fraglich ist, ob das Isoprostaglandin *in vivo* eine derartige Wirkung auf die Plättchen hat.

Von Janssen wurde dargelegt, dass Isoprostaglandine wahrscheinlich auf nahezu jeden Zelltyp in der Lunge eine Wirkung ausüben [170]. So konnte auch eine Steigerung der

Aktivität von polymorphnuklearen Granulocysten und eine gesteigerte Adhäsion an Endothelzellen sowohl durch 8-iso PGF_{2α} als auch 8-iso PGE₂ ermittelt werden.

Es ist damit belegt, dass Isoprostaglandine als biologische Effektoren Einfluss auf verschiedene physiologische und möglicherweise auch pathologische Funktionen im Körper nehmen können und deshalb nicht nur eine Bedeutung als Marker für diagnostische Zwecke haben.

1.2.2.3 Induktion des Shedding von CD163 durch 8-iso-Prostaglandin F_{2α}

Isolierte humane Monocyten wurden zur Bestimmung der Effektivität des 8-iso PGF_{2α}, Shedding von CD163 zu induzieren, mit Fluticasonpropionat zur maximalen CD163-Expression vorstimuliert (Experimenteller Teil, 2.5). Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 8-iso PGF_{2α} in einem Konzentrationsbereich von 10⁻¹¹ M bis 10⁻⁵ M. Die Anzahl CD163-positiver Monocyten wurde analog dem für H₂O₂ beschriebenen Prinzip (Allgemeiner Teil, 1.2.1.4.1) über die Fluoreszenzintensität des spezifisch gebundenen fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpers bestimmt (Abb. 26).

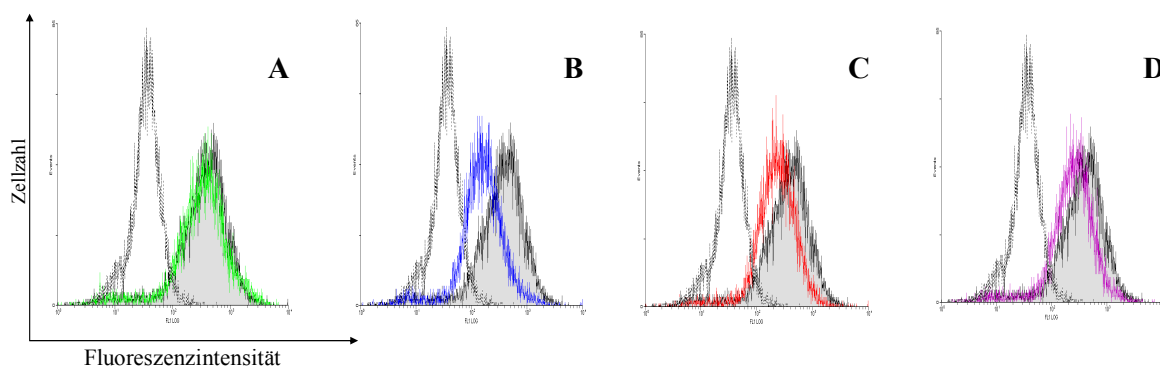


Abb. 26: Durchflusszytometrische Analyse humaner Monocyten nach Inkubation mit 8-iso Prostaglandin F_{2α} (8-iso PGF_{2α}) in unterschiedlichen Konzentrationen. Dargestellt sind jeweils die übereinander gelegten Histogramme von Kontrollzellen (gepunktete Linie), ausschließlich mit FP stimulierten Zellen (grau unterlegt) und Zellen, die nach FP-Stimulation zusätzlich mit 8-iso PG F_{2α} inkubiert wurden. **A** Inkubation mit 8-iso PGF_{2α} 10⁻¹¹ M (grüne Linie). **B** Inkubation mit 8-iso PGF_{2α} 10⁻⁹ M (blaue Linie). **C** Inkubation mit 8-iso PGF_{2α} 10⁻⁷ M (rote Linie). **D** Inkubation mit 8-iso PGF_{2α} 10⁻⁵ M (violette Linie). Abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Histogramm, bei dem die Fluoreszenzintensität logarithmisch gegen die Zellzahl aufgetragen ist.

In den Histogrammen der durchflusszytometrischen Analyse war ab einer Konzentration des 8-iso PGF_{2α} von 10⁻⁹ M eine deutliche Abschwächung des Fluoreszenzsignals zu

erkennen. 8-iso PGF_{2α} bewirkte folglich eine Änderung der Antigendichte von CD163 auf der Zelloberfläche.

Die niedrigste Konzentration an 8-iso PGF_{2α} von 10⁻¹¹ M zeigte in den durchgeführten Versuchen kaum eine Wirkung (Abb. 26, A grüne Linie). Die Stärke der Fluoreszenzintensität des Signals von Zellen, die mit 10⁻¹¹ M 8-iso PGF_{2α} inkubiert worden waren, war nahezu identisch mit dem Signal der maximal CD163-positiven Zellen. Durch eine Erhöhung der Konzentration an 8-iso PGF_{2α} auf 10⁻⁹ M zeigte sich dagegen ein ausgeprägter Effekt auf die Oberflächenbeschaffenheit der stimulierten Zellen (Abb. 26, B blaue Linie).

Bei weiterer Erhöhung der Konzentration des 8-iso PGF_{2α} auf 10⁻⁷ M (Abb. 26, C rote Linie) oder 10⁻⁵ M (Abb. 26, D violette Linie) konnte ebenfalls eine Abnahme der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den maximal CD163-positiven Zellen beobachtet werden. Jedoch schien durch diese Konzentrationen keine weitere Steigerung des CD163-abspaltenden Effektes hervorgerufen zu werden.

Dieser konzentrationsabhängige Einfluss des 8-iso PGF_{2α} konnte in der prozentualen Darstellung der CD163-positiven Zellen nach Inkubation mit dem Isoprostaglandin in den unterschiedlichen Konzentrationen dargestellt werden (Abb. 27). Zur Bestimmung der Spezifität der Wirkung des Isoprostaglandins wurden analog dem 8-iso PGF_{2α} in Parallelversuchen Monocyten mit dem isomeren Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) versetzt und die CD163-Dichte auf der Zelloberfläche bestimmt (Abb. 27).

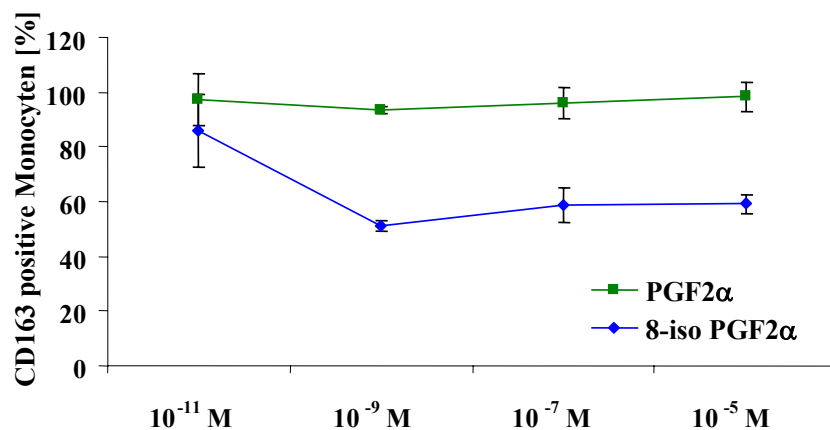


Abb. 27: Konzentrationsabhängiger Effekt von 8-iso Prostaglandin F_{2α} (8-iso PGF_{2α}) und PGF_{2α} (PGF_{2α}) auf das Shedding von CD163. Dargestellt ist der prozentuale Anteil CD163 positiver Monocyten nach Behandlung mit 8-iso PGF_{2α} bzw. PGF_{2α} innerhalb eines Konzentrationsbereiches von 10⁻¹¹ M bis 10⁻⁵ M. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von Sechsfachbestimmungen.

Die Behandlung von Monocyten mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ zeigte über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich von 10^{-11} M bis 10^{-5} M keine signifikante Änderung der CD163-Dichte auf der Zelloberfläche (Abb. 27). Im Gegensatz dazu konnte durch das isomere Isoprostaglandin konzentrationsabhängig eine deutliche Reduktion der Antigendichte hervorgerufen werden (Abb. 27).

Wie bereits bei der Darstellung der Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse dargestellt, konnte bei der niedrigsten der eingesetzten 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentration von 10^{-11} M kaum eine Änderung der CD163-Dichte auf der Zelloberfläche festgestellt werden ($85,9 \pm 13,4$ %) und diese Zellen unterschieden sich nicht signifikant von den FP-stimulierten oder den in der gleichen Konzentration mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ stimulierten Zellen ($p > 0,05$, n.s.).

Die deutlichste Änderung der CD163-Dichte auf der Zelloberfläche wurde durch 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ in einer Konzentration von 10^{-9} M bewirkt (Abb. 27). In dieser Konzentration konnte eine prozentuale Abnahme der Antigendichte von nahezu 50 % ermittelt werden. Bei einer weiteren Erhöhung der Konzentration auf 10^{-7} M, respektive 10^{-5} M, wurde keine weitere Steigerung der CD163-Abnahme beobachtet. Die 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentration von 10^{-9} M wurde in allen weiteren Versuchen verwendet.

Zur Kontrolle, ob 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ die Abnahme der CD163-Dichte von der Zelloberfläche ursächlich durch den Prozess des Shedding bewirkt und nicht durch Internalisierung oder Zerstörung des Proteins, wurde wiederum die Konzentration an sCD163 in den Zellüberständen untersucht (Abb. 28). Es wurden ausschließlich Konzentrationen von 10^{-9} M 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$, respektive $\text{PGF}_{2\alpha}$, eingesetzt.

Komplementär zu der signifikanten Abnahme des CD163 von der Zelloberfläche nach Inkubation der Zellen mit 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Abb. 28, Zelloberfläche) konnte im Zellüberstand eine signifikante Zunahme der Konzentration an sCD163 gefunden werden (Abb. 28, Zellüberstand). Die mit 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ behandelten Zellen wiesen im Überstand einen Anteil an sCD163 von $27,4 \pm 2,7$ % auf. Die mangelnde Wirkung des $\text{PGF}_{2\alpha}$ auf die Abspaltung des CD163 von der Zelloberfläche (Abb. 28 Zelloberfläche) spiegelte sich ebenfalls im Anteil des löslichen Proteins im Zellüberstand wider. So konnte für das $\text{PGF}_{2\alpha}$ in einer dem 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ äquivalenten Konzentration nur ein Anteil von ungefähr $3,2 \pm 1,6$ % gefunden werden. Diese geringe Menge sCD163 entsprach wahrscheinlich, wie bei den FP-stimulierten Zellen, dem physiologisch abgespaltenen Anteil oder einem Anteil, der durch das Aufarbeitungsverfahren der Zellen bedingt ist.

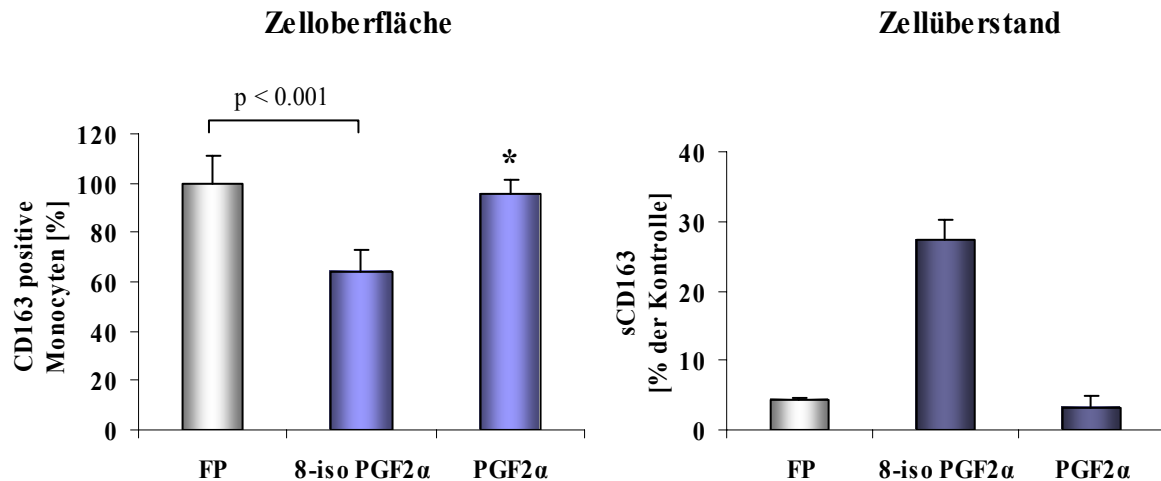


Abb. 28: Shedding von CD163, induziert durch 8-iso Prostaglandin F_{2α}. **Zelloberfläche:** Prozentuale Darstellung der Antigendichte auf der Zelloberfläche bei maximal CD163-positiven Zellen (FP) und nach Inkubation mit 8-iso Prostaglandin F_{2α} (8-iso PGF_{2α}) und Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von Sechsfachmessungen. Statistische Signifikanz $p < 0,05$, statistisch nicht signifikant verschieden von FP (*) (ANOVA, Tukey's Test). **Zellüberstand:** Darstellung der Konzentration von sCD163 im Zellüberstand von je $1 \cdot 10^6$ vitaler Zellen nach FP-Stimulation und Inkubation mit 8-iso PGF_{2α} und PGF_{2α} im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Mittlere Abweichung vom Mittelwert (MA) von Dreifachbestimmungen.

Für das 8-iso PGF_{2α} als ein natürliches Produkt der Reaktion von ROS mit ungesättigten Fettsäuren konnte durch diese *In-vitro*-Untersuchungen eine vollkommen neue biologische Funktion beschrieben werden. Neben seiner Bedeutung als sensitiver Marker für oxidativen Stress und anderen zellulären Funktionen konnte erstmals gezeigt werden, dass 8-iso PGF_{2α} in einer Konzentration ab 10^{-9} M in der Lage ist, durch *ectodomain shedding* eines Proteins einen antiinflammatorischen Faktor freizusetzen.

Im Plasma wurden unter physiologischen Bedingungen bei gesunden Probanden Isoprostaglandinkonzentrationen von $1,3 \cdot 10^{-10}$ M bis $2,8 \cdot 10^{-10}$ M gefunden, wobei sich ein steigender Trend der Konzentrationen mit zunehmendem Alter der Testpersonen abzeichnete [179]. Die Plasmakonzentrationen an 8-iso PGF_{2α} für Asthmapatienten liegen in einem Bereich von $3,4 \cdot 10^{-10}$ M bis $1,3 \cdot 10^{-9}$ M [180]. Die in den eigenen Versuchen eingesetzten Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-9}$ M oder höher lagen damit höher als die physiologische Konzentration des 8-iso PGF_{2α}. Mit $1 \cdot 10^{-9}$ M wurde eine Konzentration eingesetzt, die auch im pathologischen Geschehen beobachtet werden konnte. Eine niedrigere Konzentration, wie zum Beispiel die in den hier dargestellten Versuchen von 10^{-11} M 8-iso PGF_{2α}, zeigte keinen Einfluss auf das Shedding von CD163. Folglich greift das Isoprostaglandin in erhöhten Konzentrationen in den Abspaltungsprozess des CD163 ein. Dieser Vorgang setzt eine

erhöhte Bildung von ROS voraus, da ROS in pathologisch hohen Konzentrationen zur verstärkten Bildung der Isoprostaglandine führen.

1.2.2.4 Hemmung des 8-iso Prostaglandin F_{2α}-induzierten Shedding von CD163

8-iso PGF_{2α} wird unter Beteiligung von ROS gebildet. Zudem ist ein steigernder Effekt von 8-iso PGF_{2α} auf die intrazelluläre Calciumkonzentration in Blutplättchen beschrieben worden [181]. Es stellte sich die Frage, inwiefern das 8-iso PGF_{2α}-induzierte Shedding von CD163 durch verschiedene Inhibitoren gehemmt werden kann. Untersucht wurde wieder der Einfluss des Radikalfängers NALC, des Calciumchelators BAPTA/AM und von TAPI-1, dem Metalloproteinaseinhibitor, analog der Hemmung des H₂O₂-induzierten Shedding von CD163 (Allgemeiner Teil, 1.2.1.4.3).

Nach Vorinkubation der CD163-positiven Zellen mit dem jeweiligen Inhibitor und anschließender Behandlung mit 8-iso PGF_{2α} konnte eine hemmende Wirkung der Inhibitoren auf das Shedding von CD163 durch 8-iso PGF_{2α} beobachtet werden (Abb. 29).

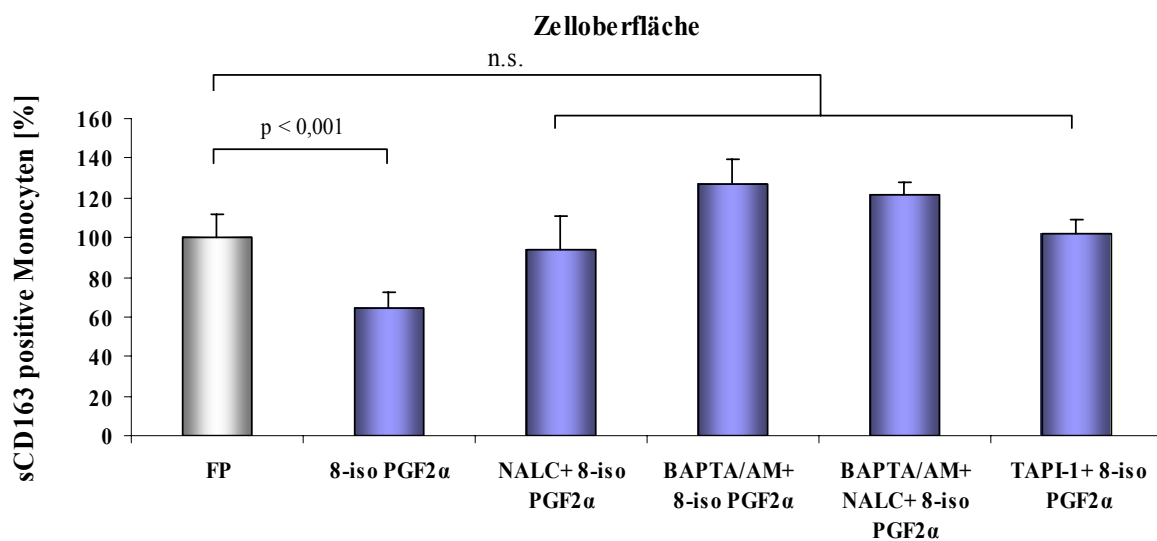


Abb. 29: Hemmung des 8-iso PGF_{2α}-induzierten Shedding von CD163 von der Oberfläche humaner Monocyten. Im Vergleich zur Inkubation mit 8-iso PGF_{2α} konnte die Vorinkubation der Monocyten mit N-Acetylcystein (NALC), einem TACE-Inhibitor (TAPI-1), einem Calciumchelator (BAPTA/AM) oder einer Kombination aus BAPTA/AM und NALC die Abnahme der Antigendichte reduzieren. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung von Sechsfachbestimmungen. Statistische Signifikanz: p < 0,05, statistisch nicht signifikant: p > 0,05 (n.s.) (ANOVA, Tukey's Test).

NALC und TAPI-1 bewirkten eine vollständige Aufhebung der sheddinginduzierenden Wirkung des 8-iso PGF_{2α}. Mit einem prozentualen Anteil an membranständigem CD163 in

den analysierten Zellen von $94,2 \pm 16,3$ % nach Vorinkubation mit NALC und $101,9 \pm 7,0$ % nach TAPI-1-Vorinkubation lag die Anzahl CD163-positiver Zellen im Bereich der Standardabweichung der ausschließlich mit FP-stimulierten Zellen ($100,0 \pm 11,4$ %). Durch den Einsatz des Calciumchelators BAPTA/AM schien die Zahl CD163-positiver Zellen sogar noch anzusteigen. Der Anteil CD163-positiver Zellen betrug nach Vorinkubation mit BAPTA/AM $126,6 \pm 12,7$ %. Die Kombination von BAPTA/AM und NALC ($121,5 \pm 6,9$ %) führte ebenfalls zu einer größeren Anzahl CD163-positiver Zellen als FP selber. Beide Werte unterschieden sich jedoch nicht signifikant von den ausschließlich mit FP-stimulierten Zellen ($p > 0,05$, n.s.).

Die Ergebnisse der Inhibition des 8-iso PGF_{2α}-induzierten Shedding von CD163 haben gezeigt, dass 8-iso PGF_{2α} möglicherweise über ROS und/oder Calcium als Aktivator der Sheddase die Abspaltung des CD163 bewirkt. Ebenso wie bei der Induktion des Shedding von CD163 durch ROS konnte das Shedding durch Vorinkubation mit NALC nahezu vollständig unterbunden werden.

Eine abfangende Wirkung des NALC auf 8-iso PGF_{2α} konnte bereits in klinischen Studien für endogenes und exogen zugeführtes 8-iso PGF_{2α} gezeigt werden. Tossios et al. fanden bei Patienten mit Herzinfarkttrisiko als Folge hoher ROS-Konzentrationen eine verminderte Konzentration an 8-iso PGF_{2α} als Marker für oxidativen Stress nach Applikation von NALC [182]. Im Zusammenhang mit der Untersuchung von diabetesbedingter embryonaler Missgestaltung bei Ratten konnte von Wentzel und Eriksson ein vergleichbarer Effekt von endogen gebildetem und exogen zugeführtem 8-iso PGF_{2α} erzielt werden [183]. Sowohl die Konzentration als auch die teratogenen Effekte des 8-iso PGF_{2α} konnten durch die Zugabe von Superoxiddismutase oder NALC stark vermindert werden. Daraus war zu erkennen, dass NALC hemmend sowohl auf die Entstehung als auch auf die biologische Aktivität des Isoprostaglandins wirkt.

Eine Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration, hervorgerufen durch 8-iso PGF_{2α}, war schon länger bekannt [178]. In humanen Blutplättchen konnte nach 8-iso PGF_{2α}-Stimulation ein rascher Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration beobachtet werden, der parallel mit einer Änderung der Zellgestalt der Blutplättchen verlief. Praticò et al. zeigten in ihren Untersuchungen, dass 8-iso PGF_{2α} die Freisetzung von Calcium ausschließlich aus intrazellulären Speichern bewirkte [178]. Die Zugabe von exogenem Calcium oder die Chelatisierung von Calcium im extrazellulären Raum führten zu keiner Beeinflussung des 8-iso PGF_{2α}-induzierten Effektes. Bei den eigenen Versuchen wurde ein

membranpermeabler Calciumchelator verwendet, der eine Chelatierung des intrazellulären Calciums bewirkte. Zwischen extrazellulärem und intrazellulär freigesetztem Calcium wurde nicht unterschieden.

Minuz et al. konnten nach Inkubation von Blutplättchen mit 8-iso PGF_{2α} eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in den Plättchen feststellen, wobei als Hauptquelle auch hier die intrazellulären Calciumspeicher identifiziert wurden [181]. Dieser Prozess dürfte über die Aktivierung der Phospholipase C ablaufen.

Bei der Untersuchung der 8-iso PGF_{2α} bedingten Vasokonstriktion von Blutgefäßen im Gehirn von Schweinen konnten Hou et al. einen indirekten Effekt des Isoprostaglandins auf glatte Muskelzellen feststellen [184]. Durch eine 8-iso PGF_{2α} induzierte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in Astrocyten und Endothelzellen wurde Thromboxan aus diesen Zellen sekretiert. Die eigentliche Vasokonstriktion wurde dann durch das freigesetzte Thromboxan bewirkt. Interessanterweise konnte von Hou et al. der Extrazellulärraum als Calciumquelle für die 8-iso PGF_{2α}-induzierte intrazelluläre Calciumerhöhung identifiziert werden. Möglicherweise ist die Art der Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration durch 8-iso PGF_{2α} von Zellart zu Zellart unterschiedlich. Wie aus den eigenen Versuchen zu erkennen war, schien die Wirkung des 8-iso PGF_{2α} auf das Shedding von CD163 über Calcium die größte Bedeutung von allen untersuchten Einflussfaktoren zu haben, da durch Vorinkubation mit einem Calciumchelator die 8-iso PGF_{2α}-vermittelte Wirkung über das Maß der FP-stimulierten Zellen hinaus aufgehoben werden konnte (Abb. 29). Nach Coinkubation der Zellen mit BAPTA/AM und NALC zeigte sich kaum eine Veränderung im Anteil der CD163-positiven Zellen, so dass dem Einfluss der ROS bei der Induktion des Shedding durch 8-iso PGF_{2α} eine dem Calcium untergeordnete Bedeutung zukommt.

Neben der Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration konnte für 8-iso PGF_{2α} auch eine Erhöhung der Aktivität von Matrixmetalloproteinasen (MMP) gezeigt werden [185]. In THP-1 Macrophagen konnte nach Inkubation der Zellen mit oxidiertem *low density lipoprotein* (oxLDL) und 8-iso PGF_{2α} eine Erhöhung der Expression von MMP-9 festgestellt werden. Gleichzeitig wurde auch eine verstärkte Expression des endogenen Inhibitors TIMP-1 beobachtet, jedoch überwog der Anstieg der Matrixmetalloproteinase-Aktivität. Neben einer Aktivierung der MMPs scheint 8-iso PGF_{2α} auch die Aktivierung eines oder mehrerer Vertreter der ADAMs zu induzieren, die als Sheddase für CD163 fungieren.

Auch 8-iso PGF_{2α} bewirkt ein Shedding von CD163 über die Aktivierung einer Metalloproteinase. Die dabei ablaufenden bisher unbekanntem intrazellulären Mechanismen werden, konform mit den bereits gefundenen Einflüssen, durch ROS und Calcium als Mediatoren direkt oder indirekt aktiviert. ROS und Calcium haben eine Schlüsselfunktion in der Abspaltung des CD163 von der Zelloberfläche inne, da ein Abfangen der beiden Faktoren zur Aufhebung des Shedding führte.

1.2.3 Untersuchung der Induktion des *ectodomain shedding* von CD163 durch Cyclosporin A

Cyclosporin A (CsA) ist ein immunsuppressives Basistherapeutikum, das vor allem bei schweren Entzündungen oder zur Verhinderung einer Transplantatabstoßung Anwendung findet. Oftmals wird es dabei in Kombination mit Glucocorticoiden appliziert, um die unterschiedlichen Wirkmechanismen der Substanzen auszunutzen.

Obwohl Glucocorticoide und CsA immunsuppressiv wirken, wurden gegenläufige Wirkungen der Verbindungen auf CD163 festgestellt. Diese unterschiedlichen Einflüsse auf CD163 wurden in früheren Untersuchungen von Wenzel et al. gezeigt [186]. Durch das Glucocorticoid Dexamethason wurde eine dosisabhängige Induktion der CD163-Expression auf humanen Monocyten ermittelt [32]. Im Gegensatz dazu bewirkte CsA eine massive Herabregulation des Proteins [186]. Die jeweilige Regulation war sehr spezifisch für CD163, da die parallele Untersuchung anderer Oberflächenproteine keine Änderungen der Oberflächendichte durch Einwirken der beiden Substanzen zeigte. Die Änderung der CD163-Dichte durch Inkubation von Monocyten mit CsA war vergleichbar mit der Änderung, die durch Phorbolster hervorgerufen wurde [36]. Beide Substanzen führten zu einer Abnahme der Antigendichte. Als Regulationsmechanismus des CD163 durch CsA ist ebenfalls das Shedding denkbar. Durch Betrachtung der Antigendichte auf der Zelloberfläche und der Konzentration des löslichen sCD163 in den Zellüberstandes nach CsA-Inkubation sollte untersucht werden, ob CsA ebenfalls als Induktor des Shedding von CD163 wirkt.

1.2.3.1 Bedeutung und Wirkung von Cyclosporin A

Cyclosporin A (CsA) ist ein wasserunlösliches zyklisches Undecapeptid, das erstmalig von Rüegger et al. aus dem Bodenzpilz *Tolypocladium inflatum* isoliert wurde [187] (Abb. 30). Mittlerweile ist auch eine vollsynthetische Herstellung möglich.

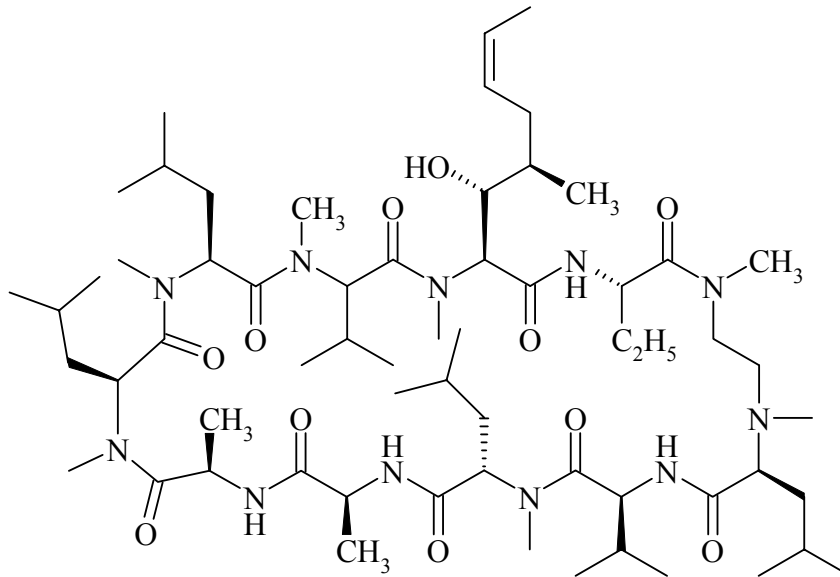


Abb. 30: Struktur des Immunsuppressivums Cyclosporin A (CsA).

CsA ist unter dem Handelsnamen Sandimmun[®] zur Behandlung von Psoriasis, Rheumatoider Arthritis, schwerer endogener Uveitis, einer entzündlichen Augenkrankheit, primärer biliärer Zirrhose, nephrotischem Syndrom und zur Prophylaxe von Transplantat-Abstoßungen nach Transplantationen indiziert [188].

CsA hemmt die Bildung von Interleukin-2 (IL-2) und anderen Cytokinen, wie IL-3, IL-4, Interferon- γ und TNF- α (Tab. 4).

IL-2 führt als Botenstoff zur Aktivierung des Immunsystems. CsA bildet intrazellulär Komplexe mit dem Immunophilin Cyclophilin [189]. Durch diese Komplexbildung wird die Aktivität von Calcineurin gehemmt, das an der Translokation des Transkriptionsfaktors NF-AT in den Nukleus beteiligt ist. Durch diese Hemmung wird die NF-AT-vermittelte Gen-Transkription verschiedener Cytokine, wie IL-2, unterbunden und so die Aktivierung antigenreaktiver T-Lymphocyten blockiert [190].

CsA zeigt in der therapeutischen Anwendung eine sehr gute Wirksamkeit. Trotzdem müssen Nutzen und Risiko einer Behandlung mit CsA genau abgewogen werden, da es nephrotoxische Nebenwirkungen aufweist. Weitere Nebenwirkungen des CsA sind die Ausbildung einer Hypertonie, Magen-Darm-Probleme, eine neurotoxische Wirkung mit

Tremor und Kopfschmerz, eine reversible Lebertoxizität, Gingivahyperplasie sowie Hyperglykämie und Hypercholesterinämie [188]. Neben der Hauptwirkung auf die T-Zellen sind für CsA auch immunologische Funktionen, wie Unterdrückung der Produktion von Immunglobulin G oder Reduktion der Freisetzung von Cytokinen, auf B-Lymphocyten, Macrophagen und dendritische Zellen bekannt [191-194].

Tab. 4: Immunsuppressiva und ihre Wirkungsweisen (modifiziert nach Taylor et al. [189]).

Immunsuppressivum	Wirkungsweise
Corticosteroide	Antiinflammation
Azathioprin, Mofetil	Hemmung der DNA-Synthese
Cyclosporin A, Tacrolimus	Hemmung der IL-2-Synthese
Sirolimus, Everolimus	Hemmung der IL-2-Signaltransduktion
	Rezeptorblockade/ cytotoxische Antikörper:
ALG (<i>antilymphocyte globulin</i>), ATG (<i>antithymocyte globulin</i>), ALS (<i>antilymphocyte serum</i>)	polyklonale Antikörper
Muromonab-CD3, Basiliximab, Daclizumab	monoklonale Antikörper

1.2.3.2 Induktion des Shedding von CD163 durch Cyclosporin A

Humane Monocyten, die nach FP-Stimulation eine maximale Menge CD163 auf der Oberfläche exprimiert hatten, wurden zwei Stunden mit CsA inkubiert und anschließend im Vergleich zu Kontrollzellen, die mit einem unspezifischen Isotyp-Kontroll-Antikörper markiert waren, und FP-stimulierten Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 31).

Das Signal hatte auf Grund seiner niedrigen Intensität sogar mehr Ähnlichkeit mit der Intensität der Kontrollzellen (Abb. 31, gepunktete Linie) als mit den durch FP-Stimulation maximal CD163 auf der Oberfläche tragenden Zellen (Abb. 31, grau unterlegt). Die bereits beschriebene Abnahme der Antigendichte CD163-positiver Zellen nach CsA-Inkubation von humanen Monocyten konnte folglich bestätigt werden.

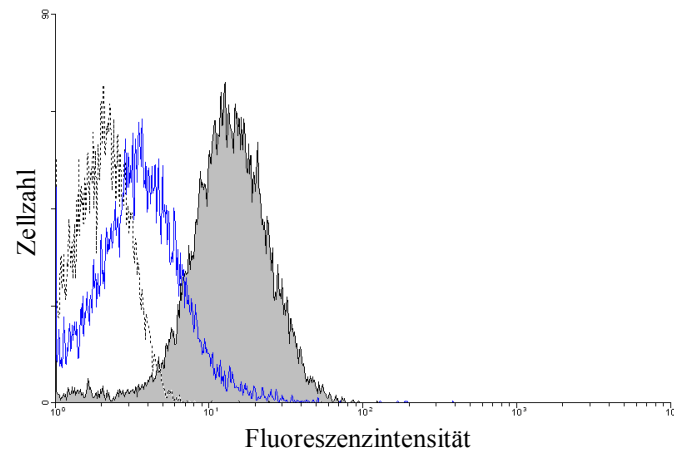


Abb. 31: Durchflusszytometrische Analyse humaner Monocyten nach Inkubation mit Cyclosporin A (CsA). Dargestellt sind Kontrollzellen (gepunktete Linie) im Vergleich zu Zellen, die maximal CD163 auf der Oberfläche exprimiert haben (grau unterlegt) und Zellen nach CsA-Inkubation (blaue Linie). Abgebildet ist ein repräsentatives Histogramm, bei dem die Fluoreszenzintensität logarithmisch gegen die Zellzahl aufgetragen ist.

CsA führte zu einer deutlichen Abnahme der CD163-Dichte von der Monocytenoberfläche (Abb. 32 Zelloberfläche). Im direkten Vergleich dieser Zellen mit maximal stimulierten, aber nicht mit CsA inkubierten Zellen betrug der Anteil CD163-positiver Zellen nach zusätzlicher CsA-Stimulation $39,5 \pm 12,2$ % (Abb. 32 Zelloberfläche, CsA). Der maximal exprimierte Anteil an CD163 nach Glucocorticoidstimulation wurde auf 100 % CD163-positive Zellen gesetzt (Abb. 32 Zelloberfläche, FP).

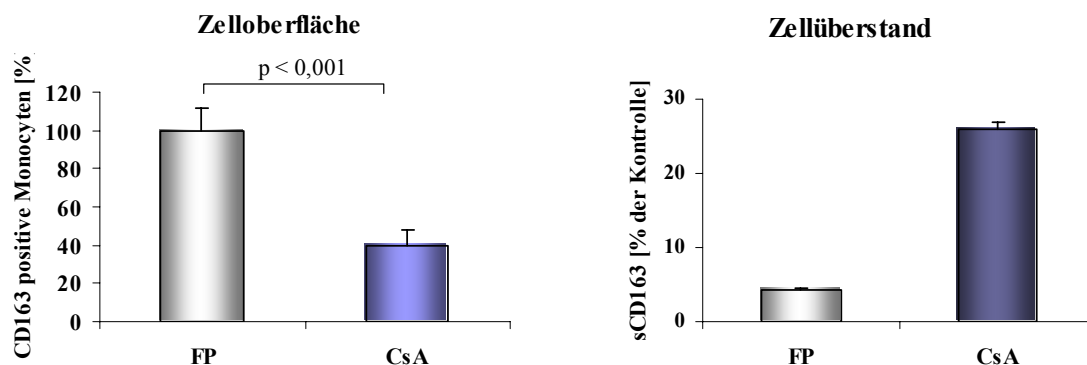


Abb. 32: Shedding von CD163, induziert durch Cyclosporin A (CsA). **Zelloberfläche:** Prozentuale Darstellung der Antigendichte auf der Zelloberfläche bei maximal CD163-positiven Zellen (FP) und nach Inkubation mit CsA. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von Sechsfachmessungen. Statistische Signifikanz: $p < 0,05$ (ANOVA, Tukey's Test). **Zellüberstand:** Darstellung der Konzentration von sCD163 im Zellüberstand von je $1 \cdot 10^6$ vitaler Zellen nach FP-Stimulation und CsA-Inkubation im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Mittlere Abweichung vom Mittelwert (MA) von Dreifachbestimmungen.

Die von Högger et al. ermittelte Änderung der Antigendichte war sogar noch stärker ausgeprägt [36], jedoch wurden die Monocyten in diesen Versuchen insgesamt 16 Stunden mit CsA inkubiert, während die Inkubationszeit in den eigenen Versuchen nur zwei Stunden

betrug. Möglicherweise könnte die Änderung der Antigendichte durch die verlängerte Reaktionszeit des Reagenzes mit den Zellen noch gesteigert werden.

Zur Untersuchung, ob die Änderungen der CD163-Dichte auf der Zelloberfläche tatsächlich auf der Abspaltung des CD163 und nicht auf einer Internalisierung des Proteins beruhte, wurde mittels ELISA wiederum die Konzentration an sCD163 in den Zellüberständen bestimmt (Abb. 32 Zellüberstand). Die Analyse des Überstandes von $1 \cdot 10^6$ Zellen ergab für die CsA-inkubierten Zellen eine signifikant höhere Konzentration an sCD163 im Vergleich zu den FP-stimulierten Zellen. Als Bezugswert für die Konzentrationen an sCD163 dienten die Konzentrationen in den Zellüberständen unstimulierter Zellen (Kontrolle).

Mit $26,0 \pm 1,1$ % sCD163 wurde im Zellüberstand der mit CsA inkubierten Zellen eine um den Faktor 6 höhere Konzentration an sCD163 gefunden als bei dem ausschließlich mit FP-stimulierten ($4,3 \pm 0,3$ %). Die Abnahme des CD163 von der Zelloberfläche war folglich auf eine Abspaltung zurückzuführen.

Damit konnte gezeigt werden, dass CsA zu einer ausgeprägten Abspaltung von CD163 von der Monocytenoberfläche führt und damit in hohem Maße fähig ist, das antiinflammatorische Protein sCD163 zu bilden. Durch diesen Effekt ergab sich für das Immunsuppressivum CsA ein neuer antiinflammatorischer Wirkmechanismus, der die bereits bekannte Wirkung auf humane T-Lymphocyten unterstützt. sCD163 inhibiert über einen bisher unbekanntem Mechanismus die Proliferation von aktivierten T-Lymphocyten [74]. Außerdem konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung der Expression von MMP-9, einer vor allem unter entzündlichen Bedingungen von T-Lymphocyten gebildeten Matrixmetalloproteinase, durch sCD163 nachgewiesen werden [75]. Eine verstärkte Bildung des sCD163 und die gleichzeitige Eigenwirkung des CsA könnten folglich synergistisch auf die Unterdrückung einer entzündlichen Reaktion wirken.

Auf der Basis dieser neuen Wirkung des CsA bekommt auch die Kombinationstherapie aus Glucocorticoiden und CsA eine zusätzliche Bedeutung. Hauptansatzpunkt dieser Therapie waren bisher die unterschiedlichen immunsuppressiven Wirkungen dieser Substanzen, die durch die kombinierte Therapie ausgenutzt werden sollten. Für die Generierung des antientzündlich wirkenden sCD163 ergibt sich, dass die für die Induktion der Expression und der Abspaltung erforderlichen Verbindungen zusammen vorliegen. Glucocorticoide sind in der Lage, die Expression des CD163 auf der Zelloberfläche zu stimulieren. Zusätzlich ist jedoch eine weitere Verbindung erforderlich, die zur Abspaltung des CD163 und damit zur

Bildung des löslichen sCD163 führt. Im Körper stehen dafür, wie aus den vorherigen Untersuchungen zum Shedding von CD163 gezeigt werden konnte, mehrere endogene Stoffe, wie zum Beispiel ROS oder 8-iso PGF_{2α}, zur Verfügung. Durch die gleichzeitige Gabe eines exogenen Aktivators des CD163-Shedding wie CsA könnte dieser Prozess im Körper möglicherweise schneller und damit effektiver ablaufen.

1.2.3.3 Hemmung des Cyclosporin A-induzierten Shedding von CD163

In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch CsA in der Lage ist, die Bildung von ROS zu induzieren [195, 196]. Diese ROS-Bildung wird auch als Auslöser für viele toxischen Nebenwirkungen des CsA, wie die Ausbildung einer starken Hypertension, angenommen [197]. Eine weitere Ursache für die hypertensiven Nebenwirkungen ist eine CsA-induzierte calciumvermittelte Vasopression.

Da ROS und Calcium eine Rolle bei der Ausprägung der unerwünschten Nebenwirkungen des CsA spielen, sollte untersucht werden, ob ROS und/oder Calcium an der CsA-induzierten Freisetzung von CD163 von der Monocytenoberfläche beteiligt sind. Mittels Inhibierung der potentiellen Mediatoren sollte untersucht werden, welche dieser Mediatoren für das CsA-induzierte Shedding von CD163 eine Rolle spielten. Außerdem sollte festgestellt werden, ob ebenso wie bei ROS- und isoprostaglandininduziertem Shedding von CD163 eine Metalloproteinase an dem Prozess beteiligt ist.

Zur Untersuchung der Beteiligung von ROS wurde wieder der Radikalfänger NALC, der Calciumchelator BAPTA/AM zur Komplexierung intrazellulärer Calciumionen und der TACE-Inhibitor TAPI-1 zur Untersuchung der Beteiligung von Metalloproteinasen am CsA-induzierten Shedding von CD163 eingesetzt.

Die Analyse der Inhibitorwirkung erfolgte mittels Durchflusszytometrie analog der in den vorherigen Kapiteln dargestellten Vorgehensweise (Allgemeiner Teil, 1.2.1.4.1). Über die Fluoreszenzintensität des mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpers konnte festgestellt werden, dass von den eingesetzten Inhibitoren vor allem BAPTA/AM allein oder in Kombination mit dem Radikalfänger NALC das CsA-induzierte Shedding von CD163 unterbinden konnte (Abb. 33).

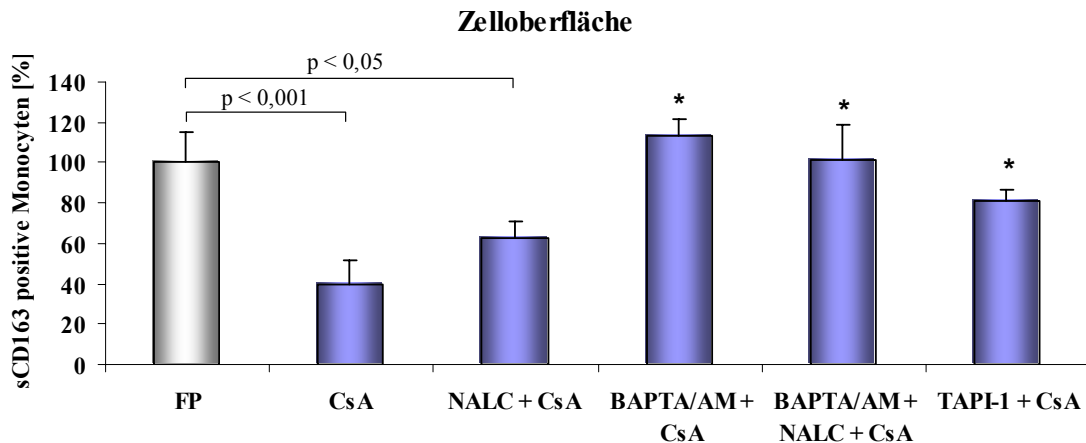


Abb. 33: Hemmung des Cyclosporin A-induzierten Shedding von CD163 von der Oberfläche humaner Monocyten. Im Vergleich zur Inkubation mit 8-iso PGF_{2α} konnte die Vorinkubation der Monocyten mit N-Acetylcystein (NALC), einem TACE-Inhibitor (TAPI-1), einem Calciumchelator (BAPTA/AM) oder einer Kombination aus BAPTA/AM und NALC die Abnahme der Antigendichte reduzieren. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen von Sechsfachbestimmungen. Statistische Signifikanz: p < 0,05, statistisch nicht signifikant verschieden von FP: p > 0,05 (*) (ANOVA, Tukey's Test).

Mit BAPTA/AM oder BAPTA/AM in Kombination mit NALC vorstimulierte Zellen wiesen nach CsA-Inkubation einen Anteil an CD163-positiven Monocyten von $112,9 \pm 8,7 \%$, respektive $101,0 \pm 18,1 \%$, auf. Der Metalloproteinaseinhibitor TAPI-1 zeigte ebenfalls eine ausgeprägte Hemmwirkung auf die CsA-vermittelte Abspaltung von CD163. Mit einem Prozentsatz von $80,7 \pm 6,1 \%$ lag der Anteil positiver Zellen zwar unter denen mit maximaler CD163-Expression (FP, $100,0 \pm 15,0 \%$), der Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$) (Abb. 33).

Der am wenigsten potente Inhibitor in diesem Versuch war der Radikalfänger NALC. Es ist bekannt, dass CsA in der Lage ist, ROS zu erzeugen [195, 196]. Nach Vorbehandlung der Monocyten mit NALC führte die Inkubation mit CsA immer noch zu einer signifikanten Verminderung der CD163-positiven Zellen ($62,9 \pm 8,5 \%$). Möglicherweise spielte die Generierung von ROS beim CsA-induzierten Shedding nur eine untergeordnete Rolle oder die Kapazität des NALC, die generierten ROS abzufangen, war erschöpft.

An dem Shedding von CD163, induziert durch Cyclosporin A, schien ein calciumvermittelter Signalweg beteiligt zu sein. Durch den membranpermeablen Calciumchelator BAPTA/AM wurde Calcium intrazellulär komplexiert und stand damit für eine weitere Funktion als *second messenger* nicht mehr zur Verfügung.

Eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration wurde von Lo Russo et al. für die Ausbildung hypertoner Nebenwirkungen einer durch CsA-Therapie induzierten lokalen Vasokonstriktion nachgewiesen [198]. Dieser toxischen Nebenwirkung von CsA wird

therapeutisch entgegenzuwirken versucht [199]. An erster Stelle dieser Begleitmedikamente stehen Calciumkanalblocker wie Nifedipin.

Ähnliche potenzierende Effekte nach Applikation von CsA auf calciumvermittelte Wirkungen und eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration wurden in Versuchen an Muskelzellen von Ratten festgestellt [200]. CsA übte dabei seine Wirkungen über eine verstärkte Expression der Hormonrezeptoren für Vasopression, Serotonin, Endothelin-1 oder Angiotensin II aus [198]. Ebenfalls eine leichte Erhöhung der Calciumkonzentration durch CsA selbst konnte von Frapier et al. ermittelt werden [201]. In humanen Arterienzellen konnte nach einer 24-stündigen CsA-Inkubation ein leichter Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration beobachtet werden. Eingesetzt wurden in diesen Versuchen therapeutische CsA-Konzentrationen von 100 nM bis 10 µM. Die am stärksten ausgeprägten Effekte wurden dabei für die höchste Konzentration von 10 µM beobachtet. In den eigenen Versuchen wurde CsA in einer Konzentration von 200 nM eingesetzt, die im unteren Bereich der von Frapier et al. analysierten Konzentrationen lag. Bisher wurden keine Untersuchungen bezüglich einer Dosis-Wirkungs-Beziehung des Calciums auf die Induktion des Shedding von CD163 durchgeführt, so dass zum Erreichen der beschriebenen Freisetzung des sCD163 bereits die eingesetzte CsA-Konzentration von 200 nM ausgereicht haben dürfte. Von Frapier et al. konnte zudem gezeigt werden, dass eine Steigerung der CsA-Wirkung auf die intrazelluläre Calciumkonzentration durch Vorinkubation der Zellen mit vasokonstriktiv wirkenden Hormonen erzielt werden konnte. Die CsA-induzierte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration allein konnte in diesen Versuchen keine Änderung des basalen Tonus der Arterien bewirken und damit zu einer erhöhten Vasokonstriktion führen [201]. In Kombination mit Hormonen, wie Endothelin und Vasopressin, könnte dies jedoch zu einer Verstärkung des humoralen Effektes führen.

Der stimulierende Effekt des CsA auf die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und die damit verbundene denkbare Freisetzung des antiinflammatorischen sCD163 zeigt neben den toxischen Nebenwirkungen auch einen möglichen positiven Einfluss des CsA auf Körperzellen auf.

Im Gegensatz zur ausgeprägten Hemmung der CsA-induzierten Abspaltung durch BAPTA/AM wurde das Shedding von CD163 durch den Radikalfänger NALC nur geringfügig gehemmt. Somit war NALC in der eingesetzten Konzentration von 1 mM nicht ausreichend, um das Shedding zu inhibieren. NALC in Kombination mit BAPTA/AM führte zu einer Reduktion der Abspaltung auf die Ausgangsmenge CD163-positiver Zellen. Dieser

Effekt ist aber wahrscheinlich ausschließlich auf die Wirkung des Calciumchelators zurückzuführen, der allein eingesetzt bereits eine ähnliche Wirkung zeigt.

Die Bildung von ROS, induziert durch CsA, führte meist zu toxischen Effekten mit Apoptose der Zellen. Andrés et al. konnten an Hepatocyten von Ratten zeigen, dass die ROS-abhängigen cytotoxischen Effekte des CsA auf Grund eines überforderten antioxidativen Verteidigungssystems auftraten und schließlich auch zu einer Abnahme der Membranintegrität führten [202]. Dieses Verteidigungssystem war bei jungen Ratten viel stärker ausgebildet als in älteren Ratten. Monocyten verfügen bekanntlich über ein stark ausgeprägtes Verteidigungssystem, das einer übermäßigen ROS-Entstehung durch das Abfangen der Radikale entgegenwirken kann. Möglicherweise ist dieses zelleigene System allein und auch in Kombination mit dem exogenen Radikalfänger NALC nicht in der Lage, die CsA-induzierten ROS abzufangen und damit deren abspaltende Wirkung auf CD163 zu unterbinden.

Die starke Abhängigkeit der Wirkung der CsA-vermittelten ROS-Bildung vom zelleigenen antioxidativen Abwehrsystem konnte auch von López-Ongil et al. gezeigt werden [203]. Bovine Endothelzellen aus der Aorta produzierten CsA-induzierte ROS sowohl dosis- als auch zeitabhängig. Die verstärkte Bildung konnte auf die Induktion der endothelialen *Nitric oxide synthase* (eNOS) durch CsA zurückgeführt werden. Signifikante ROS-Konzentrationen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen konnten in diesen Versuchen ab einer Konzentration von 10 nM nach einer Inkubationszeit der Zellen mit CsA von vier Stunden beobachtet werden. In den eigenen Versuchen wurde eine CsA-Konzentration von 200 nM eingesetzt. Nach López-Ongil et al. liegt diese Konzentration in einem Bereich, der intrazellulär zu einer signifikanten Generierung von ROS führt. Da eine geringfügige Hemmung des CsA-induzierten Shedding von CD163 durch NALC zu erkennen war (Abb. 33), ist anzunehmen, dass die antioxidative Kapazität des NALC in diesen Monocyten überschritten war.

Durch TAPI-1 konnte die CsA-induzierte Abspaltung des CD163 fast vollständig gehemmt werden. Das CsA-vermittelte Shedding führt folglich zur Aktivierung einer TAPI-I-sensitiven Metalloproteinase.

In Untersuchungen einer der Nebenwirkungen der CsA-Therapie, der Gingivahyperplasie, konnte gezeigt werden, dass CsA eher zu einer Hemmung der Produktion und Aktivität verschiedener Matrixmetalloproteinasen (MMPs) beiträgt [204]. Die Inkubationsdauer in diesen Versuchen betrug 72 Stunden, so dass die CsA-Wirkung

wahrscheinlich auf einer verminderten Expression der Enzyme zurückzuführen ist. Da die Inkubationszeit in den eigenen Versuchen nur zwei Stunden betrug, sind Wirkungen auf Proteinebene jedoch für die dargestellten Effekte auszuschliessen.

Mit der Identifizierung des CsA als exogenen Aktivator des Shedding von CD163 konnte aus der Gruppe der therapeutisch eingesetzten Immunsuppressiva eine Verbindung gefunden werden, zu deren bekannter Wirkung die Bildung eines antiinflammatorischen Faktors hinzukommt. Für die Generierung des sCD163 *in vitro* konnte eine Aktivierung aufgezeigt werden, die wahrscheinlich über die Generierung von ROS und Calcium als Botenstoff verläuft. Die eingesetzte Konzentration an CsA lag in einem therapeutischen Bereich, so dass die dargestellten Prozesse auch *in vivo* unter einer Behandlung mit dem Immunsuppressivum denkbar sind. Für Calcium als Vermittler toxischer Nebenwirkungen unter einer CsA-Therapie konnte gleichzeitig auch eine wichtige Funktion in der antiinflammatorischen Wirkung des CsA vorgeschlagen werden.

1.2.4 Untersuchung des Shedding von CD163 durch die Kombination der sheddinginduzierenden Verbindungen

Die untersuchten sheddinginduzierenden Verbindungen scheinen über ähnliche, möglicherweise miteinander verknüpfte Mechanismen das Shedding von CD163 einzuleiten. Sowohl für die Aktivierung der Abspaltung durch H_2O_2 als auch durch 8-iso $PGF_{2\alpha}$ und CsA scheint ein calciumabhängiger Mechanismus von großer Bedeutung zu sein. Ebenso spielen ROS eine wichtige Rolle, wie am ausgeprägten Shedding von CD163 durch H_2O_2 , NO und 8-iso $PGF_{2\alpha}$ zu ersehen war, das nahezu vollständig durch einen Radikalfänger aufgehoben werden konnte. Am Ende jeder Induktion steht die Aktivierung einer oder mehrerer Metalloproteinasen, die durch den Metalloproteaseinhibitor wieder gehemmt werden konnte. Der Einsatz einer Inhibitorkombination aus BAPTA/AM und NALC führte bei einigen Induktoren des Shedding zu einer stärkeren Hemmung der Abspaltung als beim Einsatz einer der beiden Verbindungen allein. Möglicherweise liegt ein Synergismus aus calcium- und ROS-vermitteltem Shedding vor.

Durch Kombination der bisher untersuchten sheddinginduzierenden Reagenzien H_2O_2 , NO (SNAP), 8-iso $PGF_{2\alpha}$ und CsA sollte untersucht werden, ob die Verbindungen gemeinsam zu additiven Effekten führen. Hierzu wurden isolierte CD163-positive Monocyten jeweils mit einem sheddinginduzierenden Reagenz einzeln und mit einer Kombination aus

jeweils zwei der Reagenzien inkubiert. Im Anschluss wurde die Wirkung über den Anteil CD163-positiver Monocyten bestimmt (Abb. 34).

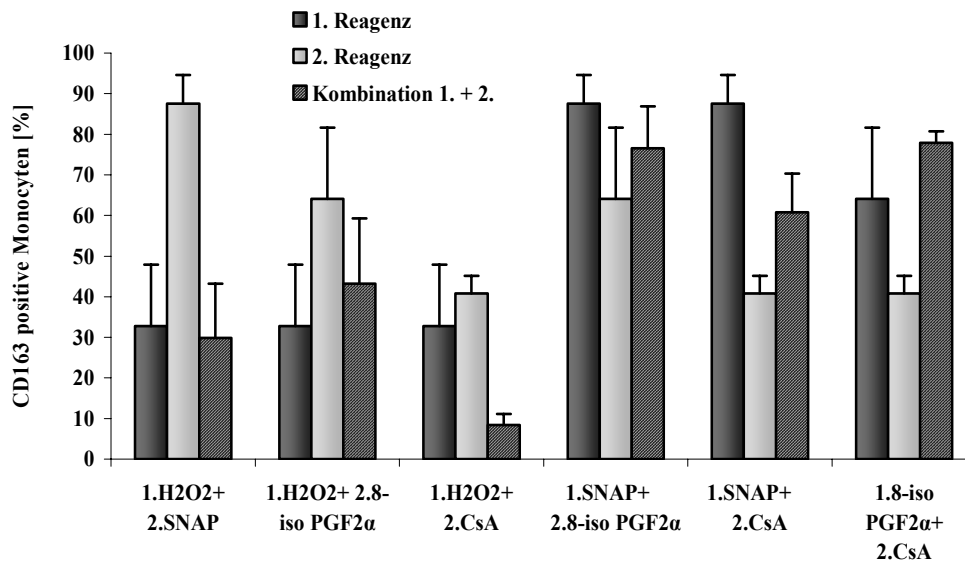


Abb. 34: Shedding von CD163, induziert durch Kombinationen von sheddinginduzierenden Reagenzien. Dargestellt ist jeweils der Anteil CD163-positiver Zellen nach Behandlung mit jeweils einem sheddinginduzierenden Reagenz (1. Reagenz, dunkelblau bzw. 2. Reagenz, hellblau) und nach Inkubation mit einer Kombination der beiden Reagenzien (Kombination 1. und 2., dunkelblau-hellblau-gestreift). Wiedergegeben sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von Sechsfachmessungen.

Allgemein hatten die unterschiedlichen Kombinationen der Reagenzien auch unterschiedlichen Anteil an der Gesamtwirkung. Die gemeinsame Inkubation mit den Sauerstoffspezies H_2O_2 und NO ($29,9 \pm 13,4$ %) zeigte einen ähnlichen Effekt wie die Inkubation mit H_2O_2 allein ($32,8 \pm 15,1$ %). NO allein verursachte, wie auch bereits in den Versuchen zur Induktion des Shedding von CD163 dargestellt (Allgemeiner Teil, 1.2.1.5.1), nur ein leichtes Shedding von CD163 ($87,5 \pm 7,1$ %). Bei der Kombination dominierte der durch H_2O_2 ausgeübte Effekt, der die schwach absplattende Wirkung des NO überdeckte.

Im Gegensatz dazu führte die Kombination von H_2O_2 und 8-iso $PGF_{2\alpha}$ zu einer abgeschwächten Wirkung des Shedding von CD163. Sowohl H_2O_2 als auch 8-iso $PGF_{2\alpha}$ allein führten zu einem signifikanten Shedding von CD163, wobei H_2O_2 sich als die effektivere Substanz in diesem Prozess erwies. Für das 8-iso $PGF_{2\alpha}$ wurde vermutet, dass es ebenfalls über ROS seine absplattende Wirkung entfaltet, da das 8-iso $PGF_{2\alpha}$ -induzierte Shedding durch den Radikalfänger NALC nahezu vollständig aufgehoben werden konnte. Auch für Calcium konnte eine induktive Beteiligung am Shedding von CD163 nachgewiesen werden. Durch die intrazelluläre Komplexierung konnte die calciuminduzierte Absplattung

von CD163 vollkommen unterbunden werden (Allgemeiner Teil, 1.2.2.4). Diese beiden Wege scheinen sich gegenseitig negativ zu beeinflussen, obgleich sowohl ROS eine Erhöhung der Calciumkonzentration bewirken als auch Calcium zur Entstehung von ROS im Körper beiträgt [143, 147]. So wurde durch die gemeinsame Inkubation der CD163-positiven Zellen mit H_2O_2 und 8-iso $PGF_{2\alpha}$ ein Shedding von CD163 von circa 57 % erreicht, während durch H_2O_2 allein ungefähr 67 % des Proteins von der Zelloberfläche abgespalten wurde. Eine Erklärung hierfür liegt möglicherweise in der Herkunft des Calciums. Das für den Effekt des 8-iso $PGF_{2\alpha}$ verantwortliche Calcium wird aus intrazellulären Calciumspeichern freigesetzt, während extrazelluläre Calciumquellen keine Bedeutung haben. Möglicherweise kommt es bei der Mobilisierung des Calciums aus den intrazellulären Speichern bei gleichzeitigem Einfluss von H_2O_2 auf die Zellen zu einer gegenseitigen Beeinflussung mit der Folge einer verminderten H_2O_2 -Wirkung.

Für die Kombination von NO und 8-iso $PGF_{2\alpha}$ konnte festgestellt werden, dass sich die Verbindungen gegenseitig bei dem Shedding kaum beeinflussen. Nach separater Inkubation der Monocyten mit den Verbindungen war 8-iso $PGF_{2\alpha}$ das stärker abspaltend wirkende Reagenz. Der Anteil CD163-positiver Monocyten nach Isoprostaglandinbehandlung betrug $64,1 \pm 17,6$ %. Nach Coinkubation mit NO wurde ein Restanteil von $76,6 \pm 10,3$ % CD163-positiver Monocyten detektiert, der sich nicht signifikant von dem nach 8-iso $PGF_{2\alpha}$ -Inkubation unterschied. Die Kombination von ROS und 8-iso $PGF_{2\alpha}$ resultierte folglich nicht in einer Suppression der ausgeprägten abspaltenden Wirkung der ROS wie bei der Inkubation mit H_2O_2 /8-iso $PGF_{2\alpha}$. Die Wirkung des effizienter die Abspaltung von CD163 aktivierenden Reagenzes 8-iso $PGF_{2\alpha}$ wurde durch NO nicht beeinflusst.

Ein additiver Effekt der Wirkung auf das Shedding von CD163 konnte für die Kombination von H_2O_2 und CsA festgestellt werden. Die beiden Reagenzien separat erwiesen sich als potente Stimulanzen des Shedding von CD163. Nach einer gemeinsamen Inkubation CD163-positiver Monocyten konnte der Freisetzungseffekt auf CD163 mehr als vervierfacht werden. H_2O_2 und CsA allein bewirkten bereits eine Abspaltung des CD163 von der Zelloberfläche von mehr als 50 %, in Kombination wurde nahezu das gesamte membranständige CD163 freigesetzt. Der Anteil CD163-positiver Zellen betrug nur noch $8,4 \pm 2,8$ %. Damit zeigten H_2O_2 und CsA eine sich gegenseitig ergänzende Wirkung bei der Abspaltung von CD163 und konnten *in vitro* sowohl allein als auch in Kombination zur Ausbildung eines antiinflammatorischen Effektes beitragen.

Chen et al. untersuchten ebenfalls die Wirkung des CsA allein und in Kombination mit H₂O₂ [196]. In diesen Untersuchungen wurde die Wirkung von CsA auf den cytotoxischen Effekt von ROS an einer embryonalen Herzzelllinie bei Ratten getestet. Eine Inkubation der Zellen mit CsA allein führte zwar zu einem Anstieg der ROS-Konzentration in den Zellen, eine apoptotische Wirkung konnte erst ab einer CsA-Konzentration von 10 µM festgestellt werden. Die Kombination von CsA und H₂O₂ dagegen führte sehr viel schneller zur Zelloptose. Der Einsatz von CsA hatte einen Anstieg des oxidativen Stresses in den Zellen zur Folge, der jedoch erst bei sehr hohen Konzentrationen oder in Addition mit weiteren ROS zu einem cytotoxischen Effekt führte. In den eigenen Versuchen erwiesen sich beide Substanzen als starke Induktoren des Shedding von CD163, deren Wirkung sich in Kombination noch verstärkte. Eine erhöhte Absterberate der Zellen wurde weder durch den Zusatz von CsA und H₂O₂ allein noch durch die Kombination der beiden Reagenzien beobachtet.

Diese verstärkte Wirkung von CsA mit einem Vertreter der ROS blieb in den hier durchgeführten Versuchen auf das H₂O₂ beschränkt. Die Kombination von CsA mit NO dagegen ergab keine Steigerung des absplattenden Effektes. Im Gegenteil wurde der auffällige positive Einfluss des CsA auf das Shedding von CD163 durch den NO-Zusatz vermindert. Der Anteil CD163-positiver Zellen nach Inkubation mit der Kombination aus den beiden Reagenzien betrug im Vergleich zu den ausschließlich mit CsA behandelten Zellen $60,8 \pm 9,6$ %. Möglicherweise werden durch NO weitere intrazelluläre Mechanismen aktiviert oder inhibiert, die zu dieser gegenseitigen Hemmung führten.

Der prominenteste Effekt einer gegenseitigen Hemmung in der Wirkung auf das Shedding von CD163 konnte durch die Kombination von 8-iso PGF_{2α} mit CsA bewirkt werden. Die deutliche Abspaltung des CD163 von der Zelloberfläche durch die beiden Einzelkomponenten konnte durch gleichzeitige Inkubation der Zellen mit beiden Substanzen nahezu vollständig revidiert werden ($77,9 \pm 2,8$ % CD163-positive Monocyten). 8-iso PGF_{2α} und CsA zeigten in den Hemmversuchen durch die vollständige Inhibierung mit dem Calciumchelator BAPTA/AM, dass Calcium an dem Shedding von CD163 induziert durch diese Substanzen beteiligt ist.

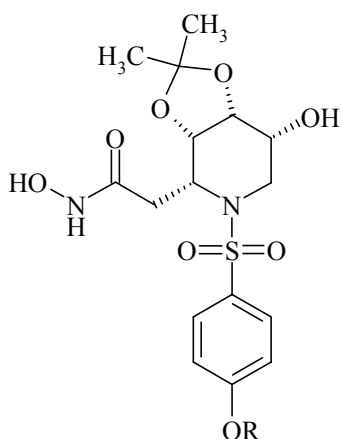
Für CsA ist bekannt, dass es über die Blockade der so genannten *permeability transition pore* (PTP) die Aufnahme von Calcium in die Mitochondrien vermindert [205]. Montero et al. konnten zeigen, dass weitere intrazelluläre Mechanismen existieren, die vor allem einen Austausch von Calcium zwischen Mitochondrien und Cytosol ermöglichen [206].

Möglicherweise beeinträchtigen sich die Mechanismen gegenseitig, die zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führen. Separat aktiviert führen sie zu einem ausgeprägten Shedding von CD163, eine gemeinsame Aktivierung jedoch führt zur gegenseitigen Hemmung.

Die Untersuchungsergebnisse führen zu der Annahme, dass trotz der zentralen Bedeutung von ROS und Calcium für das Shedding von CD163 unterschiedliche Signaltransduktionswege in den Abspaltungsmechanismus involviert sind. Diese Signalwege überschneiden sich möglicherweise und führen letztendlich zur Aktivierung der für das Shedding verantwortlichen Sheddase. Welche Signalwege involviert sind, bleibt noch aufzuklären.

1.3 Untersuchung der inhibitorischen Wirkung neu entwickelter Hydroxamsäure-Derivate auf H₂O₂-induziertes Shedding von CD163

Am Pharmazeutischen Institut der Universität Würzburg wurde eine Reihe von Verbindungen synthetisiert, deren Grundgerüst eine Azazucker 2-Hydroxamsäure ist (Abb. 35).



Verbindung	R
1a	Benzyl
1b	2-Methyl-benzyl
1c	4-Br-benzyl
1d	4-Nitro-benzyl
1e	3-Cl-benzyl
1f	H
1g	Methyl

Abb. 35: Struktur der von der 2-Hydroxamsäure abgeleiteten Verbindungen 1a - 1g.

Ziel dieser Synthesen war die Herstellung von neuen Verbindungen, die zu einer Inhibierung der Metalloproteinase *Tumor necrosis factor- α converting enzyme* (TACE) führen.

Es ist bekannt, dass metalloproteinaseinduziertes Shedding von Oberflächenproteinen durch Verbindungen auf der Basis der Hydroxamsäure hemmbar sind [92]. Sowohl von Hintz et al. [76] als auch in den eigenen Versuchen zur Inhibierung des Shedding von CD163 (Allgemeiner Teil, 1.2.1.4.3, 1.2.1.5.2, 1.2.2.4, 1.2.3.3) konnte gezeigt werden, dass die CD163-Abspaltung von der Monocytenoberfläche nach Vorinkubation der Zellen mit dem Hydroxamsäure-Derivat TAPI hemmbar ist.

Basierend auf diesen Beobachtungen bot sich die Möglichkeit, dem TAPI strukturell ähnliche Verbindungen auf ihre Fähigkeit zu untersuchen, das Shedding von CD163 zu inhibieren. Da Shedding von CD163 neben der Inhibierung durch einen Metalloproteinaseinhibitor auch durch andere Verbindungen gehemmt werden kann (Allgemeiner Teil, 1.2.1.4.3, 1.2.1.5.2, 1.2.2.4, 1.2.3.3) handelt es sich bei dieser Methode in Bezug auf das durch die untersuchten Verbindungen inhibierte Enzym um ein eher unspezifisches Verfahren. Shedding von CD163 erfolgt unter Beteiligung einer oder mehrerer TIMP-3-sensitiver Metalloproteinasen, deren Identität noch nicht bestimmt werden konnte, die wahrscheinlich jedoch eine Verwandtschaft zu TACE aufweisen. Der Vorteil ist ein

schnelles und, im Vergleich zu der üblichen Methoden der quantitativen Bestimmung von durch TACE freigesetztem TNF- α im Zellüberstand mittels ELISA, kostengünstiges Screening neuer Substanzen, deren Spezifität in Bezug auf die beteiligte Metalloproteinase bei einer erfolgreichen Inhibierung des CD163-Shedding in Folgeuntersuchungen bestätigt werden sollte.

Für die Untersuchungen der Hemmung der CD163-Abspaltung durch die Substanzen 1a – 1g (Abb. 35) wurden gepoolte Monocyten verschiedener Spender mit Fluticasonpropionat zur CD163-Expression angeregt. Anschließend wurden die Zellen in Anlehnung an die bisher durchgeführten Hemmversuche mit oder ohne einen der Inhibitoren für 30 Minuten vorinkubiert. Zur Kontrolle der ausgeübten Hemmwirkung durch die neuen Verbindungen wurde der als potenter Inhibitor ermittelte Metalloproteinaseinhibitor TAPI-1 untersucht. Um die eingesetzten Verbindungen direkt miteinander vergleichen zu können, wurden alle Substanzen in einer Konzentration von 1 μ M eingesetzt. Als Shedding induzierendes Reagenz wurde H₂O₂ gewählt. Die Bestimmung des Einflusses der neuen Verbindungen auf das H₂O₂-induzierte Shedding erfolgte mittels durchflusszytometrischer Analyse, wobei der CD163-Anteil auf der Zelloberfläche gemessen wurde (Abb. 36). Zur Kontrolle, ob die eingesetzten Verbindungen selber eine Wirkung auf das Shedding von CD163 ausüben, wurden CD163-positive Zellen mit dem jeweiligen Inhibitor ohne anschließende Zellstimulation mit H₂O₂ vermessen.

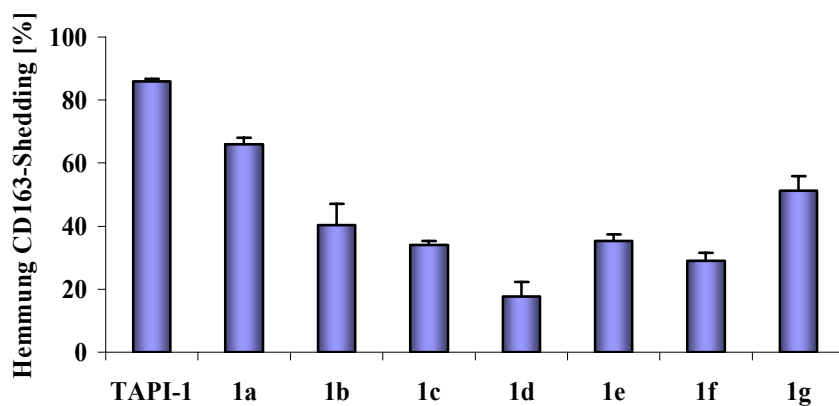


Abb. 36: Hemmwirkung des Metalloproteinaseinhibitors TAPI-1 und der neuen Hydroxamsäure-Derivate 1a – 1g [%] auf das H₂O₂-induzierte Shedding von CD163. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) von Sechsfachmessungen. Die Ergebnisse repräsentieren jeweils die Anteile CD163-positiver Zellen nach H₂O₂-Behandlung bezogen auf das durch H₂O₂ maximal induzierte Shedding von CD163 (keine Hemmung).

Die Auswertung der Wirkung der sieben Hydroxamsäure-Derivate ergab, dass alle Verbindungen unterschiedliche Hemmwirkungen auf das H₂O₂-induzierte Shedding entfalteten.

TAPI-1 wies mit $85,9 \pm 0,8$ % die größte Hemmwirkung auf das H₂O₂-induzierte Shedding von CD163 auf. Die stärksten Hemmungen der getesteten Substanzen zeigten die Verbindungen 1a und 1g mit einer Wirkung von $66,1 \pm 2,1$ %, respektive $51,2 \pm 4,6$ %. Durch die Vorinkubation der Zellen mit den anderen Substanzen wurde eine geringere Hemmung erzielt. Im Vergleich dazu konnte durch Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren ohne Zusatz des Sheddingaktivators H₂O₂ kein Einfluss auf eine Änderung der Antigendichte auf der Zelloberfläche beobachtet werden (Tabellarischer Anhang, 1.3). Damit konnte sichergestellt werden, dass der Einfluss der neuen Verbindungen ausschließlich auf der Kombination mit dem CD163-Shedding induzierenden H₂O₂ beruhte.

Durch diese Untersuchungen konnte an humanen Monocyten gezeigt werden, dass die Inhibierung des Shedding von CD163 als ein Modell zur Untersuchung der Wirksamkeit und Toxizität neuer Metalloproteinaseinhibitoren herangezogen werden kann. Auf diese Weise ist eine Abschätzung der postulierten Inhibitorwirkungen mittels eines raschen Nachweisverfahrens möglich, wodurch für das Shedding von CD163 als Testsystem von Metalloproteinaseinhibitoren eine Einsatzmöglichkeit in der medizinischen Chemie aufgezeigt werden konnte.

1.4 Untersuchung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Die Generierung von ROS spielt offenbar eine zentrale Rolle bei der Induktion des Shedding von CD163 von der Zelloberfläche humaner Monocyten. In den Versuchen zur Inhibierung des Shedding von CD163 von der Oberfläche humaner Monocyten konnte für die untersuchten Verbindungen gezeigt werden, dass ihre Wirkung auf CD163 durch den Radikalfänger NALC gehemmt werden konnte. Die inhibierende Wirkung des NALC war jeweils unterschiedlich stark ausgeprägt. So konnte durch Vorinkubation mit NALC das Shedding von CD163, induziert durch H_2O_2 , den NO-Donator SNAP und 8-iso $PGF_{2\alpha}$, vollständig gehemmt werden (Allgemeiner Teil, 1.2.1.4.3, 1.2.1.5.2, 1.2.2.4), vermittelt durch CsA konnte der absplattende Effekt dagegen nur teilweise aufgehoben werden (Allgemeiner Teil, 1.2.3.3).

Humane Monocyten sind mit Enzymen ausgestattet, die nach Aktivierung zur Bildung von ROS führen können [207-209]. Durch eine quantitative Bestimmung von ROS sollte der Zusammenhang zwischen den Verbindungen, die als Induktoren des Shedding von CD163 identifiziert worden waren, und der Bildung von ROS untersucht werden. Die sheddinginduzierenden Substanzen wurden auf ihre Fähigkeit geprüft, ROS in humanen Monocyten zu generieren.

1.4.1 Luminolsensitive Chemolumineszenz

Zur quantitativen Bestimmung der ROS-Produktion durch die unterschiedlichen Reagenzien wurde die Luminol-Lumineszenz-Methode angewendet [210].

Mit Lumineszenz wird im Allgemeinen das Leuchten von Stoffen ohne gleichzeitige Temperaturerhöhung bezeichnet [211]. Generell ist dieses Leuchten auf den Übergang angeregter Elektronen aus einem energetisch höheren in einen energetisch niedrigeren Zustand zurückzuführen. Stammt die zur Elektronenanregung nötige Aktivierungsenergie aus einer chemischen Reaktion, wird der Lumineszenzprozess als Chemolumineszenz bezeichnet [211]. Je nach Art der Energiezufuhr werden verschiedene Lumineszenzen unterschieden. Die Lichtemission der Chemolumineszenz liegt zumeist bei Wellenlängen zwischen 400 bis 700 nm [211].

Luminol ist ein Aminophthalsäurehydrazid, das in der Lage ist, bei Einbringen in alkalische wässrige Lösungen nach Oxidation durch ROS eine intensive bläuliche Chemolumineszenz zu erzeugen [210] (Abb. 37).

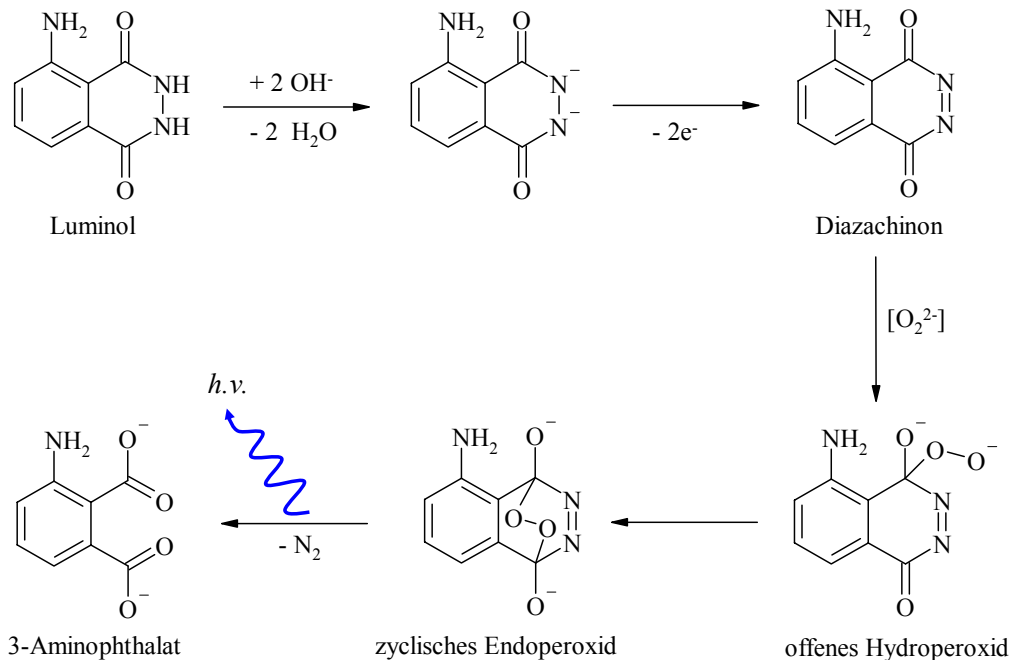


Abb. 37: Mechanismus der Luminol-Reaktion (modifiziert nach Brolin und Wettermark [212]).

Der genaue Reaktionsmechanismus des Luminols in wässrigen Lösungen ist noch nicht vollständig geklärt. Wahrscheinlich wird als primäres Intermediat ein offenes Hydroperoxid gebildet, das über eine intramolekulare nukleophile Addition zu einem zyklischen Endoperoxid reagiert. Das Endoperoxid zerfällt in einem weiteren Schritt zu Stickstoff und dem elektronisch angeregten 3-Aminophthalat [212]. Das Emissionsmaximum der Luminol-Reaktion liegt bei 424 nm und die Intensität des Lichtes ist direkt proportional zur Menge gebildeter ROS.

Neben Luminol werden auch andere Aktivatoren der Chemolumineszenz eingesetzt. Die bekanntesten sind Isoluminol [213], Lucigenin [214], Pholasin [215] und L-012 [216].

1.4.2 Freisetzung von ROS durch sheddinginduzierende Reagenzien

Zur Untersuchung der Bildung von ROS in humanen Monocyten durch Shedding von CD163 induzierende Reagenzien wurde die Chemolumineszenz (CL) isolierter Monocyten in einem

Luminometer als Relative Lichteinheiten (RLU) bestimmt (Experimenteller Teil, 3.10). Die Zunahme der CL durch das jeweilige Reagenz wurde im direkten Vergleich zu Zellen ermittelt, denen eine Pufferlösung anstelle des Stimulanz zugesetzt wurde (Kontrolle). Um sicherzustellen, dass für alle Zellen gleiche Ausgangsbedingungen der Lumineszenz vorlagen, wurde für zehn Minuten (600 Sekunden) die basale CL der Zellen bestimmt. Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen mit den unterschiedlichen Sheddingreagenzien. Auf diese Weise sollte ausgeschlossen werden, dass die Zellen bereits vor der Induktion durch die Sheddingreagenzien unterschiedliche Mengen ROS produzieren.

Die Intensität und das kinetische Profil der luminolsensitiven CL waren jeweils abhängig vom eingesetzten Aktivator. Generell konnte nach Zugabe der untersuchten Reagenzien ein CL-Signal beobachtet werden (Abb. 38).

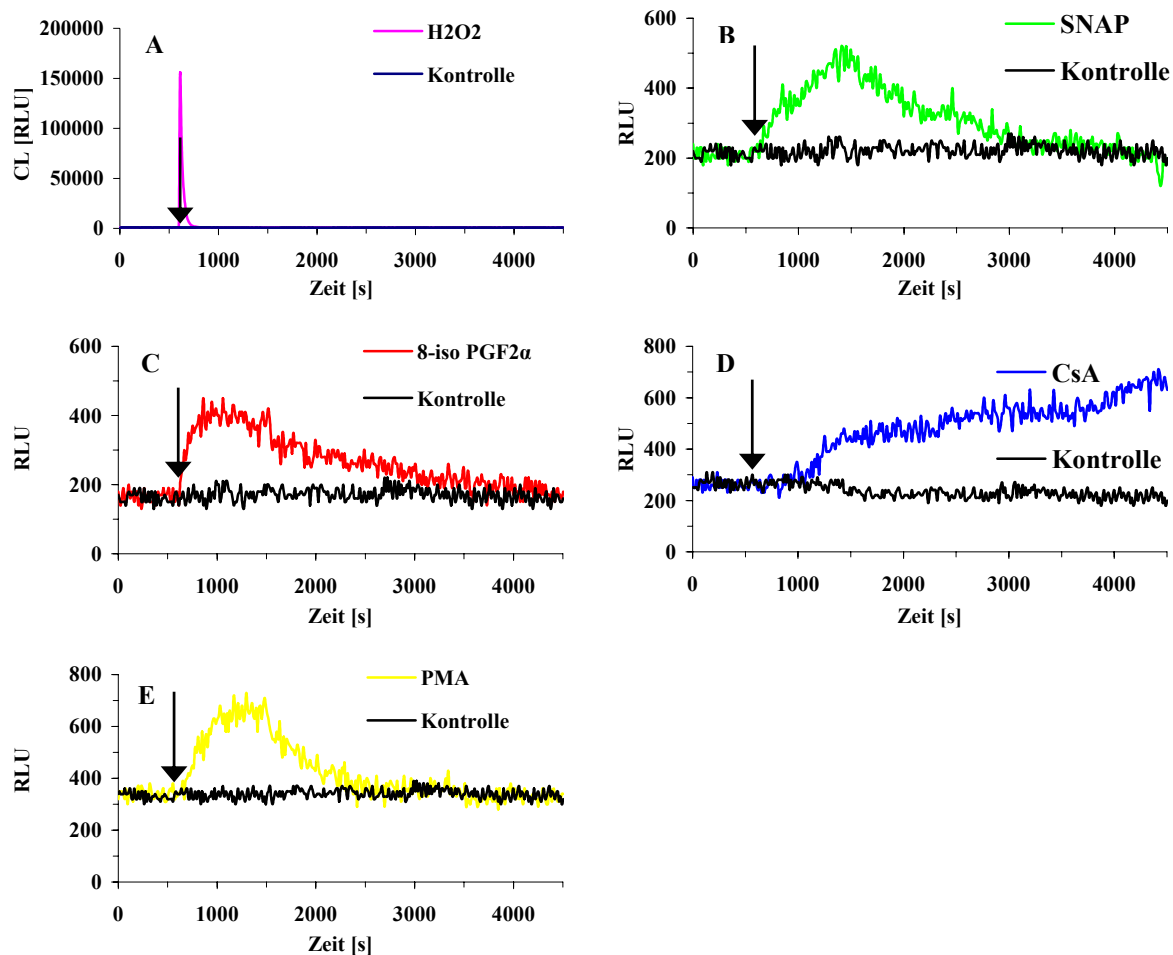


Abb. 38: Kinetisches Profil der Luminol-Reaktionen nach Induktion der Generierung von ROS durch **A** H₂O₂, **B** S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP), **C** 8-iso Prostaglandin F₂α (8-iso PGF₂α), **D** Cyclosporin A (CsA) und **E** Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) im Vergleich zu unstimulierten Zellen (Kontrolle). Dargestellt ist die Zunahme der Chemolumineszenz (CL) in Relativen Lichteinheiten (RLU) über eine Stunde. Die basale ROS-Produktion der Zellen wurde jeweils für 10 Minuten bestimmt (600 Sekunden), anschließend wurde das jeweilige Reagenz zupipettiert (Pfeil). Abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Diagramm.

Die H₂O₂-Zugabe zu den Monocyten resultierte in einem starken CL-Signal (Abb. 38, A). Direkt nach Reagenzzugabe stieg die CL-Intensität von ihrem Basalwert auf einen Maximalwert von über 150000 RLU an. H₂O₂ konnte direkt mit dem im Zellmedium vorhandenen Luminol reagieren und verursachte die stärkste Lichtemission. Innerhalb von fünf Minuten fiel die CL wieder auf den Basalwert ab, der bis zum Ende der Messung konstant blieb. Nach Zugabe des NO-Donators SNAP konnte ein sehr viel geringerer und langsamerer Anstieg der CL und damit der Menge in der Lösung vorhandener ROS beobachtet werden (Abb. 38, B). Der Anstieg der CL erfolgte zwar ebenso wie bei H₂O₂ direkt nach Reagenzzusatz, verlief jedoch weniger steil. Das Maximum der SNAP-induzierten CL wurde erst nach weiteren 15 Minuten gemessen und lag circa 1,5fach höher als die basale Lumineszenz der Zellen. Über einen Zeitraum von 30 Minuten nahm die Intensität der CL anschließend kontinuierlich ab und erreichte schließlich das Lumineszenzniveau der parallel vermessenen Kontrollzellen.

Ein ähnliches Kinetikprofil wurde für die Stimulation der Monocyten mit 8-iso PGF_{2α} erhalten (Abb. 38, C). Ebenso wie nach Stimulation mit SNAP konnte ein lange anhaltendes CL-Signal beobachtet werden. Nach Zugabe von 8-iso PGF_{2α} stieg die CL-Intensität im Vergleich zu SNAP rascher an und erreichte das Maximum bereits nach sieben Minuten. Das durch 8-iso PGF_{2α}-induzierte CL-Maximum lag im Vergleich zu dem mittleren Basalwert circa 2,5fach höher als bei Zellen ohne Stimulation. Danach fiel die Signalintensität wieder ab, erreichte die basale Lumineszenz jedoch erst am Ende der Messung. Über den einstündigen Messzeitraum war immer eine CL der 8-iso PGF_{2α}-stimulierten Zellen festzustellen.

Ein vollkommen unterschiedliches Kinetikprofil wurde für die mit CsA stimulierten Zellen erhalten (Abb. 38, D). In den bisherigen Verläufen wurde nach Zugabe des jeweiligen Stimulanz rasch eine Zunahme der luminolverstärkten CL beobachtet, die ein Maximum erreichte und innerhalb der einstündigen Messzeit wieder auf die Lumineszenz der Kontrollzellen zurückfiel. Nach Stimulation mit CsA dagegen erfolgte ein Anstieg der CL erst nach weiteren zehn Minuten. Ab diesem Zeitpunkt (1200 Sekunden) stieg die CL stetig bis zum Ende der Messung nach einer Stunde an. Innerhalb des Messzeitraums konnte für die CsA-induzierte CL kein Maximum detektiert werden.

Da bekannt ist, dass der Phorbolster PMA zu einer Induktion der Generierung von ROS in Zellen führen kann [111] und PMA ein bekannter Aktivator des Shedding von CD163 *in vitro* ist, wurde auch das Kinetikprofil der CL-Bildung humaner Monocyten nach PMA-

Stimulation aufgenommen (Abb. 38, E). Nach Stimulation der Zellen mit PMA konnte rasch ein kontinuierlicher Anstieg der CL beobachtet werden. Nach 10 Minuten erreichte die CL für PMA maximale Werte, die über 15 Minuten nahezu konstant blieben. Anschließend fiel die Lumineszenz über einen Zeitraum von weiteren 15 Minuten wieder bis zum Ausgangswert ab. Im Vergleich zu der Intensität der Zellen vor der PMA-Stimulation wurde im Maximum eine zweifach höhere CL erreicht. Damit lag das Maximum zwischen dem durch SNAP- und 8-iso PGF_{2α}-Behandlung ermittelten Wert. Im Unterschied zu diesen beiden Stimulanzien blieb nach PMA-Behandlung die hohe CL über einen längeren Zeitraum bestehen.

Zur Quantifizierung der ROS, die sich nach Zusatz der Stimulanzien in direktem Kontakt mit den Zellen befanden, wurde jeweils die *Area under the curve* (AUC) der RLU der kinetischen Messung über eine Stunde bestimmt (Abb. 39). Als Grundlinie diente jeweils der Mittelwert der basalen Lumineszenz, die in den ersten zehn Minuten vor Zugabe des Stimulanz bestimmt wurde (siehe Abb. 38, Sekunde 1 bis 600). Als Vergleich wurde die AUC der RLU von Zellen herangezogen, denen nach 600 Sekunden anstelle des Stimulanz ein Puffer zugesetzt wurde (Kontrolle). Die AUC dieser Zellen wurde auf 100 % gesetzt.

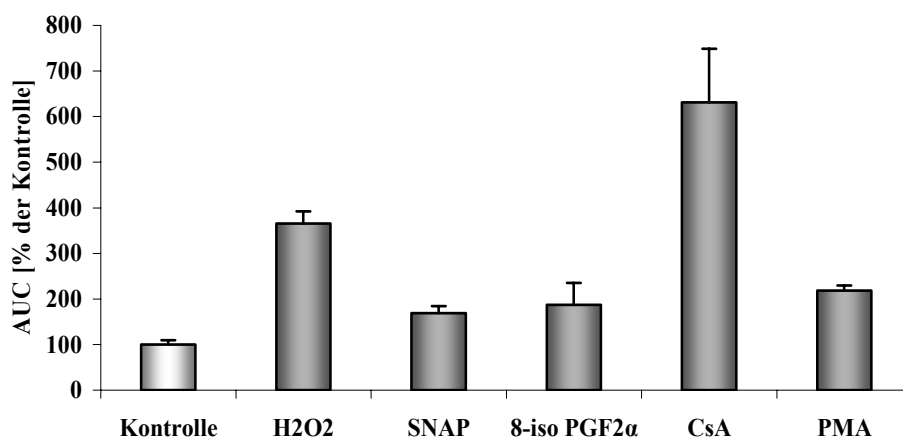


Abb. 39: Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) von Monocyten nach Stimulation mit verschiedenen Reagenzien. Dargestellt ist das Verhältnis der *Area under the curve* (AUC) der Lumineszenzmessung nach Stimulation im Vergleich zu unstimulierten Zellen (Kontrolle). Die Kontrolle wurde auf einen Wert von 100 % gesetzt. Die Bestimmung der Chemolumineszenz erfolgte als Relative Lichteinheiten (RLU). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Mittleren Abweichungen vom Mittelwert (MA) von Dreifachbestimmungen. Die Auswertung der AUC erfolgte mit der Software GraphPad Prism 4.

Wie bereits im kinetischen Profil (Abb. 38, A) beobachtet werden konnte, war auch bei der Auswertung der AUC nach H₂O₂-Zugabe eine deutliche CL nachzuweisen. Im Verhältnis zu den unstimulierten Kontrollzellen war die AUC der CL nach H₂O₂-Zugabe mit 365,7 ± 26,5 % um mehr als 200 % gegenüber der Kontrolle erhöht (Abb. 39). Die große Signalfäche

resultiert aus einem sehr raschen Anstieg der CL nach Zugabe des Reagenzes auf circa 150000 RLU und einem anschließenden ebenso raschen Signalabfall auf die Ausgangslumineszenz (Abb. 38, A). Aus dieser raschen Verlaufskurve lässt sich ableiten, dass durch das zugegebene H_2O_2 ausschließlich eine Reaktion zwischen dem exogenen H_2O_2 und dem Luminol stattgefunden hat. Ob der Zusatz von H_2O_2 zur Bildung weiterer ROS in den Zellen führte, konnte unter diesen Bedingungen nicht ermittelt werden.

Durch den NO-Donator SNAP wurde eine AUC der RLU von $168,4 \pm 16,1$ % erreicht. Damit konnte unter dem Einfluss von NO im Vergleich zu den Kontrollzellen 68,4 % ROS erzeugt werden. Aufgrund des langsamen Anstiegs des CL ist es wahrscheinlich, dass die Bildung des Signals aus der Generierung von ROS resultiert. Mit $187,2 \pm 47,8$ % lag der durch 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ gebildete ROS-Anteil nur wenig über dem durch SNAP erzeugten Anteil an ROS. Die Zellstimulation mit CsA führte zur Ausbildung des stärksten CL-Signals, das sich in einer großen AUC der RLU von $631,0 \pm 117,7$ % widerspiegelte. Damit wies die AUC eine Fläche auf, die das Fünffache der Kontrollzellen betrug. Nach Inkubation der Monocyten mit dem Phorbolster PMA konnte eine AUC bestimmt werden, die mit $218,7 \pm 10,7$ % eine dem 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ und SNAP vergleichbare ROS-Freisetzung anzeigte.

Die Induktion der ROS-Bildung durch SNAP ist wahrscheinlich auf eine Inhibierung der mitochondrialen Atmung durch NO zurückzuführen [217]. Es ist bekannt, dass NO ein potentieller Inhibitor der mitochondrialen Respiration von Zellen ist [218]. Der zelluläre Mechanismus verläuft dabei hauptsächlich über eine Hemmung der Cytochrom c Oxidase, einem physiologischen Regulator der Atmung [219]. Durch die NO-induzierte Inhibierung der Respiration erfolgt eine erhöhte Produktion von Superoxidanionen und von H_2O_2 [220, 221]. In der hier dargestellten Untersuchung der ROS-Freisetzung wurde NO bzw. SNAP in der Konzentration eingesetzt, die auch in den Versuchen zum Shedding von CD163 angewandt wurde (Allgemeiner Teil, 1.2.1.5.1). Poderoso et al. konnten in Untersuchungen am Herzen von Ratten in Partikeln aus Mitochondrien eine dosisabhängige H_2O_2 -Produktion nach NO-Inkubation erkennen [220]. Maximale Effekte der H_2O_2 -Bildung konnten mit NO-Konzentrationen von 0,5 bis 0,6 μM erreicht werden. In den eigenen Versuchen kann eine Konzentration von 1 mM SNAP zum Einsatz. Das genaue Ausmaß der NO-Freisetzung durch SNAP ist nicht bekannt, liegt jedoch mit Sicherheit in einem Konzentrationsbereich oberhalb 0,6 μM , so dass ähnlich stimulierende Effekte auf die H_2O_2 -Freisetzung zu erwarten sind. Der limitierende Faktor für den Einsatz hoher NO-Konzentrationen ist der apoptotische Effekt auf die Zellen [217]. In den eigenen Versuchen konnte ein übermäßiges Zellsterben durch

wiederholte Untersuchung der Zellviabilität vor der Durchführung jedoch ausgeschlossen werden.

Eine der SNAP-Induktion quantitativ vergleichbare Bildung von ROS konnte nach Stimulation der Monocyten mit 8-iso PGF_{2α} erreicht werden (Abb. 39). Basierend auf den Beobachtungen der Induktion von ROS durch das equipotente SNAP bei einer Konzentration von 1 mM konnte somit gezeigt werden, dass 8-iso PGF_{2α} als endogenes Produkt von oxidativem Stress ebenfalls in der Lage ist, die Auslöser für diesen Stress, nämlich ROS, selbst zu erzeugen. Wie dieser zelluläre Effekt durch das Isoprostaglandin ausgelöst werden kann, ist unbekannt. Es wird angenommen, dass Isoprostaglandine ihre Wirkungen über einen isoprostaglandinspezifischen Rezeptor ausüben, der sich vom klassischen Prostaglandin-Rezeptor unterscheidet [170]. So konnte gezeigt werden, dass 8-iso PGF_{2α} zur Aggregation von Blutplättchen führte, dieser Vorgang jedoch nicht wie bei den Prostaglandinen über den Thromboxan-Rezeptor vermittelt wird. Darüber hinaus konnte sogar eine antagonisierende Wirkung des 8-iso PGF_{2α} auf den Thromboxan-Rezeptor beobachtet werden [222-224]. Die Existenz eines solchen isoprostaglandinspezifischen Rezeptors konnte bisher jedoch nicht bestätigt werden.

Bei einem Vergleich der kinetischen Profile der ROS-Bildung nach Stimulation mit H₂O₂, SNAP und 8-iso PGF_{2α} und der Effizienz dieser Substanzen auf das Shedding von CD163 fiel auf, dass SNAP und 8-iso PGF_{2α} zur Bildung eines ähnlichen ROS-Anteils beigetragen haben. Als Induktor des Shedding von CD163 von der Oberfläche humaner Monocyten wirkte das 8-iso PGF_{2α} sehr viel intensiver. Die Aktivierung des Shedding von CD163 durch Isoprostaglandin ist in ihrer Intensität eher mit der des H₂O₂ zu vergleichen, wobei H₂O₂ eine bedeutend größere AUC der RLU aufwies. Unter der Annahme, dass die Generierung von ROS der bestimmende Mechanismus des durch diese Verbindungen induzierten Shedding von CD163 ist, so kann die Quantität der gebildeten ROS nicht als Auslöser des Shedding angenommen werden.

Die kinetischen Verläufe der durch diese Reagenzien bewirkten ROS-Bildung zeigten, dass nach Zugabe von H₂O₂ und 8-iso PGF_{2α} eine rasche Zunahme der CL zu hohen RLU erfolgte, wogegen der Anstieg nach SNAP-Zugabe sehr viel moderater verlief. Die Kurve der SNAP-Stimulation hatte einen flacheren Kurvenverlauf als nach Stimulation mit H₂O₂ und 8-iso PGF_{2α}. Eine mögliche Begründung für die unterschiedlichen Effekte und Kurvenverläufe könnte darin zu finden sein, dass für die Abspaltung des CD163 die endogene oder exogene Erzeugung einer kurzzeitigen hohen ROS-Konzentration, ähnlich einem Bolus,

effektiver auf die Abspaltung wirkt als niedrige, länger anhaltende ROS-Konzentrationen. Als eine weitere Interpretationsmöglichkeit für diesen flachen Kurvenverlauf könnte auch eine verzögerte Freisetzung von NO aus SNAP angenommen werden, so dass die luminolsensitive CL-Reaktion dadurch ebenfalls nur verzögert ablaufen könnte.

Das Kinetikprofil der ROS-Generierung nach CsA-Stimulation unterschied sich deutlich von dem der anderen Substanzen. In den Versuchen zur Induktion des Shedding von CD163 durch CsA betrug die Inkubationszeit zwei Stunden. Somit ist anzunehmen, dass innerhalb dieser Zeit noch eine weitaus größere Menge ROS gebildet werden konnte.

Die Fähigkeit des CsA zur Induktion der ROS-Bildung ist bereits bekannt [195, 196]. Im Zusammenhang mit der Annahme, dass ROS Auslöser von toxischen Nebenwirkungen des CsA sind, diagnostizierten Calo et al. bei Patienten, die nach einer Milz-Transplantation mit CsA behandelt wurden, eine auf der verstärkten Bildung von oxidativem Stress beruhende Hypertension [197]. Ein ähnlicher Kurvenverlauf der CL mit ausgeprägter Bildung von ROS konnte ebenfalls nach Aktivierung von Phagocyten aus Ratten mittels opsonisiertem Zymosan ermittelt werden [225]. Zymosan, ein unlösliches Polysaccharid aus der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae* [226] ist ein Aktivator des Komplementsystems. Nach Zusatz von opsonisiertem Zymosan konnte eine ausgeprägte ROS-Freisetzung beobachtet werden, die ebenfalls erst kurze Zeit nach Zusatz des Zymosans einsetzte [225]. Als Grund für diesen Verlauf wurde angenommen, dass Zymosan zuerst an die Oberfläche der Zellen binden muss und anschließend weitere Enzyme in den Zellen aktiviert, die zu einem *oxidative burst* und damit zur Bildung von ROS führen [227]. CsA bewirkte möglicherweise einen ähnlich verzögerten Prozessablauf, der nach Initiierung zu einer Wirkungspotenzierung durch nachfolgende Enzymaktivierung führte.

Der Phorbolster PMA, der ein ausgeprägtes CD163-Shedding *in vitro* auslöst [41], zeigte ebenfalls eine deutliche CL-Bildung, die in ihrem Maximum ungefähr doppelt so hoch lag wie die CL der unstimulierten Kontrollzellen. PMA ist über die Aktivierung der Proteinkinase C in der Lage ROS zu bilden [227]. Im kinetischen Profil zeigte der Phorbolster eine relativ rasche Zunahme der CL und damit eine schnelle ROS-Bildung. Ähnliche Kurvenverläufe wurden für PMA mit verschiedenen Chemolumineszenzsubstraten wie Luminol, Isoluminol und Lucigenin aufgezeigt [225, 228]. Dabei verursachte PMA ein schnelles und kurzzeitiges Lumineszenzsignal, das auf eine direkte Aktivierung der Proteinkinase C hindeutet.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Verbindungen, die ein Shedding von CD163 induzieren können, auch in der Lage sind eine Generierung von ROS in humanen Monocyten einzuleiten. Ausmaß und Geschwindigkeit der Bildung dieser ROS sind jeweils unterschiedlich. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass nicht eine hohe quantitative Bildung der ROS ein Shedding von CD163 auslöst, sondern eher ein rascher und ausgeprägter Anstieg ausschlaggebend war. Der entsprechende Signalweg oder die Sheddase wurde wahrscheinlich durch eine hohe ROS-Konzentration nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip aktiviert. Damit musste eine Schwellenkonzentration überschritten werden, um die Auslösung des entsprechenden Signals zu erreichen. Ein langsamer Anstieg der ROS-Konzentration war weniger erfolgreich. Dieses Aktivierungsprinzip schien hauptsächlich für die Aktivierung des Shedding von CD163 durch H_2O_2 , 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ und PMA zuzutreffen. SNAP führte dagegen zu einer langsamen ROS-Bildung und erreichte keine ausreichend hohe Konzentrationen, wogegen CsA über einen anderen Mechanismus zur Induktion des Shedding führen dürfte.

1.4.3 Inhibierung der H_2O_2 -induzierten ROS-Freisetzung

Ergänzend zur Untersuchung der Induktion der ROS-Generierung durch die unterschiedlichen sheddinginduzierenden Reagenzien wurden die in den Hemmversuchen des Shedding von CD163 eingesetzten Inhibitoren auf ihren Einfluss auf die ROS-Bildung analysiert. Exemplarisch wurde H_2O_2 als Vertreter der ROS eingesetzt. Humane Monocyten wurden dazu 15 Minuten in An- oder Abwesenheit von NALC, BAPTA/AM oder TAPI-1 vorinkubiert. Dabei wurde die basale Chemolumineszenz der Zellen bestimmt. Während dieser Zeit konnte keine bzw. kaum eine Veränderung in der Intensität der Chemolumineszenz festgestellt werden. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass die Inhibitoren selber zur ROS-Generierung führen. Zur weiteren Kontrolle wurde ein Teil der Zellen anstelle mit H_2O_2 /Inhibitor mit Puffer versetzt (Kontrolle). Zur Ermittlung des Einflusses der Inhibitoren wurde ein kinetisches Chemolumineszenzprofil über eine Stunde aufgenommen. Bereits 15 Minuten nach Zugabe des H_2O_2 war die CL wieder auf den basalen Wert zurückgefallen (Abb. 40). Anschließend erfolgte eine genaue Auswertung über die AUC der RLU.

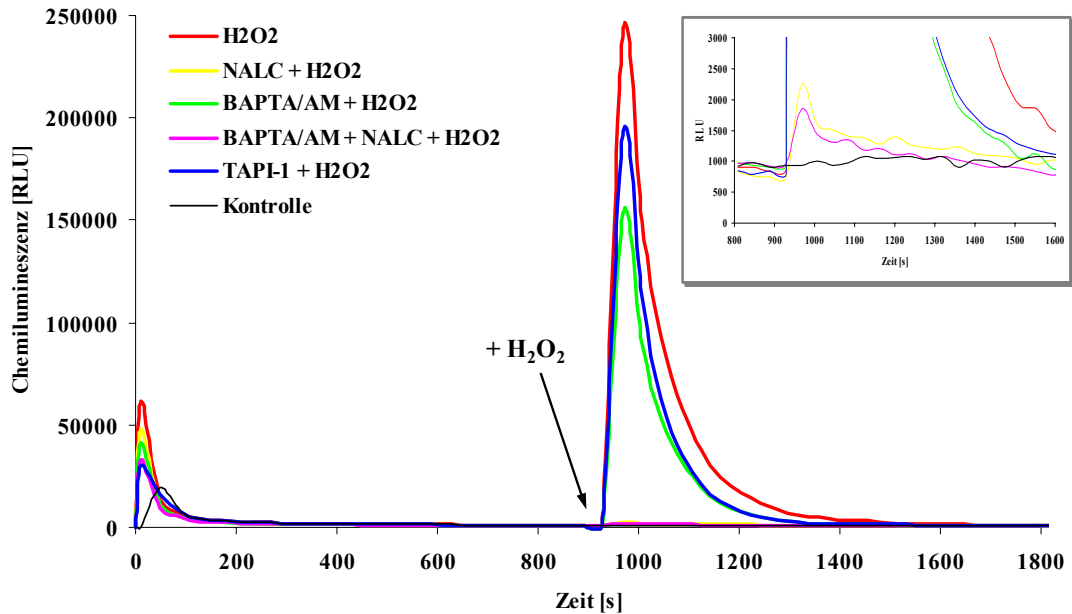


Abb. 40: Kinetisches Profil der Inhibierung der H_2O_2 -induzierter ROS-Freisetzung. Die basale Chemolumineszenz der Zellen wurde mit bzw. ohne Inhibitor über einen Zeitraum von 15 Minuten bestimmt. Anschließend erfolgte die Stimulation mit H_2O_2 (Pfeil). Dargestellt ist ein repräsentativer Chemolumineszenz-Zeit-Verlauf. Das kleine Bild gibt einen vergrößerten Ausschnitt der Chemolumineszenz niedrigerer Intensitäten im Zeitraum von 800 bis 1600 Sekunden wider.

Die Änderung der CL nach unterschiedlicher Stimulation der Zellen ergab, dass durch die Vorinkubation mit den eingesetzten Inhibitoren ein Quenching des H_2O_2 -induzierten CL-Signals hervorgerufen wurde. Den stärksten Einfluss zeigte dabei der Radikalfänger NALC. Nach Vorinkubation mit NALC konnte durch H_2O_2 -Zusatz nur eine sehr geringe CL-Zunahme bewirkt werden (Abb. 40, kleines Bild). Durch die Kombination von NALC mit dem Calciumchelator BAPTA/AM konnte das CL-Signal nach H_2O_2 -Stimulation sogar noch weiter verringert werden. Eine geringere Wirkung auf das Quenching der CL konnte nach Vorbehandlung der Zellen ausschließlich mit BAPTA/AM oder mit dem Metalloproteinaseinhibitor TAPI-1 erreicht werden. Nach Stimulation mit H_2O_2 war nach Vorinkubation mit diesen beiden Inhibitoren weiterhin eine deutliche CL-Entwicklung der Monocyten zu erkennen.

Zu Beginn der Messungen konnte nach Zusatz des Luminols bei allen Proben eine kurze Zunahme der CL beobachtet werden, die rasch wieder auf das Grundniveau zurückfiel (Abb. 40). Ein derartiger Effekt konnte ebenfalls von Rost et al. bei der Untersuchung von H_2O_2 -induzierter Chemolumineszenz in wässriger Lösung mittels Luminol festgestellt werden [229]. In der Anwesenheit von Fe^{2+} Ionen fand jeweils bei Zugabe von Luminol eine verstärkte CL-Bildung statt, die nach wenigen Sekunden wieder auf das Ausgangsniveau der CL-Messung mit Luminol zurückfiel. Dieser Effekt beruhte auf einer verstärkten Reaktion

des im Überschuss vorliegenden Luminols mit spontan von den Zellen gebildetem H_2O_2 . Bei der Untersuchung des Quenchings der H_2O_2 -induzierten CL könnten die kurz auftretenden CL-Signale zu Beginn der Messung ebenfalls auf die verstärkte Reaktion des zugesetzten Luminols mit den sich bereits in der Lösung befindlichen ROS zurückzuführen sein. Rust et al. konnten dieses Phänomen der verstärkten Lumineszenz bei Luminolzugabe nur in Anwesenheit von Fe^{2+} -Ionen feststellen. Da im Kulturmedium der Monocyten auf Grund des Zusatzes von fetalem Kälberserum ebenfalls Fe^{2+} -Ionen vorlagen, konnte von ähnlichen Basisbedingungen ausgegangen werden.

Bei der Berechnung der AUC wurden diese kurz auftretenden Signale nicht mit einbezogen (Abb. 41). Der AUC unstimulierter Kontrollzellen (Kontrolle) wurde auf 100 % gesetzt. Mit einer Fläche von $106,9 \pm 5,0$ % nach Vorinkubation mit NALC und $103,3 \pm 0,6$ % für die Kombination aus NALC und BAPTA/AM ergaben sich AUC der RLU, die sich kaum von der Kontrolle unterschieden. Der Calciumchelator allein führte ebenfalls zu einem Quenching der der H_2O_2 -induzierten CL, die im Vergleich zu $NALC \pm BAPTA/AM$ jedoch deutlich geringer ausfiel. Wie bereits in den Hemmversuchen des H_2O_2 -induzierten Shedding von CD163 beobachtet konnte dieser Vorgang durch Chelatisierung des intrazellulären Calciums inhibiert werden (Allgemeiner Teil, 1.2.1.4.3).

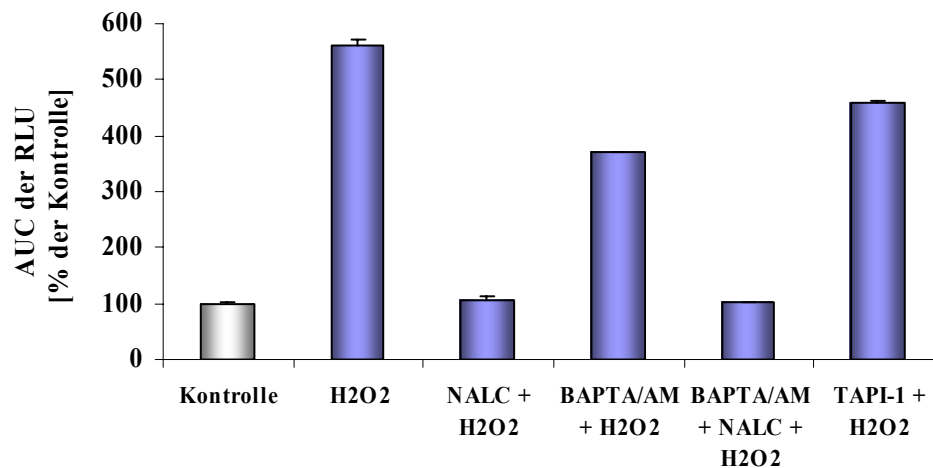


Abb. 41: Inhibierung der H_2O_2 -induzierten Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Die Bestimmung erfolgte mittels Chemolumineszenz. Dargestellt ist jeweils die *Area under the curve* (AUC) der Relativen Lichteinheiten (RLU) nach Stimulation der Zellen mit H_2O_2 bzw. nach Vorinkubation mit den Inhibitoren N-Acetylcystein (NALC), BAPTA/AM und TAPI-1 und anschließender Stimulation mit H_2O_2 im Vergleich zu unstimulierten Zellen (Kontrolle). Die AUC der Kontrollzellen wurde auf 100 % gesetzt. Wiedergegeben sind die Mittelwerte und Mittlere Abweichungen vom Mittelwert (MA) von Dreifachbestimmungen.

Ein ähnlicher Zusammenhang zwischen intrazellulärer Calciumkonzentration und ROS konnte von Cathcart et al. beobachtet werden [147]. Nach Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, eingeleitet durch Aktivierung der Zellen mit opsonisiertem Zymosan,

erfolgte parallel eine verstärkte Bildung von Sauerstoffradikalen. Der erhöhte intrazelluläre Einstrom von Calcium dürfte zur Aktivierung der calciumabhängigen Proteinkinase C α und der cytosolischen Phospholipase A₂ (cPLA₂) geführt haben. Die cPLA₂ wiederum führte zur Bildung von Arachidonsäure mit der Folge, dass kleine G-Proteine zur Zellmembran transportiert werden, die die NADPH-Oxidase aktivierten. Über dieses Enzym kann Sauerstoff in Superoxidradikalanionen umgewandelt werden [147]. Eine Chelatisierung von Calcium als Ausgangsverbindung der Signalkette kann damit zu einer Inhibierung der ROS-Produktion beitragen. Eine calciumabhängige Produktion von ROS wurde ebenfalls von Hotchkiss et al. beobachtet [146]. Die Untersuchungen erfolgten an Macrophagen, die zur Aktivierung mit Lipopolysaccharid oder Phorbol ester aktiviert worden waren. Der Einsatz von Calciumkanal-Blockern, wie Diltiazem oder Verapamil, zeigte, dass die Produktion von Sauerstoffspezies durch Hemmung des extrazellulären Calciumeinstroms inhibiert werden konnte. Über das Abfangen der Calciumionen durch Chelatisierung nach Einstrom in die Zellen könnte dieser ROS-generierende Mechanismus ebenfalls gehemmt werden.

Einen direkten Einfluss des intrazellulären Calciumchelators BAPTA/AM auf die ROS-Entstehung konnte von Kessels et al. ermittelt werden [230]. Die Inkubation von Neutrophilen mit dem chemotaktischen Peptid N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP) führte zu einer deutlichen Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und folglich auch zu einem *oxidative burst* [231, 232]. Dieser Effekt konnte durch Vorinkubation der Zellen mit dem intrazellulären Calciumchelator BAPTA/AM nahezu vollständig aufgehoben werden. Der Einsatz des extrazellulären Calciumchelators EGTA dagegen führte nur zu einer 50 %igen Hemmung der Ausbildung eines *oxidativ burst*. Daraus folgt, dass für die Aktivierung der Zellen zur Bildung von ROS eine intrazellulär hohe Konzentration von Calcium nötig ist. Extrazelluläres Calcium hat einen geringeren Einfluss.

In Neutrophilen von Ratten konnten Zhu et al. eine Hemmung der calciuminduzierten ROS-Entstehung feststellen [233]. Durch Erhöhung luminolsensitiver CL konnte nach Aktivierung der Zellen mit fMLP eine verstärkte ROS-Bildung beobachtet werden. Nach Vorinkubation mit Superoxiddismutase wurde eine ähnliche CL wie die der unstimulierten Kontrollzellen detektiert. Als generierte ROS wurde in dieser Untersuchung das Superoxidanion identifiziert. Durch die Aufhebung des calciuminduzierten Effektes durch eine antioxidative Verbindung konnte gezeigt werden, dass eine Verbindung zwischen Calcium und ROS bestand.

Überraschenderweise konnte auch der Metalloproteinaseinhibitor TAPI-1 zu einer geringeren Hemmung der Induktion der CL durch H_2O_2 führen (Abb. 41). Es gibt viele Anhaltspunkte dafür, dass ROS zur Aktivierung von Metalloproteinasen führen bzw. positiv auf die Genexpression dieser Enzyme einwirken [234]. Es konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden, dass auch umgekehrt eine Hemmung der Metalloproteinasen zu einer Inhibierung der zellulären ROS-Entstehung führt.

Die Bildung von ROS-Spezies in humanen Monocyten, hier dargestellt am Beispiel der Induktion durch H_2O_2 , kann sowohl durch Abfangen der Radikale mittels NALC als auch durch Chelatierung der als *second messenger* fungierenden intrazellulären Calcium-Ionen erfolgen. Besonders deutlich wurde dabei die enge Beziehung zwischen der Entstehung von ROS und der Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration.

1.5 Vergleich der Induktion des Shedding von CD163 mit dem Shedding des *Tumor necrosis factor- α* (TNF- α)

Der *Tumor necrosis factor- α* (TNF- α) ist ein Cytokin, das durch den Mechanismus des Shedding aus der membranständigen Proform generiert wird [235]. Shedding von TNF- α weist einige Gemeinsamkeiten mit dem Shedding von CD163 auf. So weiß man, dass TNF- α durch das *Tumor necrosis factor- α converting enzyme* (TACE) abgespalten wird. Als für die Abspaltung von CD163 verantwortliche Sheddase wird ebenfalls ein Mitglied aus der Familie der ADAMs vermutet. Außerdem werden beide Proteine nach Aktivierung der Zellen mittels LPS oder einem Phorbol ester abgespalten, wobei sogar die Zeitverläufe von der Aktivierung bis zum Shedding beider Substanzen analog sind [76, 236, 237]. Auf Grund dieser Ähnlichkeiten sollte untersucht werden, ob neben der Aktivierung durch LPS und PMA auch die Einflüsse der als Induktoren des Shedding von CD163 identifizierten Verbindungen auf das Shedding von TNF- α vergleichbar sind.

1.5.1 Tumor necrosis factor- α (TNF- α)

TNF- α , auch unter dem Namen Cachectin bekannt, ist ein proinflammatorisches Cytokin, das vor allem von aktivierten Monocyten [238] und Macrophagen [239], aber auch von Neutrophilen [240] und B-Lymphocyten [241] freigesetzt wird. Durch Interaktion mit verschiedenen Zellen ist TNF- α an der Pathogenese einer Vielzahl entzündlicher degenerativer Erkrankungen, wie Rheumatoider Arthritis, *graft-versus-host* Erkrankung und Sepsis, beteiligt [242]. Daneben führt TNF- α zur Aktivierung des Immunsystems und zur Apoptose von Zellen [243]. Die proinflammatorische Wirkung des TNF- α auf die Zellen erfolgt nach Interaktion mit zwei spezifischen Rezeptoren TNF R55 (I) und TNF R75 (II), die auf nahezu allen Zellen vorkommen [244, 245]. Nach Bindung an seinen Rezeptor kommt es zur Aktivierung verschiedener Signalwege [246]. Nahezu das gesamte Spektrum der TNF- α -Wirkungen wird über den TNF R55 vermittelt [247], während TNF R75 als Übermittler von Signalen auf T-Lymphocyten beschränkt zu sein scheint [248].

TNF- α wird als eine trimere membranständige Proform synthetisiert [249], die als pro-TNF- α bezeichnet wird [250]. Die Synthese der Proform erfolgt nach Aktivierung der Zellen auf Grund einer Infektion oder Verletzung der Zellen. Diese membranständige Form des

TNF- α besitzt ebenfalls biologische Aktivität. So konnte eine Erhöhung der zellulären Cytotoxizität, eine verstärkte Freisetzung von Prostaglandinen und eine Heraufregulation von Adhäsionsmolekülen für Zellen mit erhöhtem Anteil an membrangebundenem TNF- α ermittelt werden [251, 252]. Durch proteolytische Spaltung kann der C-terminale Teil dieses Proteins freigesetzt werden und existiert dann als 17 kDa großes lösliches TNF- α . Als Sheddase für die Abspaltung des TNF- α von der Zelloberfläche wurde TACE identifiziert [253, 254]. Die Bindung des Substrates erfolgt dabei wahrscheinlich über die Disintegrin Domäne [255]. Anschließend führt die Zink-enthaltende Metalloprotease-Domäne zur Spaltung des Substrates. Von Maskos et al. wurde nach Aufklärung der Kristallstruktur des TACE ein Modell der Bindung von TACE an pro-TNF- α beschrieben [256].

1.5.2 Prinzip der Bestimmung

Für die Untersuchung der Freisetzung von TNF- α mittels Shedding von CD163-induzierenden Substanzen wurden humane Monocyten mit den verschiedenen Substanzen stimuliert und im Anschluss die Konzentration an freigesetztem TNF- α im Zellüberstand mittels spezifischem ELISA bestimmt (Experimenteller Teil, 3.9). Der ELISA basiert auf dem Prinzip der Sandwich-Technik.

1.5.3 Untersuchung der Freisetzung von TNF- α

Die prozentuale Auswertung erfolgte durch direkten Vergleich der Konzentrationen an TNF- α in den Zellüberständen nach Stimulation mit den unterschiedlichen Reagenzien zu den Zellüberständen vor der Stimulation (100 %). Alle Zellkulturansätze wiesen vor der Stimulation ähnliche Konzentrationen an TNF- α in den Überständen auf, so dass die Ausgangsbedingungen als vergleichbar angesehen werden konnten (Tabellarischer Anhang, 1.5). Als zusätzliche Kontrollen wurden bei diesen Versuchen auch die als Induktoren für die Freisetzung von TNF- α bekannten Stimulanzen LPS und PMA eingesetzt [257, 258].

Zum Vergleich der Sheddingeffizienz der einzelnen Stimulanzen wurde einem Teil der Monocyten kein weiteres Stimulanz zugesetzt (unstimuliert). Nach der Inkubationszeit von zwei Stunden weisen auch diese unstimulierten Zellen eine leicht erhöhte Konzentration an

TNF- α in den Zellüberständen auf (181,0 %). Wahrscheinlich erfolgte durch die Inkubationsbedingungen eine leichte Stimulation der Freisetzung (Abb. 42).

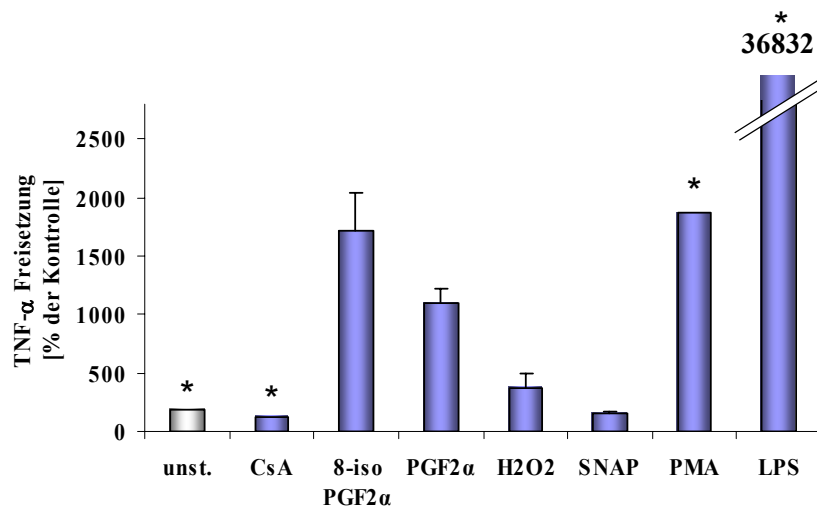


Abb. 42: Freisetzung von TNF- α aus humanen Monocyten nach Stimulation mit verschiedenen Reagenzien. Dargestellt sind die Konzentrationen an TNF- α in den Zellüberständen bezogen auf die jeweiligen Zellüberstände vor der Stimulation (100 %). Die Darstellung repräsentiert die Ergebnisse von Einzelbestimmungen (*) oder die Mittelwerte und Mittleren Abweichungen vom Mittelwert (MA) von Dreifachbestimmungen.

Wie erwartet bewirkte die Stimulation der Monocyten mit den proinflammatorischen Verbindungen LPS und PMA die stärkste Freisetzung von TNF- α . Die LPS-stimulierten Zellen wiesen eine TNF- α -Freisetzung auf, die mit 36832 % weit über der aller anderen Stimulanzien lag. Durch die Auslösung von oxidativem Stress in den Zellen mittels Stimulation durch H $_2$ O $_2$ konnte eine moderate, aber deutliche Freisetzung des TNF- α von $372,8 \pm 119,0$ % ermittelt werden. Durch NO konnte ebenso wie durch CsA keine Freisetzung von TNF- α bewirkt werden. Nach Inkubation der Zellen mit SNAP oder CsA wurden sogar niedrigere Konzentrationen an TNF- α in den Zellüberständen detektiert als bei unstimulierten Zellen. Diese beiden Substanzen wirkten deshalb sogar inhibitorisch auf die Synthese und Freisetzung von TNF- α . Im Gegensatz dazu zeigte die Stimulation der Zellen mit 8-iso PGF $_{2\alpha}$ einen entgegengesetzten Effekt. Durch Induktion der Freisetzung von $1716,0 \pm 328,1$ % war das Isoprostaglandin ähnlich effektiv in der Stimulation wie der Phorbolster PMA (1871,6 %). Das isomere Prostaglandin F $_{2\alpha}$ zeigte ebenfalls stimulierende Wirkung ($1102,0 \pm 120,3$ %), war jedoch nicht ganz so effektiv wie das 8-iso PG F $_{2\alpha}$.

Die Inkubationszeit der Zellen mit den unterschiedlichen Sheddingreagenzien betrug wie in den Untersuchungen des Shedding von CD163 zwei Stunden. Diese Stimulationszeit wurde bereits früher als optimal für die Freisetzung von TNF- α aus LPS-stimulierten Zellen

bestimmt [237]. In Untersuchungen des kinetischen Verlaufs der TNF- α -Freisetzung aus humanen Monocyten nach Stimulation der Zellen mit LPS konnten Robertshaw und Brennan die maximale Freisetzung nach zwei Stunden bestimmen [237]. Während in den eigenen Versuchen bei einer Zellzahl von $2 \cdot 10^6$ Monocyten eine maximale TNF- α -Freisetzung durch LPS von 3314,3 pg/ml erreicht wurde betrug die maximale Konzentration bei Robertshaw und Brennan nach Stimulation der Hälfte der Zellen sogar 50000 pg/ml und war damit noch effektiver. Ebenso wie CD163, wird auch das membrangebundene pro-TNF- α konstitutiv gebildet [237]. Bei einer Aktivierung der Zellen, zum Beispiel durch LPS, nahm die Oberflächendichte des pro-TNF- α zuerst ab. Anschließend konnte eine verstärkte Expression auf der Zelloberfläche beobachtet werden, die weit über die Anfangskonzentration hinausging. Wahrscheinlich wurde durch den sofort nach der Stimulation einsetzenden Sheddingprozess die Proteindichte auf der Oberfläche verringert. Nachdem die Zellen vermehrt pro-TNF- α synthetisiert und auf der Zelloberfläche exprimiert hatten, stieg die Proteindichte wieder an. Im Gegensatz dazu nahm die Konzentration des löslichen TNF- α bis zu einem Maximalwert nach zwei Stunden zu, um dann langsam abzunehmen. Eine verstärkte Expression des TNF- α ist folglich nicht gleichbedeutend mit einer erhöhten Freisetzung des Proteins. Eine mögliche Erklärung für diesen gegenläufigen Mechanismus könnte das Vorhandensein eines negativen *feed-back*-Mechanismus des TNF- α -abspaltenden Enzyms TACE sein [259]. Es konnte beobachtet werden, dass nach Aktivierung von THP-1 und Jurkat Zellen mit PMA eine Herabregulation des membranständigen TACE stattfand. Worin diese Gegenregulation begründet liegt, konnte jedoch nicht geklärt werden.

Für CD163 wurde ebenfalls ein zeitabhängiges Expressionsprofil ermittelt, bei dem es nach Stimulation von Macrophagen mit Prednilyden innerhalb von zwölf Stunden zu einem raschen Anstieg der Antigendichte kam [62]. Nach weiteren zwölf Stunden nahm die Anzahl CD163-positiver Zellen wieder ab, blieb aber über mehrere Tage auf einem Niveau oberhalb der basalen Expressionsrate der Ausgangszellen. Högger et al. konnten durch Beobachtung der mRNA-Expression an fluticasonpropionatstimulierten Zellen über einen Zeitraum von 24 Stunden bestätigen, dass nach Glucocorticoidstimulation innerhalb weniger Stunden eine starke Zunahme der mRNA-Expression des CD163 festzustellen war [36]. Nach einem Maximum bei etwa acht Stunden nahm diese Expressionsrate bis zur Beendigung der Messung wieder ab.

CsA bewirkte in der Untersuchung eine gegenüber den unstimulierten Zellen verminderte Freisetzung von TNF- α (Abb. 42). Da es sich bei CsA um eine Verbindung handelt, die

suppressiv auf das Immunsystem wirkt, erscheint es logisch, dass die Bildung eines proinflammatorischen Faktors unterdrückt wird. Von Garcia et al. wurde bereits mehrfach über eine Hemmung der TNF- α -Freisetzung aus Zellen monocytären Ursprungs nach Behandlung mit CsA berichtet [260, 261]. Obwohl die immunmodulatorische Wirkung des CsA vor allem in einer Hemmung der IL-2-Synthese von T-Helferzellen besteht, waren die Ursachen einer erfolgreichen Therapie mit CsA bei einigen Entzündungen unklar. Beispielsweise spielen die T-Helferzellen bei der idiopathischen pulmonalen Fibrose nur eine untergeordnete Rolle. Trotzdem konnte diese Erkrankung effektiv mit CsA behandelt werden. Darum vermuteten Garcia et al., dass CsA antiinflammatorische Wirkungen auch auf andere Zellen ausübt [260]. Bei der Untersuchung von alveolären Macrophagen verschiedener Patienten mit Lungenerkrankungen zeigte sich, dass CsA in der Lage war, die Sekretion mehrerer proinflammatorischer Cytokine, unter anderem TNF- α , von aktivierten Zellen signifikant zu hemmen. Neben CsA konnte auch für andere Immunmodulatoren diese inhibierende Wirkung auf die Cytokinproduktion gezeigt werden. Im Vergleich von CsA, FK506, Methotrexat und Dexamethason zeigten alle Verbindungen *in vitro* einen vergleichbar potenten inhibitorischen Effekt auf die Freisetzung von TNF- α und anderen Cytokinen aus aktivierten Monocyten [262]. Somit scheint die Suppression der Freisetzung von TNF- α ein allgemein gültiger Vorgang bei der Behandlung von entzündlichen Erkrankungen mit Immunmodulatoren zu sein.

Ebenfalls suppressiv auf die TNF- α -Freisetzung der Zellen wirkte der NO-Donator SNAP (Abb. 42). Damit konnte durch NO ein antiinflammatorischer Effekt ausgeübt werden. In guter Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen konnte von Eigler et al. sowohl durch exogenes als auch durch endogenes NO eine Suppression der TNF- α -Synthese beobachtet werden [263]. Als möglichen Mechanismus stellten Furuku et al. die Hypothese auf, dass NO möglicherweise den Transkriptionsfaktor NF- κ B hemmt, der in die Induktion von TNF- α involviert ist [264]. Da in den eigenen Untersuchungen diese Suppression bereits nach einem Zeitraum von zwei Stunden beobachtet wurde, muss ein anderer von einer Transkription unabhängiger Mechanismus für diesen Vorgang verantwortlich sein.

Im Gegensatz zur Hemmung der NO-induzierten Freisetzung wurde auch von stimulierenden Einflüssen auf die TNF- α -Freisetzung durch NO berichtet. Lander et al. fanden nach Inkubation von peripheren mononukleären Blutzellen sowohl mit den NO-Donatoren SNAP und Nitroprussid-Natrium als auch nach Begasung der Zellen mit NO-Gas einen signifikanten Anstieg an TNF- α im Überstand der Zellen [265]. Allerdings betrug die

Inkubationszeit dieser Zellen mit den NO-produzierenden Reagenzien jeweils 72 Stunden. Somit könnten möglicherweise Effekte auf der Proteinebene zum Tragen gekommen sein, die in den eigenen Versuchen wegen der kürzeren Inkubationszeit keinen Einfluss hatten. Von Van Dervort et al. konnte sogar ein zellartabhängiger NO-Einfluss ermittelt werden [265]. Während in aktivierten humanen Neutrophilen durch SNAP eine Freisetzung von TNF- α induziert werden konnte, ließ sich unter denselben Bedingungen kein Effekt bei humanen Monocyten beobachten. Die Begründung für diese unterschiedlichen Ergebnisse auf die Freisetzung von TNF- α durch NO liegt wahrscheinlich in den verschiedenen Versuchsbedingungen. Damit könnte die Wirkung stark von der Art und Dauer der NO-Stimulation, vom Aktivierungsstatus der Zellen und vor allem auch von der Zellart abhängen.

Übereinstimmende Erkenntnisse liegen für den Einfluss von H₂O₂ auf die Produktion von TNF- α vor. Oxidativer Stress, induziert durch die Stimulation der Monocyten mit H₂O₂, zeigte zwar nur eine mäßige, aber deutliche Freisetzung von TNF- α (Abb. 42). Sowohl oxidativer Stress als auch TNF- α besitzen ein proinflammatorisches Potential. Eine direkte Verbindung zwischen ROS und der Generierung von TNF- α konnte bereits von Volk et al. beobachtet werden [266]. In Untersuchungen an humanen Monocyten wurden unter dem Einfluss von ROS über einen calciumabhängigen Weg hohe TNF- α -Konzentrationen freigesetzt. Wahrscheinlich können ROS sogar direkt das spaltende Enzym TACE aktivieren [110]. Somit besteht eine wechselseitige Beziehung zwischen TNF- α und ROS, da nicht nur ROS zur Freisetzung von TNF- α führen können, sondern humane Zellen auch durch TNF- α zur Produktion von ROS aktiviert werden [267, 268].

Das 8-iso PGF_{2 α} zeigte von allen neu untersuchten Substanzen die stärkste stimulierende Wirkung auf die Freisetzung von TNF- α (Abb. 42). Damit konnte durch 8-iso PGF_{2 α} sowohl stimulierend auf die Abspaltung von CD163 (Allgemeiner Teil, 1.2.2.3) als auch auf die Abspaltung von TNF- α eingewirkt werden. Das isomere PGF_{2 α} zeigte im Vergleich zum Isoprostaglandin eine geringere Wirksamkeit auf die TNF- α -Freisetzung, war aber effektiver als die anderen untersuchten Substanzen (Abb. 42). Da es die Abspaltung des CD163 nicht beeinflusste, wies PGF_{2 α} Unterschiede in der Abspaltung des CD163 und TNF- α auf (Allgemeiner Teil, 1.2.2.3).

Für eine stimulierende Wirkung von Isoprostaglandinen auf die Freisetzung von Cytokinen liegen bisher keine Erkenntnisse vor. Dagegen konnte bereits früher von Renz et al. eine stimulierende Wirkung auf die Freisetzung von TNF- α durch PGF_{2 α} und in noch

stärkerem Ausmaß durch PGE₂ festgestellt werden [269]. Nach einer Inkubation von Macrophagen aus Ratten mit PGF_{2α} über einen Zeitraum von 20 Stunden wurde für niedrige Konzentrationen des Prostaglandins eine verstärkte TNF-α-Freisetzung ermittelt. PGE₂ zeigte in den Untersuchungen einen biphasischen Verlauf. Bei niedrigen Konzentrationen war es in der Induktion der TNF-α-Freisetzung effektiver als PGF_{2α}. Bei erhöhten Konzentrationen von > 10 ng/ml zeigte sich ein inverser Effekt und zwar eine ausgeprägte Suppression der TNF-α-Freisetzung [269]. Diese suppressive Wirkung des PGE₂ konnte ebenfalls von Kunkel et al. beobachtet werden [270]. Unterschiede zur TNF-α-Freisetzung von prostaglandinbehandelten Zellen zeigten sich allerdings erst ab einer Prostaglandinkonzentration von 10⁻⁸ M. Bei niedrigeren Konzentrationen war kein signifikanter Unterschied zu LPS-stimulierten Zellen und somit eine TNF-α-Freisetzung zu erkennen. In den eigenen Versuchen wurden sowohl das Prostaglandin als auch das Isoprostaglandin in einer Konzentration von 10⁻⁹ M eingesetzt, die nach Kunkel et al. bereits in den Bereich unterhalb der hemmenden Wirkung auf die TNF-α-Freisetzung fällt.

Eine direkte Wirkung des PGF_{2α} auf die Expression von TNF-α wurde von Fujino und Regan an humanen embryonalen Milzzellen (HEK-293) gezeigt [271]. Nach Transfektion der Zellen mit einem TNF-Luciferase Reporter gen konnte nach Stimulation der Zellen mit PGF_{2α} eine deutliche Zunahme der Luciferaseaktivität und damit eine verstärkte Expression des Cytokins beobachtet werden. Interessanterweise zeigte sich in diesen Versuchen eine starke Wirkungsabhängigkeit vom jeweiligen Prostanoid-Rezeptor des PGF_{2α}. Für PGF_{2α} existieren zwei Isoformen des Prostanoid-Rezeptors, FP_A und FP_B. In Zellen, die FP_B exprimiert hatten, konnte eine doppelt so hohe Expressionsrate an TNF-α ermittelt werden als in Zellen, die mit FP_A ausgestattet waren [271]. Über die Rezeptoren der Isoprostaglandine ist bisher wenig bekannt. Möglicherweise werden die Wirkungen der Isoprostaglandine über Prostanoid-Rezeptoren ausgeübt. Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass Isoprostaglandine eigene Rezeptoren besitzen [170]. Ein Grund für die Differenzen in den Wirkungen des 8-iso PGF_{2α} auf CD163 und TNF-α könnte in der Bindung des Isoprostaglandins an unterschiedliche Rezeptoren liegen. Die Identifizierung von entsprechenden Rezeptoren sowie die Aktivierung von Signalwegen durch Isoprostaglandine bedürfen somit weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Shedding von CD163 und TNF-α Gemeinsamkeiten, aber auch viele Unterschiede aufwies. Auf Grund der zum Teil unterschiedlichen Wirkungen der untersuchten sheddinginduzierenden Verbindungen

hinsichtlich ihrer Effizienz zur Abspaltung der beiden Proteine (Tab. 5) kann davon ausgegangen werden, dass unterschiedliche Signalwege und/oder Enzyme beteiligt sind. Es ist unklar, wie die Substrateigenschaften für das jeweilige Enzym aussehen. Verschiedene Metalloproteinasen können mit demselben Substrat reagieren und andererseits kann eine Metalloproteinasen unterschiedliche Substrate umsetzen [92].

Tab. 5: Vergleich der Induktion des Shedding von CD163 und TNF- α . Legende: ++ starke Induktion, + mäßige Induktion, - kein Einfluss auf die Induktion. Bei Angabe der Literatur stammen die Ergebnisse nicht aus den eigenen Untersuchungen.

Reagenz	Shedding von CD163	Shedding von TNF- α
LPS	++ [76]	++ [257]
PMA	++ [41]	++ [257, 258]
H ₂ O ₂	++	+
SNAP	+	-
8-iso PGF _{2α}	++	++
PGF _{2α}	-	+
CsA	++	-

Basierend auf der Annahme, dass die Aktivierung einer Sheddase in einem Zelltyp auf denselben aktivierenden Signalweg zurückzuführen ist, kann davon ausgegangen werden, dass vor allem das Shedding durch ROS, PGF_{2 α} und CsA von verschiedenen Enzymen bewirkt wurde. Da es sich bei sCD163 um eine antiinflammatorische Verbindung handelt, während TNF- α proinflammatorische Eigenschaften besitzt, erschien die Aktivierung unterschiedlicher Enzyme zur Generation der beiden Faktoren durchaus logisch.

Für 8-iso PGF_{2 α} konnte eine weitere Funktion als potentiell stimulierend auf die Freisetzung von TNF- α wirkende Verbindung definiert werden. Hierfür bleibt zu klären, ob ebenso wie bei den Prostaglandinen dieser Vorgang konzentrationsabhängig ist und der Mechanismus möglicherweise bei höheren Konzentrationen umgekehrt wird. Wie für die biphasische Wirkung des Prostaglandin E₂ gezeigt [269], könnten auch für das 8-iso PGF_{2 α} intrazelluläre Rückkopplungsmechanismen vorliegen, die konzentrationsabhängig zur Abschwächung oder Verstärkung einer Wirkung führen. So könnte möglicherweise auch eine Protektion der Zellen vor TNF- α induzierten pathologischen Wirkungen erfolgen.

2 sCD163 und 8-iso Prostaglandin F_{2α} in bronchoalveolärer Lavage Flüssigkeit (BALF) von Patienten mit Cystischer Fibrose

Wie in der Literatur beschrieben [41, 76, 105] und in den eigenen Untersuchungen zum Shedding von CD163 dargestellt (Allgemeiner Teil, 1.2.1.4.2, 1.2.1.5.1, 1.2.2.3), wird die Abspaltung des CD163 von der Monocyten-/Macrophagenoberfläche durch inflammatorische Stimulanzen induziert. Aus dieser Induktion resultieren erhöhte Konzentrationen des selbst antiinflammatorisch wirksamen sCD163 im Plasma von Patienten mit entzündlichen Erkrankungen [71-73].

Von Møller et al. konnte für Patienten mit Infektionskrankheiten und myelotischer Leukämie gezeigt werden, dass sCD163 als Marker für die Monocyten-/Macrophagenaktivität bei diesen chronischen Erkrankungen herangezogen werden kann [42]. Die im Plasma nachgewiesenen sCD163-Konzentrationen korrelierten bei diesen Patienten direkt mit der Leukocytenstimulation und -proliferation [42]. Auch bei Patienten mit Morbus Gaucher, einer erblich bedingten lysosomalen Speicherkrankheit, die durch das Fehlen des Enzyms Glucocerebrosidase gekennzeichnet ist, konnten Møller et al. eine direkte Korrelation der Plasmakonzentration von sCD163 mit der Krankheitsintensität ableiten [272].

Da CD163 ausschließlich auf Monocyten/Macrophagen exprimiert wird, wurde von Schaer et al. sCD163 als spezifischer Marker für das so genannte *Reactive macrophage activation syndrome* etabliert [273]. Für die erfolgreiche Behandlung dieses Syndroms sind die schnelle Diagnose einer übersteigerten Macrophagenaktivität und die frühe Initialisierung einer daran angepassten Immunsuppression essentiell. Basierend auf hohen Konzentrationen des sCD163 bei Patienten mit Arteriosklerose konnte ein direkter Zusammenhang der sCD163-Konzentration mit dem Schweregrad der Arteriosklerose bestimmt werden [274]. sCD163 wird dabei als Biomarker einer neuen Klasse angesehen, da die Plasmakonzentrationen unabhängig von traditionellen Risikofaktoren der Arteriosklerose, wie Alter, Geschlecht, bestehende Erkrankungen und Konzentrationen des C-reaktiven Proteins, waren.

Neben der antiinflammatorischen Funktion des sCD163 auf aktivierte T-Lymphocyten kann das Protein somit auch zu diagnostischen Zwecken herangezogen werden. Für chronisch-entzündliche Erkrankungen konnte in verschiedenen Studien durch Ermittlung der

sCD163-Konzentration im Plasma der Schweregrad einer Entzündung abgeschätzt werden [272-275]).

Eine Krankheit, die durch ausgeprägte chronisch-inflammatorische Vorgänge in der Lunge charakterisiert ist und zur Degeneration der Atemwege führt, ist die Cystische Fibrose. Bisher untersuchte Marker der Entzündungen bei dieser Krankheit sind die proinflammatorischen Cytokine IL-1, IL-8 und proteolytische Enzyme, wie die aus Neutrophilen freigesetzte Elastase [276].

2.1 Cystische Fibrose

Die Cystische Fibrose (CF; Synonym: Mukoviszidose) gehört zu den häufigsten genetischen Krankheiten. Auf Grund einer Fehlfunktion sämtlicher Schleimdrüsen in den Bronchien, der Bauchspeicheldrüse, des Dünndarms, des Samenleiters sowie der Speichel- und Schweißdrüsen kommt es zur Produktion eines Schleims mit sehr hoher Viskosität [277].

Ursache dieser Fehlfunktion sind Punktmutationen auf dem Chromosom 7, aus denen ein defektes oder inadäquat gesteuertes zellmembranständiges Regulatorprotein resultiert. Dieses Regulatorprotein wird *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) genannt und fungiert als ein zyklischer Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) -abhängiger Chlorid-Kanal [278]. Ein Defekt des CFTR bewirkt, dass bei erhöhten cAMP-Konzentrationen in den Epithelzellen die Öffnung der Chlorid-Kanäle gestört ist, so dass es zu einer verminderten Abgabe von Chlorid in das Lumen und einer vermehrten Natriumaufnahme in die Epithelzellen kommt. Der Salzgehalt und damit auch der Wasseranteil in exokrinen Drüsenzellen werden erniedrigt, so dass ein pathologisch zäher Schleim sezerniert wird, der vor allem die Bronchiolen und Pankreasgänge blockiert.

Der klinische Verlauf der Cystischen Fibrose ist je nach dem zugrunde liegenden Gendefekt unterschiedlich. Leitsymptom ist der so genannte Mekoniumileus bei Neugeborenen, ein auf Grund des zähen Darminhaltes auftretender Darmverschluss [279]. Später bildet sich in den meisten Fällen eine exokrine und durch einen fibrotischen Umbau des Pankreas bedingte endokrine Pankreasinsuffizienz aus.

Darüber hinaus kommt es zu obstruktiver Bronchitis und unter ungünstigsten Umständen zur Atelektase, dem vollständigen Verschluss eines bestimmten Bronchus, wodurch dessen Luftzufuhr vollkommen unterbunden wird. Als Folge dieses verminderten oder fehlenden

Gasaustausches treten Pneumonien, Abszesse, Fibrosen und Emphyse auf. Die so genannte mukoziliäre Clearance ist bereits zu Beginn der Krankheit vermindert und nimmt stetig ab. Des Weiteren manifestieren sich zumeist chronische Entzündungen der Lunge. Der zähe Schleim setzt sich an der Innenseite der Bronchialwände fest und stellt damit einen optimalen Nährboden für Krankheitserreger und Bakterien dar. Die vorherrschenden Keime sind *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenza* [280].

Die bakteriellen Infektionen lösen Immunreaktionen im Körper aus, die durch erhöhte Konzentrationen an proinflammatorischen Cytokinen, wie TNF- α , IL-6, IL-8 und Leukotrien B₄, und die Einwanderung einer großen Zahl von Neutrophilen gekennzeichnet sind [281, 282]. Einwandernde Neutrophile setzen neben proteolytischen Enzymen, wie Elastase [283], bei ihrer Degenerierung große Mengen an DNA frei. Zusammen mit proinflammatorisch wirkender DNA aus abgestorbenen Bakterien trägt diese DNA zu einer weiteren Viskositätserhöhung des bereits sehr zähflüssigen Schleims bei [284] (Abb. 43).

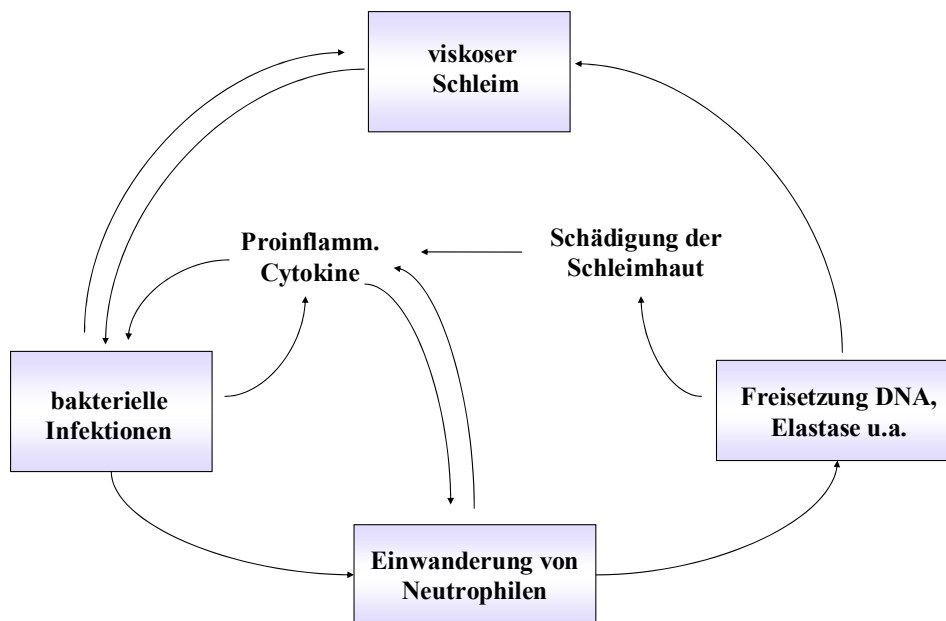


Abb. 43: Modell der pathophysiologischen Mechanismen im Respirationstrakt bei Cystischer Fibrose.

Eine kausale Behandlung der CF und damit eine Heilung dieser Krankheit ist bislang nicht möglich. Therapiert werden lediglich die einzelnen Symptome. Neben der Therapie der gastrointestinalen Probleme mittels Enzymsubstitution und hochkalorischer Diät steht die Behandlung der pulmonalen Schleimlösung im Vordergrund. Diese wird vor allem mechanisch über eine Physiotherapie in Kombination mit der Inhalation von sterilem Wasser oder 0,9 %iger Kochsalzlösung betrieben [285]. Zur Verhinderung von Bronchospasmen und

zur weiteren Verflüssigung des Schleims werden der Inhalationslösung β_2 -Sympathomimetika und/oder Mukolytika zugesetzt. Die bakteriellen Entzündungen werden mit Antibiotika behandelt.

Ein neuerer Therapieansatz, der vor allem auf die massive DNA-Freisetzung von eingewanderten Neutrophilen abzielt, ist die Inhalation mit rekombinanter humaner Desoxyribonuclease I (rhDNase I). Im eitrigen Sputum von Patienten mit Cystischer Fibrose wurden hohe Konzentrationen von 3 bis 14 mg/ml DNA gefunden [286]. rhDNase I ist in der Lage, DNA hydrolytisch zu spalten und soll auf diese Weise zu einer Verflüssigung des hochviskosen Schleims bei Patienten mit Cystischer Fibrose beitragen.

2.2 Rekombinante humane DNase I (Dornase alpha) in der Therapie der Cystischen Fibrose

Bei gesunden Personen baut die humane Desoxyribonuclease I (DNase I), eine calcium- und magnesiumabhängige Endonuclease, extrazellulär vorliegende DNA ab. Da extrazelluläre DNA in sehr großem Ausmaß in der Lunge von Patienten mit CF vorhanden ist, wurde eine humane DNase I (rhDNase I) mit dem generischen Namen Dornase alpha rekombinant hergestellt [286]. In mehreren klinischen Studien konnte ein positiver Effekt der rhDNase I auf die Lungenfunktion und das Allgemeinbefinden der Patienten mit CF bestätigt werden [287, 288]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit rhDNase I zu einer Verminderung von matrixdegradierenden Enzymen, wie MMP-8 und MMP-9 [289], und zu einer Reduktion der DNA-Konzentration im Lungensekret beiträgt [290].

rhDNase I ist unter dem Namen Pulmozyme[®] im Handel. Zur direkten lokalen Anwendung wird das Präparat inhalativ angewendet [286]. Die Dosierung ist unabhängig vom Alter der Patienten mit einer einmaligen täglichen Inhalation von 2,5 mg rhDNase I [291].

2.2.1 Einfluss von rhDNase I auf die Entzündung bei Cystischer Fibrose

Zur Untersuchung der Langzeitwirkung einer Therapie mit rhDNase I auf Entzündungsparameter bei Patienten mit CF wurde eine breit angelegte multizentrische Studie

durchgeführt (*Bronchoalveolar lavage for evaluation of anti-inflammatory treatment (BEAT study)*) [292]. Das Patientenkollektiv bestand aus insgesamt 105 Patienten im Alter von 5 bis 37 Jahren, wobei der Großteil (95 Patienten) jünger als 15 Jahre war. Für alle Probanden war die Cystische Fibrose über wiederholte Untersuchungen der Chlorid-Konzentration im Schweiß (Chlorid-Konzentrationen > 60 mmol/l) und/oder Analyse der Mutation des CFTR sicher diagnostiziert. Ein wichtiges Kriterium für die Teilnehmer der Studie war, dass innerhalb der letzten sechs Wochen vor Beginn der Studie keine akute Infektion des Respirationstraktes aufgetreten war. Die Patienten wurden in drei Gruppen eingeteilt. Die ersten beiden Gruppen wurden randomisiert und die Teilnehmer erhielten über drei Jahre täglich 2,5 mg rhDNase I (Interventionsgruppe), respektive ein Placebo (Kontrollgruppe 1) (Tab. 6).

Tab. 6: Studiendesign der BEAT-Studie zur Untersuchung der Langzeitwirkung von rhDNase I (Pulmozyme®) auf die Entzündungen bei Patienten mit Cystischer Fibrose (nach Paul et al. [292]).

Dauer:	3 Jahre	
Patienten:	Interventionsgruppe (46 Patienten)	Inhalation 2,5 mg/d rhDNase I
	Kontrollgruppe 1 (39 Patienten)	Placebo
	Kontrollgruppe 2 (20 Patienten)	-
Probennahme:	über bronchoalveoläre Lavage (BAL)	
	1. BAL: 0 Monate (Basalwert)	
	2. BAL: nach 18 Monaten	
	3. BAL: nach 36 Monaten	
Parameter:	Neutrophile, IL-8, Elastase	

Die dritte Gruppe, in die Patienten mit einem niedrigen Anteil an Neutrophilen aufgenommen wurden, wurde unverblindet als weitere Kontrolle gewertet (Kontrollgruppe 2).

Die Probennahme erfolgte zu drei verschiedenen Zeitpunkten (Tab. 6), zu Beginn, nach einer Dauer von 18 Monaten und am Ende der Studie mittels bronchoalveolärer Lavage (BAL) [293]. Bei der BAL handelt es sich um ein diagnostisches Verfahren zur Untersuchung der Lunge. Nach Gabe eines Sedativums wird unter örtlicher Betäubung ein Bronchoskop in die Luftröhre des Patienten eingeführt. Über das Bronchoskop wurden dreimal 1 ml/kg Körpergewicht einer 0,9 %igen Kochsalzlösung instilliert und damit die Lunge gespült. Anschließend wird die Spülflüssigkeit wieder abgesaugt. Die Spülflüssigkeit

(*Bronchoalveolar lavage fluid*, BALF) enthält Bakterien und Zellen, deren Anteile und Art den Zustand der Lunge widerspiegeln.

Als Ergebnis der BEAT-Studie wurde hinsichtlich der Entzündungsparameter eine Stabilisierung der Entzündungen in der Lunge bei den mit rhDNase I behandelten Patienten ermittelt. Anhand der Zahl an Neutrophilen, der Konzentration an IL-8 und der Aktivität der Elastase zeigte sich keine Verbesserung der Entzündung, es fand jedoch auch keine Verschlechterung des inflammatorischen Zustandes der Lunge statt. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Patienten der Kontrollgruppe I eine kontinuierliche Ausweitung der Entzündung. Die Behandlung der Cystischen Fibrose mit rhDNase I erbrachte somit einen protektiven Effekt auf die Entzündungsparameter und trug zu einer Verbesserung der Lungenfunktion der Patienten bei [293].

2.3 Untersuchung von sCD163 und 8-iso Prostaglandin F_{2α} in bronchoalveolärer Lavage Flüssigkeit (BALF) von Patienten mit Cystischer Fibrose

Für sCD163 konnte in den Spezimen Plasma [42, 275] und Synovialflüssigkeit [71] gezeigt werden, dass es einen geeigneten Marker für Entzündungen im Körper darstellt. Keine Befunde lagen dagegen über Konzentrationen an sCD163 in extravasalen Räumen vor.

Patienten mit Cystischer Fibrose weisen erhöhte Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und ein eingeschränktes antioxidatives Verteidigungssystem auf [294, 295]. Die Hauptquelle dieser ROS sind aktivierte Neutrophile und lebende Bakterien. Im Entzündungsgeschehen freigesetzt tragen ROS neben proteolytischen Enzymen zur Zellzerstörung in der Lunge bei [13]. Über Biomarker, wie 8-iso PGF_{2α}, konnten hohe ROS-Konzentrationen auf Grund von oxidativem Stress bei Patienten mit CF in Plasma [296, 297], Urin [298] und Atemkondensat [299] nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung, ob sCD163 als biologischer Marker für chronische Entzündungen bei Cystischer Fibrose herangezogen werden kann, wurde die Konzentration des sCD163 in bronchoalveolärer Lavage von Patienten aus der BEAT-Studie (Allgemeiner Teil, 2.2.1) bestimmt. Zur Analyse standen Patientenproben aus zwei der an der Studie beteiligten Studienzentren zur Verfügung (Studienzentrum A und B). Die BALF-Proben stammten jeweils aus der Interventionsgruppe und aus der Kontrollgruppe 1 (Tab. 6).

Wie bereits in den Untersuchungen zum Shedding von CD163 ermittelt werden konnte, besteht zwischen sCD163 und 8-iso PGF_{2α} eine direkte Verbindung durch die induzierende Wirkung des 8-iso PGF_{2α} auf das Shedding von der Zelloberfläche und damit auf die Generierung des antiinflammatorischen sCD163 (Allgemeiner Teil, 1.2.2.3).

Da 8-iso PGF_{2α} als endogener Marker für oxidativen Stress und damit als Marker für Entzündungen in verschiedenen biologischen Flüssigkeiten bereits etabliert war, bot sich eine Gelegenheit, die Konzentrationen eines antiinflammatorischen und eines inflammatorischen Markers unter Therapie mit rhDNase I parallel zu beobachten.

Bisher wurden keine Untersuchungen zum Einfluss antiinflammatorischer Medikationen auf die endogene Konzentration von sCD163 durchgeführt. Es ist unklar, ob und in welcher Weise Konzentrationsänderungen einen Therapieerfolg anzeigen.

Untersuchungen einer Korrelation von 8-iso PGF_{2α} und antiinflammatorischer Behandlung von Patienten mit Glucocorticoiden zeigten bislang keine eindeutigen Ergebnisse. Montuschi et al. fanden im Atemkondensat von Patienten mit CF keinen Unterschied in den Isoprostaglandinkonzentrationen zwischen Patienten, die mit einem Glucocorticoid behandelt worden waren, und unbehandelten Patienten [299]. Demgegenüber konnte bei Patienten mit einem Acetylsalicylsäure-induzierten Asthma, einem klinischen Syndrom, bei dem es nach Applikation von Acetylsalicylsäuren oder einem anderen nichtsteroidalen antiinflammatorischen Wirkstoff zu akuten Asthma-Anfällen kommt, eine Abnahme der Isoprostaglandinkonzentration im Atemkondensat bei den glucocorticoidbehandelten Patienten ermittelt werden [300].

Mittels quantitativer Bestimmung der Konzentrationen an sCD163 und 8-iso PGF_{2α} in den BALF-Proben von Patienten mit Cystischer Fibrose sollte ein Vergleich zwischen einer antiinflammatorisch wirksamen Verbindung und einem Marker proinflammatorischen Ursprungs unter dem Einfluss einer antiinflammatorischen Therapie angestellt werden.

2.3.1 Konzentrationsbestimmung von sCD163 und 8-iso PGF_{2α} in bronchoalveolärer Lavage Flüssigkeit (BALF)

Zur Bestimmung der Konzentration von sCD163 und 8-iso PGF_{2α} in BALF von Patienten mit CF standen aus der BEAT-Studiengruppe die BALF-Proben von insgesamt 13 Patienten zur Verfügung (Tab. 7). Sieben dieser Patienten stammten aus der Interventionsgruppe und

wurden folglich über einen Zeitraum von drei Jahren mit rhDNase I behandelt. Die Unterteilung dieser Patienten nach dem jeweiligen Studienzentrum, in dem die Behandlung und Probennahme erfolgte, ergab eine Patientenzahl von drei aus dem Studienzentrum A und vier aus dem Studienzentrum B.

Die weiteren sechs Patienten waren der Kontrollgruppe I zugeordnet, deren Teilnehmer über den gesamten Studienzeitraum ein Placebo erhielten. Jeweils drei Patienten waren dem Studienzentrum A, respektive B, zugehörig.

Tab. 7: Zuordnung der untersuchten BALF-Proben der Patienten mit Cystischer Fibrose nach den jeweiligen Studienzentren A und B und den Behandlungsgruppen.

	Studienzentrum		gesamt
	A	B	
Interventionsgruppe (rhDNase I)	3	4	7
Kontrollgruppe I (Kontrolle)	3	3	6
gesamt	6	7	13

Nicht für jeden Patienten des Studienzentrums B lag eine Probe der 3. BAL vor. Für einen Patienten der Interventionsgruppe und alle Patienten der Kontrollgruppe konnte ausschließlich die basale Konzentration (1. BAL) und die Konzentration nach 18 Monaten (2. BAL) ausgewertet werden. Zur Vereinheitlichung des Untersuchungszeitraums und der Resultate wurde, auf Grund des Fehlens der Proben nach 36 Monaten (3. BAL) von den meisten Patienten des Studienzentrums B, ausschließlich die 1. BAL und die BALF nach 18 Monaten (2. BAL) für die Bestimmung der Konzentrationsänderungen beider Parameter herangezogen. Die 3. BAL wurde von der Auswertung vollständig ausgeschlossen, da die Ergebnisse wegen der geringeren Probenzahl stark verzerrt werden würden.

Die Bestimmung beider Parameter erfolgte mittels spezifischem ELISA auf sCD163 (Experimenteller Teil, 3.4), respektive auf 8-iso PGF_{2α} (Experimenteller Teil, 3.81.1). Da zwischen den einzelnen Patienten zum Teil große interindividuelle Unterschiede der Konzentrationen zu erkennen waren (Tabellarischer Anhang, 2), wurden zur besseren Vergleichbarkeit der Proben die Konzentrationen der 1. BAL auf einen Wert von 100 % normalisiert. Die 1. BAL wurde vor Beginn der Therapie mit rhDNase I, respektive dem Placebo, durchgeführt und repräsentiert die basalen Ausgangskonzentrationen der beiden Parameter. Die weiteren Proben wurden prozentual auf diese Ausgangswerte bezogen. Zur

Darstellung der Konzentrationsänderungen an sCD163 und 8-iso PGF_{2α} in den BALF-Proben der Patienten wurde für jede Behandlungsgruppe zu den jeweiligen Entnahmezeitpunkten der Mittelwert der prozentualen Konzentrationen berechnet.

In den BALF-Proben der mit rhDNase I behandelten Patienten konnte über den Zeitraum von 18 Monaten im Mittel keine Änderung der sCD163-Konzentration beobachtet werden (Abb. 44, rhDNase I).

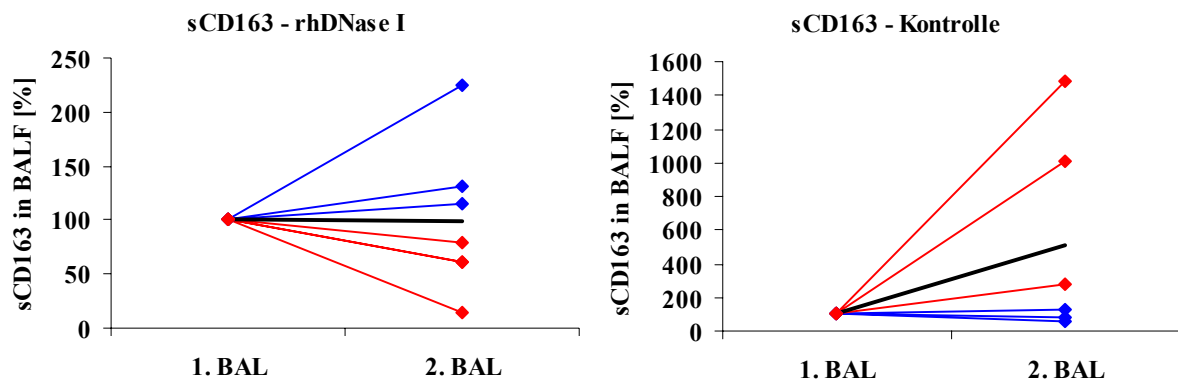


Abb. 44: Konzentration von sCD163 in BALF von Patienten mit Cystischer Fibrose der beiden Studienzentren A (blau) und B (rot). Die Analyse erfolgte zu den Zeitpunkten 0 Monate (1. BAL, Basiswert) und nach 18 Monaten (2. BAL). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte [%] bezogen auf die 1. BAL (100 %) aus drei Messungen. **rhDNase I:** Patienten wurden über die gesamte Studiendauer mit rhDNase I behandelt. Das Diagramm repräsentiert die Ergebnisse von insgesamt 7 Patienten. **Kontrolle:** Patienten erhielten über die gesamte Studiendauer ein Placebo. Das Diagramm repräsentiert die Ergebnisse von insgesamt 6 Patienten. Die schwarzen Linien stellen die Mittelwerte der Proben aller Patienten der jeweiligen Behandlungsgruppe dar.

Die mittlere Konzentration an sCD163 betrug bei der 2. BAL 98,2 % und war damit von der Ausgangskonzentration (100 %) kaum verschieden. Für die einzelnen Patienten dieser Gruppe ergab sich für die Konzentrationsänderungen an sCD163 ein sehr heterogenes Bild. Im Maximum konnte für einen Patienten eine sCD163-Zunahme von $224,0 \pm 10,7$ % ermittelt werden, während die niedrigste Konzentration bei einem Patienten lediglich $14,3 \pm 5,2$ % betrug. Von den sieben Patienten dieser Gruppe wiesen vier Patienten eine leichte Abnahme der sCD163-Konzentrationen in der BALF der 2. BAL im Vergleich zum Basiswert auf. Für drei Patienten konnten erhöhte Konzentrationen detektiert werden. Eine größere Homogenität der Proben untereinander konnte bei der Betrachtung der Konzentrationsänderungen an sCD163 für die Patienten des einen Studienzentrums beobachtet werden. Alle Patienten, deren sCD163-Konzentration innerhalb der 18 Monate unter rhDNase I-Therapie eine Zunahme aufwiesen, stammten aus dem Patientenkollektiv des Studienzentrums A (Abb. 44, rhDNase I blau). Für die Patienten des Studienzentrums B

dagegen wurde für den gleichen Behandlungszeitraum eine Abnahme der sCD163-Konzentration ermittelt (Abb. 44, rhDNase I rot).

Im Vergleich zur Interventionsgruppe konnte in der Kontrollgruppe im Mittel ein leichter Anstieg der sCD163-Konzentration innerhalb von 18 Monaten beobachtet werden (Abb. 44, Kontrolle). Auf Grund der starken interindividuellen Unterschiede der Konzentrationen in der BALF der 2. BAL war jedoch zu erkennen, dass für die meisten der Patienten keine ausgeprägten Konzentrationsänderungen erfolgten. Der mittlere Anstieg der sCD163-Konzentration für dieses Patientenkollektiv basierte hauptsächlich auf extremen Konzentrationszunahmen in der BALF von zwei Patienten. Mit Werten von $1006,3 \pm 212,5 \%$ und $1487,5 \pm 331,3 \%$ lagen die Konzentrationen bei diesen Patienten um das Zehnfache höher als die gemessenen basalen Konzentrationen. Generell wurden für die Patienten der Kontrollgruppe viel stärkere Änderungen der Konzentration an sCD163 festgestellt als für die Interventionsgruppe.

Ebenso wie bei den rhDNase I-behandelten Patienten, konnte auch in der Kontrollgruppe eine deutliche Orientierung der Konzentrationsänderungen in Abhängigkeit von den einzelnen Studienzentren festgestellt werden. Im unteren Bereich der insgesamt gemessenen sCD163-Konzentrationen der 2. BAL konzentriert wiesen die Patienten des Studienzentrums A generell eine leichte Abnahme im Vergleich zu den Ausgangskonzentrationen in der 1. BAL auf (Abb. 44, Kontrolle blau). In der BALF der Patienten aus dem Studienzentrum B dagegen konnten stark ausgeprägte Konzentrationsanstiege festgestellt werden (Abb. 44, Kontrolle rot).

Obwohl die einzelnen Behandlungsgruppen große interindividuelle Unterschiede in den Änderungen der sCD163-Konzentration zum Untersuchungszeitpunkt nach 18 Monaten aufwiesen, konnten für die einzelnen Studienzentren auffällige Trends beobachtet werden. Sowohl in der Interventionsgruppe als auch in der Kontrollgruppe wurden für die Patienten des Studienzentrums A und B jeweils inverse sCD163-Konzentrationsverläufe in der BALF ermittelt. Während die Patienten der Interventionsgruppe aus dem Studienzentrum A allgemein eine Zunahme der sCD163 unter Behandlung mit rhDNase I aufwiesen, lag eine Abnahme der Konzentration in der Kontrollgruppe dieses Studienzentrums vor. In umgekehrtem Verhältnis konnte diese Beobachtung auch im Patientenkollektiv des Studienzentrums B wiedergefunden werden. Während die Konzentrationen in der BALF der Interventionsgruppe eine Verringerung aufwiesen, stiegen invers dazu die sCD163-Konzentrationen in der Kontrollgruppe deutlich an.

8-iso PGF_{2α} als Marker der Konzentration proinflammatorischer ROS sollte direkt mit der Ausprägung der Entzündung korrelieren. Im Mittel konnten sowohl für die Patienten der Interventionsgruppe als auch für die Patienten der Kontrollgruppe keine signifikanten Änderungen der Isoprostaglandinkonzentration festgestellt werden, die einen therapeutischen Erfolg der Behandlung mit rhDNase I widerspiegeln (Abb. 45).

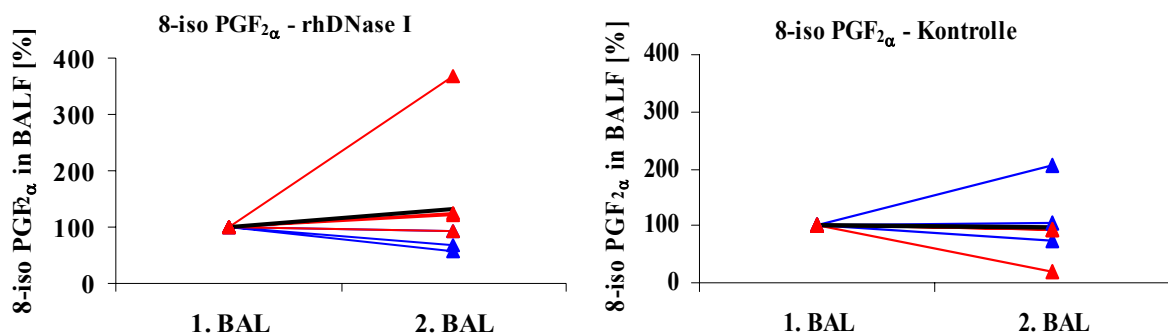


Abb. 45: Konzentration von 8-iso PGF_{2α} in BALF von Patienten mit Cystischer Fibrose der beiden Studienzentren A (blau) und B (rot). Die Analyse erfolgte zu den Zeitpunkten 0 Monate (1. BAL, Basiswert) und nach 18 Monaten (2. BAL). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte [%] bezogen auf die 1. BAL (100 %) aus drei Messungen. **rhDNase I:** Patienten wurden über die gesamte Studiendauer mit rhDNase I behandelt. Das Diagramm repräsentiert die Ergebnisse von insgesamt 7 Patienten. **Kontrolle:** Patienten erhielten über die gesamte Studiendauer ein Placebo. Das Diagramm repräsentiert die Ergebnisse von insgesamt 6 Patienten. Die schwarzen Linien stellen die Mittelwerte der Proben aller Patienten der jeweiligen Behandlungsgruppe dar.

Bei Patienten unter rhDNase I-Behandlung konnte ein mittlerer Konzentrationsanstieg von circa 32 % im Vergleich zu den basalen Ausgangskonzentrationen in der 1. BAL beobachtet werden (Abb. 45, rhDNase I), während in der Kontrollgruppe keine Konzentrationsänderungen (98,1 %) detektiert werden konnten (Abb. 45, Kontrolle).

Obwohl aus den mittleren Konzentrationen der 8-iso PGF_{2α}-Bestimmung in der BALF keine deutlichen Unterschiede in den Verläufen zwischen der 1. BAL und der 2. BAL hervortraten, waren auch für das Isoprostaglandin innerhalb der Patientengruppen und Studienzentren Tendenzen zu erkennen.

Bei einem Vergleich der Konzentrationsänderungen an 8-iso PGF_{2α} in der BALF der Patienten unter Behandlung mit rhDNase I fiel eine generelle Abnahme der 8-iso PGF_{2α}-Konzentration der Patienten des Studienzentrums A auf. Im Vergleich zum Mittelwert zeichneten sich die 8-iso PGF_{2α}-Konzentrationen dieser Patienten durch die niedrigsten Werte des für alle Patienten bestimmten Konzentrationsbereiches der 2. BAL mit Werten von 56,5 ± 19,0 % bis 94,5 ± 15,6 % (Abb. 45, rhDNase I blau) aus.

Im Verhältnis zu den Patienten des Studienzentrums A wiesen die Patienten des Studienzentrums B bei gleicher Medikation insgesamt höhere 8-iso PGF_{2α}-Konzentrationen in der BALF der 2. Lavage auf ($94,3 \pm 8,8$ % bis $369,0 \pm 161,5$ %) und die Verläufe beschrieben generell einen Konzentrationsanstieg (Abb. 45, rhDNase I rot). Ein nahezu inverses Verhalten der Konzentrationsänderungen trat bei den Patienten der jeweiligen Studienzentren der Kontrollgruppe auf (Abb. 45, Kontrolle). Während die Patienten des Studienzentrums A prinzipiell höhere 8-iso PGF_{2α}-Konzentrationen nach 18 Monaten aufwiesen als zu Beginn der Studie (Abb. 45, Kontrolle blau), konnte bei den Patienten des Studienzentrums B eine abnehmende Tendenz beobachtet werden (Abb. 45, Kontrolle rot).

Aus der Konzentrationsbestimmung des sCD163 und 8-iso PGF_{2α} in BALF von Patienten mit Cystischer Fibrose konnte festgestellt werden, dass bei nahezu allen Patienten eine inverse Korrelation der beiden Marker vorlag und dass ein gegenläufiges Konzentrationsverhalten zudem bei den Patienten eines Studienzentrums innerhalb einer Behandlungsgruppe auftrat. Basierend auf diesen inversen Verläufen konnten im Mittel sowohl für das antiinflammatorische sCD163 als auch für das inflammatorische 8-iso PGF_{2α} keine signifikanten Konzentrationsänderungen über 18 Monate unter der Therapie mit rhDNase I festgestellt werden.

2.3.2 Vergleich und Bewertung der Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung von sCD163 und 8-iso PGF_{2α} in BALF von Patienten mit CF

Obwohl viele Untersuchungen bezüglich der Verwendung von sCD163 als biologischer Marker bei inflammatorischen Erkrankungen durchgeführt wurden [272-275], fanden bisher keine Konzentrationsbestimmungen des sCD163 in BALF von Patienten mit chronischen Entzündungen statt.

Es ist bekannt, dass sCD163 antiinflammatorisch wirkt [74, 75] und hohe Konzentrationen an CD163-positiven Monocyten/Macrophagen bei chronischen Entzündungen [301], vor allem in der Spätphase [65], vorhanden sind. Daraus wurde geschlossen, dass sCD163 an der Herabregulation der Entzündung beteiligt ist.

Die Generierung des löslichen sCD163 kann durch verschiedene Stimulanzen induziert werden. Wie in den Untersuchungen der Aktivatoren des Shedding von CD163 ermittelt werden konnte (Allgemeiner Teil, 1.2.1.4.2, 1.2.2.3), ist eine Freisetzung des sCD163 sowohl

nach Aktivierung durch ROS als auch durch 8-iso PGF_{2α} möglich. Bei der CF ist das Entzündungsgeschehen neben hohen Konzentrationen an ROS und Isoprostaglandin zusätzlich durch Infektionen bakteriellen Ursprungs charakterisiert. Somit könnte in der Lunge auch eine Aktivierung der Macrophagen zur Freisetzung von sCD163 durch bakterielles Lipopolysaccharid erfolgen [76].

Bisher war unklar, in welcher Weise eine chronische Exposition mit proinflammatorischen Stimulanzen die Konzentration des sCD163 beeinflusst. Bei der Analyse von Entzündungsmarkern (Neutrophile, IL-8 und Elastase) während der Therapie mit inhalativ angewendeter rhDNase I konnte ein konstanter, sich nicht verschlechternder Entzündungszustand nachgewiesen werden [292]. Da sCD163 eine antiinflammatorisch wirksame Verbindung ist, wäre ein kontinuierlicher Konzentrationsanstieg während einer chronischen Entzündung zu erwarten. Nach Erreichen eines Maximums ist in der Heilungsphase der Entzündung ein Absinken der sCD163-Konzentration denkbar. Ein Ansprechen auf die antiinflammatorische Therapie könnte folglich zuerst mit einem Konzentrationsanstieg des antiinflammatorisch wirksamen sCD163 einhergehen, dessen Konzentration bei einer Stabilisierung der Entzündung oder einer Verbesserung des inflammatorischen Zustands konstant bleibt oder auf ein niedrigeres Konzentrationsniveau zurückfällt.

Da das Krankheitsbild der Cystischen Fibrose mit der Bildung hoher ROS-Konzentrationen in der Lunge verbunden ist [294], liegt es nahe, dass auch das endogene Oxidationsprodukt der ROS 8-iso PGF_{2α} verstärkt gebildet wird. In Übereinstimmung mit den bisher untersuchten Markern der BEAT-Studie sollte die Isoprostaglandinkonzentration direkt mit der Stärke der Entzündung korrelieren.

Generell konnten sowohl für das antiinflammatorische sCD163 als auch für das proinflammatorische 8-iso PGF_{2α} unter Berücksichtigung aller gemessenen Werte keine signifikanten Änderungen der Konzentrationen über den Untersuchungszeitraum von 18 Monaten festgestellt werden (Abb. 44, Abb. 45). Möglicherweise ist dieses Verhalten auf eine ungenügende Eignung der Marker zur Charakterisierung des Entzündungsgeschehens zurückzuführen. Unter dieser Annahme müsste davon ausgegangen werden, dass sCD163 und 8-iso PGF_{2α} unabhängig von der Entwicklung der Entzündung generiert werden.

Obwohl die Expression des CD163 auf Macrophagen und Monocyten beschränkt ist, konnte, ermittelt aus den Datenblättern, die für die Auswertung der BALF-Proben vom Studienzentrum A zur Verfügung gestellt worden waren, keine Korrelation zwischen der

Anzahl der Macrophagen in der Lunge und der Konzentration an sCD163 festgestellt werden. Diese Beobachtung könnte für die Hypothese einer fehlenden Korrelation zwischen sCD163-Konzentration und dem Ausmaß der Entzündung bei den untersuchten Patienten sprechen. Andererseits exprimieren Macrophagen je nach Differenzierungsstadium und Art der Aktivierung unterschiedliche Mengen an CD163 [33], so dass eine direkte Abhängigkeit der Konzentration an freiem sCD163 und der Gesamtzahl an Macrophagen generell unwahrscheinlich ist. Für weitere Aussagen hierüber müsste eine genauere Zelldifferenzierung vorgenommen werden.

Von Hartl et al. wurden bei der Untersuchung des Einflusses eines inhalativ angewendeten Antioxidans auf die Lungenfunktion von Patienten mit CF 8-iso PGF_{2α}-Konzentrationen in BALF vermessen [302]. In dem vorgestellten Versuchsansatz erwies sich 8-iso PGF_{2α} ebenso wie andere oxidativ beeinflussbare Verbindungen als Marker nicht geeignet, da keine signifikanten Konzentrationsänderungen bestimmt werden konnten. Der Beobachtungszeitraum für diese Analyse betrug zwei Wochen. In den eigenen Versuchen fand die erste Probennahme 18 Monate nach Behandlungsbeginn mit rhDNase I statt (2. BAL), so dass über Konzentrationsänderungen direkt nach Therapiebeginn keine Aussagen gemacht werden können.

Wie bereits unter 2.3.1 beschrieben konnten innerhalb der einzelnen Studienzentren A und B deutliche Tendenzen in den Konzentrationsverläufen ermittelt werden. Diese Tendenzen wiesen jeweils inverse Entwicklungen des anti- und proinflammatorischen Markers in den einzelnen Patientengruppen auf. Ein inverses Verhalten konnte auch innerhalb der Behandlungsgruppen für denselben Marker zwischen den beiden Studienzentren A und B beobachtet werden. Jedes Studienzentrum für sich betrachtet wies prinzipiell einen Einfluss der rhDNase I auf die Konzentration des sCD163 und 8-iso PGF_{2α} auf.

Auffällig bei den Ergebnissen der Konzentrationen an sCD163 und 8-iso PGF_{2α} in den BALF-Proben war, dass stets ein inverses Verhalten der Konzentrationsänderung für die Studienzentren A und B einer Behandlungsgruppe festzustellen war. Sowohl in der Interventionsgruppe als auch in der Kontrollgruppe konnte in den BALF-Proben der Patienten beider Zentren nahezu gegenläufige Konzentrationsänderungen nachgewiesen werden (Abb. 44, Abb. 45). Ein möglicher Grund hierfür könnte eine fehlerhafte Zuordnung der Proben zu den jeweiligen Studiengruppen durch die Studienzentren sein. Aufschluss hierüber könnte eine Konzentrationsbestimmung der rhDNase I in den einzelnen Proben, zum Beispiel durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion mittels spezifischen Antikörpers auf rhDNase I, geben. In

den BALF-Proben der Interventionsgruppe sollten hierbei größere Mengen rhDNase I zu finden sein als in den Proben der Kontrollgruppe.

Es ist bekannt, dass biologische Proben auf Grund von großen interindividuellen Unterschieden nur schwer miteinander zu vergleichen sind. Für die Ermittlung aussagekräftiger Resultate sollten größere Probandenzahlen herangezogen werden, um trotz dieser Unterschiede Tendenzen erkennen zu können. Von den insgesamt 105 Patienten, die an der BEAT-Studie teilgenommen hatten, standen für die Auswertung der Konzentrationen von sCD163 und 8-iso PGF_{2α} nur insgesamt 13 Patienten aus der Interventions- und der Kontrollgruppe I zur Verfügung. Höchstwahrscheinlich war diese Patientenzahl zu gering, um eindeutige Trends der Konzentrationsänderungen von sCD163 und 8-iso PGF_{2α} aufzeigen zu können. Erst die Untersuchung einer größeren Anzahl an Patienten könnte Aufschluss über eine mögliche Korrelation der Entzündung in der Lunge von Patienten mit Cystischer Fibrose unter Behandlung mit rhDNase I und dem antiinflammatorischen sCD163 bzw. proinflammatorischen 8-iso PGF_{2α} geben.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass aus den Untersuchungen keine abschließende Aussage zur Korrelation zwischen sCD163 und 8-iso PGF_{2α} in der BALF von Patienten mit Cystischer Fibrose und der Behandlung mit rhDNase I möglich ist. Sowohl für die Patienten, die über den Untersuchungszeitraum von 18 Monaten mit rhDNase I behandelt wurden, als auch für Patienten, die während dieser Zeit ein Placebo erhielten, waren keine deutlichen Änderungen der Konzentrationen an antientzündlichem sCD163 und inflammatorischen 8-iso PGF_{2α} zu erkennen. Da jedoch bei einer separaten Betrachtung der einzelnen Studienzentren Trends zu erkennen waren, ist die Eignung von sCD163 und 8-iso PGF_{2α} als biologische Marker für die Ausprägung der chronischen Entzündung bei der Cystischen Fibrose unter antiinflammatorischer Medikation nicht gänzlich auszuschließen. Weiteren Aufschluss über eine Verwendung als Marker in diesem pathologischen Geschehen könnte die Analyse der bereits vorhandenen BALF-Proben auf rhDNase-Konzentrationen oder die Untersuchung einer größeren Anzahl Patientenproben aus der BEAT-Studie geben.

3 Interaktion von sCD163 mit aktivierten humanen T-Lymphocyten

In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass die lösliche Form des CD163 mit humanen T-Lymphocyten interagiert. Durch diese Interaktion ist sCD163 in der Lage, *in vitro* die Phorbolster-induzierte Proliferation von T-Zellen zu hemmen und damit einen Beitrag zur Herabregulation einer Entzündung zu leisten [74]. Eine Hemmung der Proliferation erfolgte sowohl durch aufgereinigtes sCD163, als auch durch Coinkubation der Lymphocyten mit glucocorticoidstimulierten Monocyten [74] oder Macrophagen [303]. Die antientzündliche Wirkung wird ausschließlich durch die lösliche Form des CD163 hervorgerufen, während die membrangebundene Form keine solchen Effekte zeigt [75].

3.1 sCD163 in humanen T-Lymphocyten

Der hemmende Effekt des sCD163 auf die Aktivierung von T-Lymphocyten setzt eine direkte Interaktion des sCD163 mit T-Lymphocyten voraus. CD163 wird ausschließlich auf der Oberfläche humaner Monocyten und Macrophagen exprimiert, nicht jedoch auf Lymphocyten [32]. Da die Lymphocyten selbst nicht in der Lage sind, diesen antiproliferativen Faktor zu bilden, muss sCD163 aus Zellen monocytären Ursprungs vom Extrazellulärraum her den Lymphocyten zugeführt werden. Theoretisch gibt es zwei Möglichkeiten, wie die Interaktion von Monocyten/Macrophagen mit den T-Lymphocyten stattfinden kann. Die eine wäre ein direkter Zell-Zell-Kontakt der Monocyten/Macrophagen mit den Lymphocyten. Ein solcher Kontakt zwischen Monocyten und T-Lymphocyten wurde bei der Steigerung der Induktion der Expression von Matrixmetalloproteinasen als ein biologischer Mechanismus der Immunantwort postuliert [304]. Ein bisher unbekannter Glycoprotein-Bestandteil der Zellmembran übernimmt dabei den stimulierenden Effekt auf die Freisetzung der Enzyme. Übertragen auf die antiproliferative Wirkung der Monocyten/Macrophagen auf die T-Lymphocyten müsste bei einem Zell-Zell-Kontakt ebenfalls ein Membranprotein die Rolle der Signalweiterleitung übernehmen. Das membranständige CD163 zeigt, wie bei Frings et al. beschrieben, diesen Effekt jedoch nicht [75]. Die andere Möglichkeit ist, dass Monocyten/Macrophagen einen antiinflammatorischen Faktor sekretieren. Die Existenz eines solchen Faktors wurde schon früher postuliert. Der Faktor selbst konnte jedoch noch nicht

identifiziert werden [305, 306]. Das durch Abspaltung von der Oberfläche generierte sCD163 könnte auf Grund seiner antiinflammatorischen Eigenschaften dieser Faktor oder zumindest eine Komponente dieses Faktors sein. Bei diesem Mechanismus muss die Wirkung des sCD163 auf T-Lymphocyten durch Bindung des Proteins an die Zelloberfläche oder durch Aufnahme in die Zelle erfolgen.

In-vitro-Versuche mit aufgereinigtem CD163 gaben keine Hinweise darauf, dass CD163 an die Oberfläche von T-Lymphocyten gebunden wird [307]. Dies bedeutet, dass kein konstitutiver Rezeptor für das lösliche CD163 auf der Oberfläche humaner T-Zellen vorhanden ist. Nach Antikörper-Markierung des CD163 konnte jedoch eine spezifische Aufnahmefähigkeit aktivierter T-Lymphocyten für sCD163 nachgewiesen werden [307].

Die Aufnahme eines löslichen Proteins in T-Lymphocyten wurde bereits früher für den *migration inhibitor factor* (MIF) gefunden [308]. Dieser Faktor wird von verschiedenen Zellen sekretiert und spielt eine Rolle in der Hemmung der Migration von Macrophagen [309]. Der Mechanismus für die Aufnahme des MIF in die Zellen konnte bisher noch nicht geklärt werden, das Zelloberflächenprotein CD74 als hochaffines Bindungsprotein für MIF wurde allerdings nachgewiesen [310]. Die intrazelluläre Konzentration für MIF wurde mittels ELISA oder mittels Durchflusszytometrie bestimmt [308].

Der qualitative Aspekt der Aufnahmefähigkeit humaner T-Lymphocyten für sCD163 sollte in eigenen Versuchen durch Quantifizierung der sCD163-Moleküle in einzelnen T-Zellen erweitert werden.

3.1.1 Quantitative Bestimmung von sCD163 in nativen humanen T-Lymphocyten einzelner Spender

Da die antiinflammatorische Wirkung auf humane T-Lymphocyten die Anwesenheit von sCD163 an oder in der Zelle voraussetzt, wurde dessen Konzentration in isolierten T-Lymphocyten von 13 verschiedenen Probanden bestimmt. Die Lymphocyten wurden aus Blutzellkonzentraten der Spender gewonnen. Die Blutzellkonzentrate stellen eine Suspension des Großteils der bei einer Blutspende erhaltenen Blutzellen dar und wurden so aufgearbeitet, dass eine reine T-Lymphocytenfraktion erhalten wurde (Experimenteller Teil, 2.4). Vor der quantitativen Bestimmung des sCD163 wurden die T-Lymphocyten lysiert, um das sCD163 aus den Zellen freizusetzen. Um auszuschließen, dass von außen an die Zellen adsorbiertes sCD163 in die Bestimmung einbezogen wird, wurden die Lymphocyten vor der Lyse

mehrfach mit Pufferlösung gewaschen. Lysiert wurde von jedem Probanden eine festgelegte Zellzahl von $1 \cdot 10^7$ lebender Zellen, um die einzelnen Proben quantitativ miteinander vergleichen zu können. Auf diese Weise wurden Konzentrationsschwankungen des sCD163 in den Lymphocyten, hervorgerufen durch eine unterschiedliche Absterberate der Zellen während der Kultivierung, ausgeschlossen. Die Quantifizierung erfolgte anschließend mittels spezifischem ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) auf sCD163 (Experimenteller Teil, 3.4) [307].

Dieser ELISA war nach dem Sandwich-Prinzip aufgebaut, wobei zwei monoklonale Antikörper eingesetzt wurden, die jeweils unterschiedliche Epitope des sCD163 erkennen. Die Detektion erfolgte photometrisch über eine enzymkatalysierte Reaktion, bei der ein zugesetztes Substrat zu einem farbigen Produkt umgesetzt wurde. Die Intensität der Farbreaktion war direkt proportional der Konzentration an sCD163 in der Probe. Die Quantifizierung erfolgte mittels eines im gleichen Versuchsansatz gemessenen sCD163-Standards bekannter Konzentration (Abb. 46).

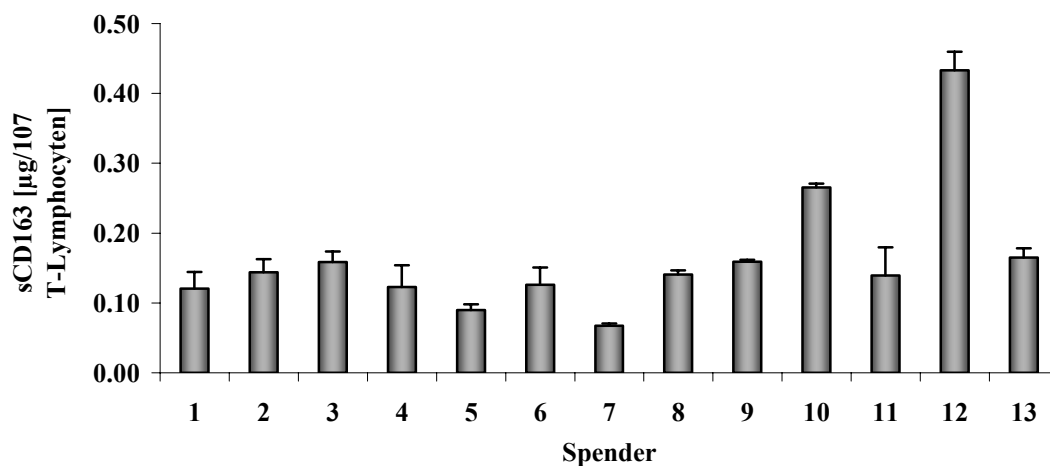


Abb. 46: Konzentration sCD163 pro 10^7 vitaler T-Lymphocyten, gewonnen aus Blutspenden von 13 verschiedenen Probanden. Die Bestimmung erfolgte mittels spezifischem ELISA auf sCD163. Dargestellt sind die Mittelwerte und Mittleren Abweichungen vom Mittelwert von Dreifachbestimmungen.

Die Messung der Blutspenden von 13 verschiedenen Probanden ergab für 11 der untersuchten Personen ungefähr gleiche Mengen an sCD163 in 10^7 T-Lymphocyten. Die Konzentrationen dieser 11 Probanden lagen im Mittel bei $0,13 \mu\text{g} \pm 0,03/10^7$ T-Lymphocyten (Abb. 46, Probanden 1-9, 11, 13). Zwei Probanden (Abb. 46, Proband 10 und 12) wiesen höhere Konzentrationen sCD163 in den T-Zellen auf. So lag die Menge sCD163 bei Proband 10 mit $0,27 \mu\text{g} \pm 0,01/10^7$ T-Lymphocyten nahezu zweifach höher und bei Proband 12 mit $0,43 \mu\text{g} \pm 0,03/10^7$ T-Lymphocyten circa dreifach höher als die der anderen

Probanden. Die Umrechnung der Konzentrationen an sCD163 auf die ungefähre Anzahl sCD163-Moleküle pro Zelle ergab unter der Annahme einer molaren Masse von 130 kDa für sCD163 einen Mittelwert von 60332 Moleküle sCD163 (Probanden 1-9, 11, 13), 122938 Moleküle bei Proband 10 und 200545 Moleküle bei Proband 12.

Durch die quantitative Bestimmung des sCD163 in einer definierten Anzahl lysierter T-Lymphocyten konnte erstmals gezeigt werden, dass humane T-Zellen *in vivo* sCD163 aufnehmen können und dass sCD163 konstitutiv in T-Lymphocyten zu finden ist.

Es ist davon auszugehen, dass es sich bei den Spendern um gesunde Personen handelt, da für Blutspenden nur Personen zugelassen werden, die vorher eingehend untersucht wurden. Die erhöhten sCD163-Konzentrationen in den T-Lymphocyten der Probanden 10 und 12 könnten auf eine beginnende oder bestehende Entzündung zurückzuführen sein, die am Tag der Blutspende nicht erkannt wurde. Andererseits ist auch die Situation einer abklingenden Entzündung möglich. Bislang wurden noch keine Untersuchungen bezüglich der sCD163-Zellkonzentration bei Patienten mit erhöhter Lymphocytenstimulation durchgeführt. Es bleibt zu klären, wie hoch unter pathologischen Bedingungen die intrazelluläre sCD163-Konzentration in T-Lymphocyten liegt.

3.1.2 Vergleich der intrazellulären Konzentration an sCD163 in T-Lymphocyten mit der Plasmakonzentration von sCD163 einzelner Spender

Die Präsenz des sCD163 in T-Lymphocyten gesunder Probanden lässt auf eine konstitutive Aufnahme des sCD163 unter Basalbedingungen in die Zellen schließen. Voraussetzungen für diese Aufnahme ist eine basale Konzentration des sCD163 im Plasma.

Bei Untersuchungen von Plasmaproben gesunder Probanden konnten sCD163-Spiegel von 0,73 µg/ml bis 4,69 µg/ml [42], bzw. $0,06 \pm 0,03$ µg/ml [73] detektiert werden. Das Protein wird somit konstitutiv auf Monocyten/Macrophagen gebildet und abgespalten. Damit ist unter physiologischen Bedingungen auch die Voraussetzung für eine konstitutive Aufnahme in die T-Lymphocyten gegeben. Die eher geringen interindividuellen Konzentrationsschwankungen an intrazellulär detektiertem sCD163 spiegeln wahrscheinlich die Schwankungen an frei im Plasma vorliegendem sCD163 wider.

Die intrazellulär in T-Lymphocyten gemessenen individuellen Konzentrationen an sCD163 sollten mit der sCD163-Konzentration im Plasma der jeweiligen Probanden

verglichen werden. Hierzu wurden jeweils 10 ml der bei der Blutspende erhaltenen Buffy Coats vor der Zellisolierung abgenommen und zentrifugiert. Das dabei als Überstand erhaltene Plasma wurde zur Bestimmung der Plasmakonzentration an sCD163 in den jeweiligen Spendern eingesetzt. Die Bestimmung erfolgte mittels spezifischem ELISA auf sCD163, analog der Bestimmung von sCD163 in den Zelllysaten.

Die Konzentrationen an sCD163 im Plasma lagen im Mittel bei $0,06 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$ (Abb. 47).

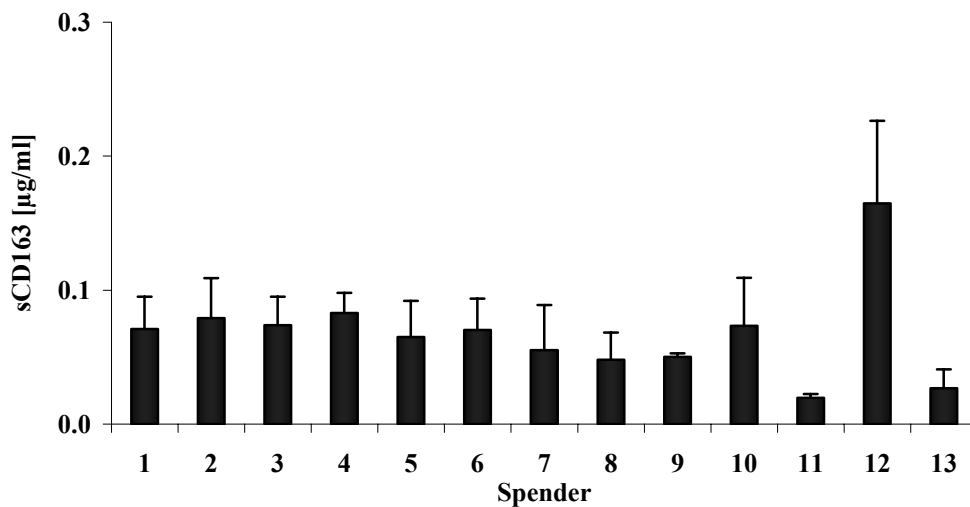


Abb. 47: Plasmakonzentration an sCD163 in Proben verschiedener Spender. Dargestellt sind die Mittelwerte und Mittleren Abweichungen vom Mittelwert von Dreifachbestimmungen.

Die in den eigenen Versuchen gefundenen Plasmakonzentrationen an sCD163 korrelieren mit den von Hiraoka et. al gefundenen Konzentrationen bei gesunden Patienten ($0,06 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$) [73]. Im Vergleich dazu lagen die von Moller et al. bestimmten sCD163-Konzentrationen zehnfach bis 100fach höher [42].

In den Plasmaproben der gesunden Probanden wurden ebenfalls interindividuelle Schwankungen der sCD163-Konzentrationen detektiert. Die beiden Probanden 10 und 12, bei denen erhöhte Konzentrationen in T-Lymphocyten vorgelegen hatten, wiesen auch im Plasma, im Vergleich zu den anderen untersuchten Proben, die höchsten Konzentrationen von $0,07 \pm 0,04 \mu\text{g/ml}$ bei Proband 10 und $0,17 \pm 0,06 \mu\text{g/ml}$ bei Proband 12 auf.

Bei der statistischen Auswertung einer möglichen Wechselbeziehung zwischen der Konzentration des sCD163 in T-Lymphocyten und in Plasma war keine signifikante Korrelation zu erkennen (Abb. 48).

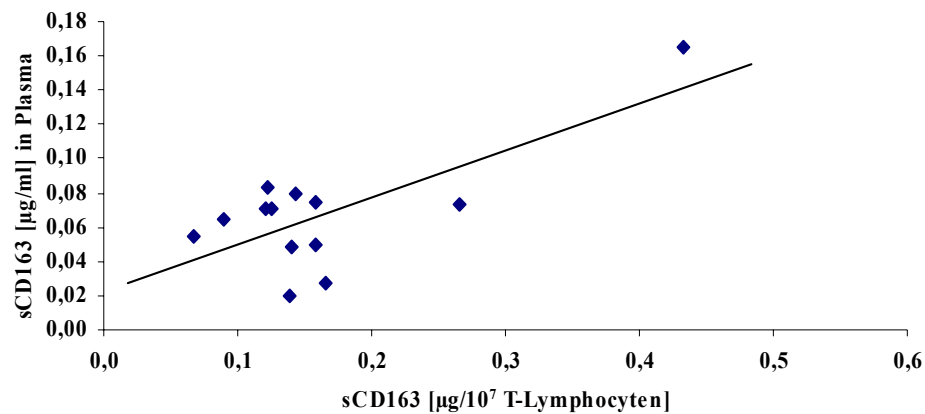


Abb. 48: Keine signifikante Korrelation zwischen der sCD163-Konzentration in T-Lymphocyten [$\mu\text{g}/10^7$ T-Lymphocyten] und in Plasma [$\mu\text{g}/\text{ml}$] von 13 Probanden (Spearman [130] $r = 0,1871$, $p > 0,05$).

Eine erhöhte Konzentration an sCD163 in T-Lymphocyten setzt prinzipiell auch eine erhöhte Konzentration an sCD163 im Plasma der Personen voraus. Somit wäre eine direkte Korrelation zwischen den beiden Parametern, sCD163 in Plasma und in T-Lymphocyten, zu erwarten. Es ist jedoch zu beachten, dass diese Erwartung auf der Annahme basiert, dass die T-Lymphocyten der einzelnen Spender jeweils gleiche Mengen an sCD163 aufgenommen haben. In den eigenen Versuchen wurde eine absolute T-Lymphocytenzahl analysiert. Hierbei handelte es sich um Zellen unterschiedlicher Entwicklungsstadien und Funktionalität, die wahrscheinlich auch unterschiedliche Mengen sCD163 aufgenommen haben. Aufschluss über den jeweiligen Zellstatus könnte eine genauere Differenzierung der T-Lymphocyten geben, die jedoch im Rahmen dieser Untersuchungen nicht möglich war.

Die Wichtigkeit der genauen Charakterisierung der Zellen konnte in einer Studie über die Korrelation der Konzentration an membrangebundenem CD163 und sCD163 in Blutproben unterschiedlicher Patienten verdeutlicht werden [311]. Davis und Zarev zeigten, dass eine statistisch signifikante inverse Korrelation zwischen der Konzentration an membranständigem CD163 und im Plasma gelöstem Protein besteht, wenn sichergestellt war, dass alle untersuchten Monocyten eindeutig CD163-positiv waren. Bei der Bestimmung des Verhältnisses der absoluten Monocytenzahl, d.h. einschließlich der Monocyten, die kein CD163 exprimiert haben, zu der Konzentration an sCD163 in Plasma konnte dagegen keine Korrelation festgestellt werden. Daraus ergibt sich, dass für einen direkten Vergleich der Zellstatus und der Differenzierungsgrad eine große Bedeutung haben. Für genauere Aussagen müssten jedoch weitere Untersuchungen mit Proben von Patienten mit klinisch diagnostizierten Entzündungen gemacht werden.

3.1.3 Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von sCD163 in T-Lymphocyten

Zur Charakterisierung des sCD163 in humanen T-Lymphocyten sollte die intrazelluläre Lokalisation von sCD163 in T-Lymphocyten erstmalig direkt in den Zellen visualisiert werden. In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass deutliche Unterschiede bezüglich der Aufnahme von sCD163 zwischen unstimulierten und phorbolsterstimulierten T-Zellen bestehen [307]. Phorbolsteraktivierte T-Lymphocyten zeigten eine bedeutend stärkere Aufnahmefähigkeit für sCD163 als unstimulierte Zellen. So konnte bereits nach drei Stunden sCD163 qualitativ in mit Phorbolster vorinkubierten Zellen nachgewiesen werden. Zur Untersuchung dieses unterschiedlichen Verhaltens wurden unstimulierte und phorbolsterstimulierte Zellen untersucht. Die in diesem Versuch eingesetzten T-Lymphocyten wurden aus gepoolten Blutzellsuspensionen gewonnen (Experimenteller Teil, 2.4).

Die Darstellung des sCD163 in T-Lymphocyten erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie. Bei dieser Methode werden Proteine über einen spezifischen Antikörper mit einem Fluorochrom markiert. Um dem Antikörper das Eindringen in den Intrazellularraum zu ermöglichen, wurde die Zellmembran zunächst mit einem Detergenz permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen nacheinander mit dem CD163-spezifischen Primärantikörper und einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper inkubiert. Bei dem verwendeten Fluoreszenzfarbstoff handelte es sich um das Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Nach Anregung emittiert er Licht mit einer grünen Farbe. Die unspezifischen Bindungsstellen des Präparates wurden mit Rinderserumalbumin (BSA) blockiert, um zu verhindern, dass der Primärantikörper unspezifisch mit anderen Proteinen eine Bindung eingeht. Zur Überprüfung der Spezifität der Fluoreszenzmarkierung des sCD163 wurden Zellen parallel auch mit einem Isotyp-Kontrollantikörper inkubiert.

Die Darstellung unstimulierter Lymphocyten ergab, dass in den Zellen nur eine geringe Menge an sCD163, repräsentiert durch den grünen Fluoreszenzfarbstoff, vorhanden war (Abb. 49, A). Der Hauptteil davon war in Clustern nahe der Zellmembran lokalisiert (Abb. 49, A, obere Zelle). Je intensiver der Fluoreszenzfarbstoff sichtbar war, desto näher an der Zelloberfläche waren auch die mit diesem Farbstoff markierten Strukturen lokalisiert. Die Cluster wiesen keine einheitliche Größe auf, was auf eine unregelmäßige Zusammenlagerung des sCD163 schließen lässt. Zusätzlich zu den Clustern waren im Zellinneren schwächer grün gefärbte Bereiche zu erkennen (Abb. 49, A, mittlere und untere Zelle). Ein kleiner Anteil des in die T-Lymphocyten aufgenommenen sCD163 befand sich in der perinuklearen Region der

Zelle. Durch die kernnahe Lage war die Fluoreszenz nicht mehr so stark ausgeprägt. Der Fluoreszenzfarbstoff markierte über den Antikörper nur sCD163. Die Negativkontrolle (Abb. 49, B) wies keinerlei Fluoreszenz auf.

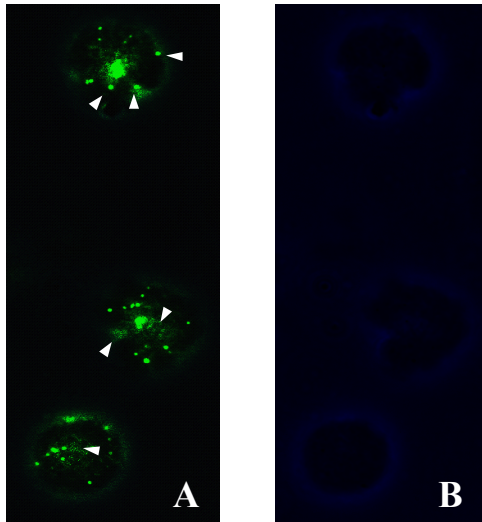


Abb. 49: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung unstimulierter Lymphocyten. **A** sCD163 wurde über einen spezifischen Antikörper mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC (grün) markiert. Die verschiedenen Lokalisationsregionen sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet. **B** Die Isotyp-Negativkontrolle zeigte bei Markierung mit FITC keine grüne Fluoreszenz. Dargestellt sind jeweils drei repräsentative Zellen.

Nach Stimulation der T-Lymphocyten mit dem Phorbolster PMA erfolgt in der Zelle eine offensichtliche Umverteilung des sCD163 (Abb. 50, A). Der Hauptanteil des von den T-Zellen aufgenommenen sCD163 lokalisierte sich nun nahe der inneren Zellmembran (Abb. 50, A). Es waren keine Cluster mehr erkennbar. sCD163 scheint sich nahezu gleichmäßig an der inneren Zellmembran zu verteilen. Die Fluoreszenzmarkierung war auch in diesem Versuch spezifisch auf sCD163, da die Isotyp-markierte Negativkontrolle (Abb. 50, B) keine signifikante Fluoreszenz aufwies.

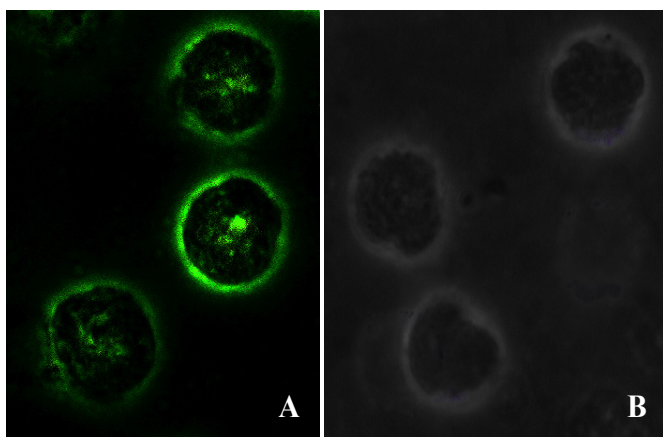


Abb. 50: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung phorbolsteraktivierter T-Lymphocyten. **A** sCD163 wurde über einen spezifischen Antikörper mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC (grün) markiert. **B** Die Isotyp-Negativkontrolle zeigte bei Markierung mit FITC keine Fluoreszenz. Dargestellt sind jeweils drei repräsentative Zellen.

sCD163 zeigte somit ein deutlich unterschiedliches Verteilungsmuster in unstimulierten T-Lymphocyten und in Phorbolster-stimulierten Zellen. Unstimulierte Zellen wiesen einen intrazellulären sCD163-Anteil auf, der in der Zelle weitgehend diffus im cytoplasmatischen

Raum und in wenigen Clustern nahe der Zellmembran lokalisiert war. Nach Stimulation der T-Lymphocyten mit dem Phorbolster PMA kam es zu einer Umverteilung innerhalb der Zelle. sCD163 konzentrierte sich dann in photographisch unaufgelösten Clustern nahe der Zellmembran. Damit wurde erstmals gezeigt, dass eine Stimulation von T-Zellen durch einen inflammatorischen Reiz zu einer Änderung der intrazellulären sCD163-Verteilung führt.

Ähnliche Umverteilungsreaktionen innerhalb einer Zelle wurden auch für andere Proteine beobachtet. Rozsnyay et al. beobachteten in B-Lymphocyten und B-Lymphomzellen *in vitro* eine ausgeprägte Umverteilung des Proteins Ezrin, einem Verbindungsstück zwischen Cytoskelett und Plasmamembran, vom Cytoplasma zur Plasmamembran [312]. Dieser Vorgang wurde durch Einwirkung von oxidativem Stress eingeleitet. Auch Phorbolster können als Aktivatoren Umverteilungsreaktionen beeinflussen. Wahrscheinlich beruht dieser Effekt auf der Aktivierung der Proteinkinase C. So führte die Aktivierung der Proteinkinase C- ϵ in T84 intestinalen Epithelzellen zu einer Umverteilung des F-Aktin Vernetzungsprotein *myristoylated alanine-rich C kinase substrate* (MARCKS) von der Zellmembran in das Cytosol [313]. Dieser Vorgang wurde durch Phorbolster induziert und bewirkte eine Endocytose in die Epithelzellen. In C6 Gliomazellen konnte eine Zunahme der Aktivität des neuronalen Glutamattransporters EAAC1 (excitatory amino acid carrier-1) nach Aktivierung der Zellen mit Phorbolster bestimmt werden [314]. Der dieser Aktivierung zugrunde liegende Mechanismus beruht auf einer Umverteilung des Rezeptors vom Cytoplasma zur Zellmembran. Für diesen Vorgang geht der Transporter EAAC1 einen Komplex mit der Proteinkinase C α ein. Diese Komplexbildung konnte als ein *in vitro* phorbolsterabhängiger Prozess nachgewiesen werden.

Mit den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ließ sich eindeutig eine intrazelluläre Lokalisation des sCD163 in humanen T-Lymphocyten zeigen. Zusätzlich konnte ein Einfluss des zur Zellaktivierung führenden Phorbolsters PMA auf die Verteilung in T-Lymphocyten visualisiert werden.

3.2 Untersuchung zur Interaktion des sCD163 mit seinem spezifischen Interaktionspartner Myosin II Typ A in T-Lymphocyten

Die Inhibierung der T-Lymphocytenproliferation durch sCD163 und der Nachweis der intrazellulären Lokalisation des sCD163 ließen auf eine spezifische Interaktion des sCD163

mit einem intrazellulären Protein der T-Lymphocyten schließen. Zur Identifizierung dieses Proteins der T-Lymphocyten wurde eine Affinitätschromatographie mit kovalent an eine Matrix gebundenem sCD163 durchgeführt [307]. Nach anschließender SDS-PAGE (*Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) konnte ein Protein mit einer molaren Masse von circa 210 kDa ermittelt werden [307]. Die Teilsequenzierung des 210 kDa großen Proteins aus den solubilisierten humanen T-Lymphocyten ergab eine Sequenz-übereinstimmung mit der schweren Kette des nichtmuskulären Myosin II vom Typ A. Dieses Ergebnis wurde anschließend durch positive Antikörperreaktionen des Eluates der Affinitätschromatographie mit einem polyklonalen Antikörper auf nichtmuskuläres Myosin Typ IIA bestätigt [307].

3.2.1 Myosin II

Myosine allgemein bezeichnen eine Familie von Motorproteinen, die ATP hydrolysieren und die chemische Energie in Kraft und Bewegung entlang von Aktin-Filamenten umwandeln. Nach phylogenetischen Studien unterteilt man die Myosine in diverse Klassen und Subklassen. Bisher wurden 18 Myosinklassen identifiziert [315]. Zu den Myosinen der Klasse II gehören Myosin aus Muskelfasern und Cytoplasma tierischer Zellen und einige Nicht-Muskel-Myosine [316].

Die Mitglieder dieser Familie sind hexamerische Enzyme [316]. Sie bestehen aus zwei schweren Ketten (*heavy chains*) mit einer molaren Masse von 171 - 244 kDa und zwei Paaren von leichten Ketten (*light chains*). Innerhalb der schweren Ketten können drei strukturelle und funktionelle Domänen unterschieden werden. Der aminoternale Kopf enthält die prototypische Motordomäne. In dieser Domäne sind die Bindungsstellen für Aktin und Nukleotide enthalten. Über eine α -helicale Struktur, der so genannten Halsdomäne, ist die Kopfregion mit der Schwanzdomäne verbunden. In der Halsdomäne befinden sich zwei IQ Motive. IQ Motive besitzen eine konservierte Sequenz (IQXXXRGXXXR) und sind die spezifischen Bindungsstellen für die leichten Ketten. Der carboxyterminale Teil der schweren Kette besteht aus einer coiled-coil-bildenden Sequenz. Diese homodimerisiert und bildet den langen Schwanz, der in einer kurzen nicht-helikalen Struktur endet [317]. Moleküle des Myosin II besitzen eine zweiköpfige Struktur, die auf eine Dimerisierung der schwereren Ketten im Schwanzbereich zurückzuführen ist. Die Myosinschwänze sind selbstbindend, um

Filamente zu bilden. Es wird angenommen, dass über Domänen in der Schwanzregion die Spezifität des Transportes bestimmt wird.

Myosine spielen als aktinstützte Motoren von Muskelfasern eine wichtige Rolle in vielen Formen des selbständigen Bewegungsvermögens. Daneben sind sie auch an zellulären Prozessen beteiligt. Zu diesen Prozessen gehören Zellbewegung und -adhäsion, Phagozytose, Zellwachstum, Erhaltung der Zellgestalt und der Austausch von Organellen und Vesikeln [318, 319]. Obwohl eine Aktinpolymerisation allein schon einige Formen dieses Bewegungsvermögens bewirken kann, treibt Myosin eine große Anzahl von Bewegungen an und ist wichtig für die Durchführung von Prozessen wie Signaltransduktion und Erhaltung der Polarisation.

3.2.2 Bildung intrazellulärer sCD163-Myosin-Komplexe

Es ist bekannt, dass Myosin ein Bestandteil humaner T-Lymphocyten ist [316] und dass Myosin außerhalb der Zelle unter den Bedingungen der Affinitätschromatographie hochaffin an sCD163 bindet [307]. Durch Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie [307] und durch die quantitative Bestimmung der intrazellulären Konzentration des sCD163 in humanen T-Lymphocyten mittels ELISA in den eigenen Untersuchungen (Allgemeiner Teil, 3.1.1) war auch das Vorkommen von sCD163 in diesen Zellen nachgewiesen worden. Aus diesen Beobachtungen ging hervor, dass sCD163 prinzipiell in der Lage ist, an Myosin zu binden und durch die nachgewiesene Präsenz des Myosins und des sCD163 in T-Lymphocyten eine Bindung intrazellulär möglich ist. Es sollte nun untersucht werden, ob die beiden Proteine sCD163 und Myosin *in vivo* tatsächlich eine Bindung eingehen.

Die bisherigen Versuche zur Untersuchung des sCD163-Bindungspartners Myosin wurden ausschließlich mit löslichem CD163 durchgeführt, welches durch Detergenzextraktion aus solubilisierten Monocyten gewonnen wurde. Das auf diese Weise erhaltene Protein enthält höchstwahrscheinlich noch die cytoplasmatische Domäne neben der großen extrazellulären Domäne.

Um auszuschließen, dass der kleinere, cytoplasmatische Anteil eine Rolle für die Bindung an Myosin spielt, wurde sCD163 nunmehr bei allen Untersuchungen zur Komplexbildung zwischen sCD163 und Myosin durch phorbolsterinduzierte Abspaltung von der Oberfläche glucocorticoidstimulierter Monocyten gewonnen [41]. Damit war

sichergestellt, dass ausschließlich der auch *in vivo* nachgewiesene extrazelluläre Anteil des CD163 für die Versuche zum Einsatz kam.

3.2.3 Entwicklung eines ELISA zum Nachweis von sCD163-Myosin-Komplexen

Zur Untersuchung der Interaktion von sCD163 und Myosin wurde ein neuartiger ELISA entwickelt, der spezifisch sCD163-Myosin-Komplexe detektieren sollte, die sich intrazellulär formiert haben. Ebenso wie der ELISA auf CD163 verläuft dieser ELISA nach dem Sandwich-Prinzip (Allgemeiner Teil, 3.1). Als Primärantikörper wurde ein polyklonaler Antikörper gegen zelluläres Myosin an die Mikrotiterplatte adsorbiert. Nach Inkubation mit den zu bestimmenden Proben wurde mit dem CD163-spezifischen biotinylierten Antikörper Bio-RM3/1 inkubiert und über einen peroxidasegekoppelten Antikörper detektiert, der mit einem spezifischen Substrat reagiert.

Durch den Einsatz der spezifischen Antikörper gegen die beiden Bestandteile des Komplexes wurde erreicht, dass ausschließlich in Anwesenheit des Komplexes eine Farbreaktion hervorgerufen wird (Abb. 51).

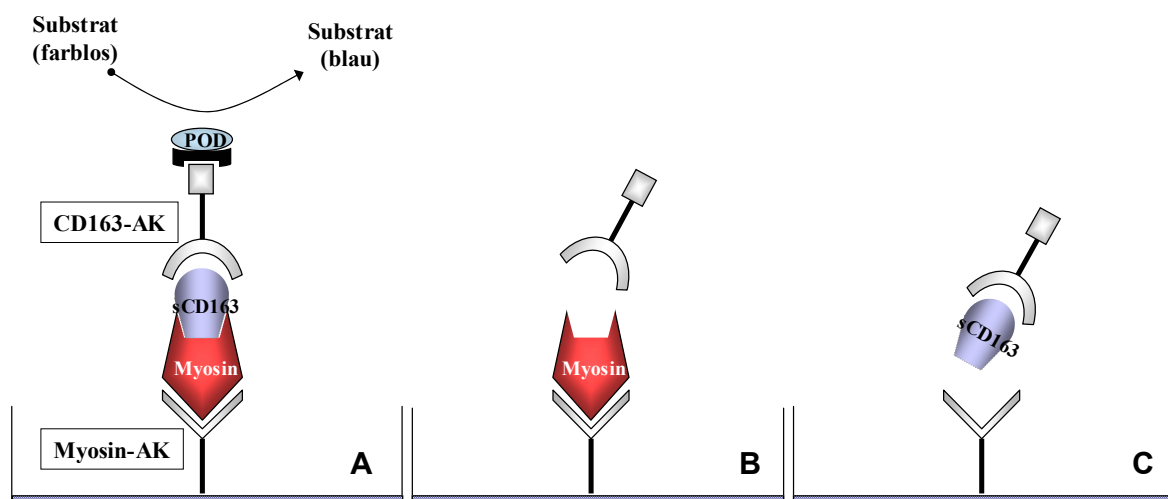


Abb. 51: Schematische Darstellung des ELISA zur Detektion von sCD163-Myosin-Komplexen. **A** Kopplung des sCD163-Myosin-Komplexes an ihre spezifischen Antikörper. Diese Bindung führt zur peroxidase (POD)-katalysierten Farbreaktion. **B** Bei Abwesenheit des sCD163 kann der CD163-spezifische Antikörper nicht binden und die Farbreaktion kann nicht stattfinden. **C** Bei Abwesenheit des Myosin kann sCD163 nicht gebunden werden und die Farbreaktion findet nicht statt.

Die Kopplung der Antikörper nach dem Sandwich-Prinzip und damit die Durchführung einer peroxidasekatalysierten Farbreaktion konnte nur stattfinden, wenn ein Antigenkomplex vorhanden war, der sowohl eine Bindungsstelle für den Myosin-Antikörper als auch für den spezifischen CD163-Antikörper aufweist. Der Antigen-Komplex musste eine ausreichende Stabilität besitzen, die Bindung musste folglich hochaffin sein. Sind diese Voraussetzungen gegeben, kann das Antigen sowohl an den Primärantikörper binden und auf der Mikrotiterplatte festgehalten werden als auch über den Sekundärantikörper in einer Farbreaktion detektiert werden (Abb. 51, A). Liegt nur eine der beiden Antikörperbindungsstellen am Antigen vor, können die Antikörper nicht binden und es kann keine Farbreaktion stattfinden. Bei Vorhandensein von Myosin allein in der Probe findet nur die Bindung an den Myosin-spezifischen Antikörper statt. Der CD163-spezifische Zweitantikörper kann jedoch nicht an das Myosin binden und wird bei den im ELISA üblichen Waschschrritten ausgewaschen. Auch die Farbreaktion kann nicht stattfinden, da dem peroxidasekonjugierten Antikörper der Bindungspartner fehlt (Abb. 51, B). Nach Inkubation des Erstantikörpers mit einer Probe, die nur sCD163 und kein Myosin enthält, findet keine Bindung mit dem Erstantikörper statt. Das Antigen kann nicht auf der Mikrotiterplatte festgehalten werden und wird ausgewaschen. Auch hier findet keine Farbreaktion statt, da der peroxidasekonjugierte Antikörper nicht binden kann (Abb. 51, C).

Ein ähnliches ELISA-Prinzip wurde von von Kobbe et al. zur Bestimmung der Interaktion der Werner und Bloom Syndrom Proteine angewendet [320]. Beide Proteine sind Genprodukte, die beim Werner Syndrom, einem progredienten Alterungsprozess, und dem Bloom Syndrom, einer Krankheit, die sich durch eine hohe Brüchigkeit der Chromosomen auszeichnet, defekt sind. Nur bei Vorhandensein beider Proteine gemeinsam wurde eine signifikante Absorption gemessen, was auf eine direkte Interaktion der Proteine schließen ließ. Zusätzlich wurde von von Kobbe et al. festgestellt, dass nur bei intakten Proteinen eine Farbreaktion zu erkennen war.

3.2.4 Nachweis der sCD163-Myosin-Komplexe in T-Lymphocyten

sCD163 wird abhängig vom Aktivierungsstatus humaner T-Lymphocyten in die Zellen aufgenommen [307]. Vor diesem Hintergrund sollten sCD163-Myosin-Komplexe in

aktivierten T-Lymphocyten mit dem sCD163-Myosin-Komplex-spezifischen ELISA bestimmt werden.

3.2.4.1 sCD163-Myosin-Komplexe in aktivierten T-Lymphocyten

In den Zellkulturversuchen wurden phorbolsteraktivierte T-Lymphocyten mit sCD163 coinkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen lysiert, um die sCD163-Myosin-Komplexe freizusetzen. Die Lysate wurden mit dem beschriebenen ELISA auf sCD163-Myosin-Komplexe untersucht (Abb. 52).

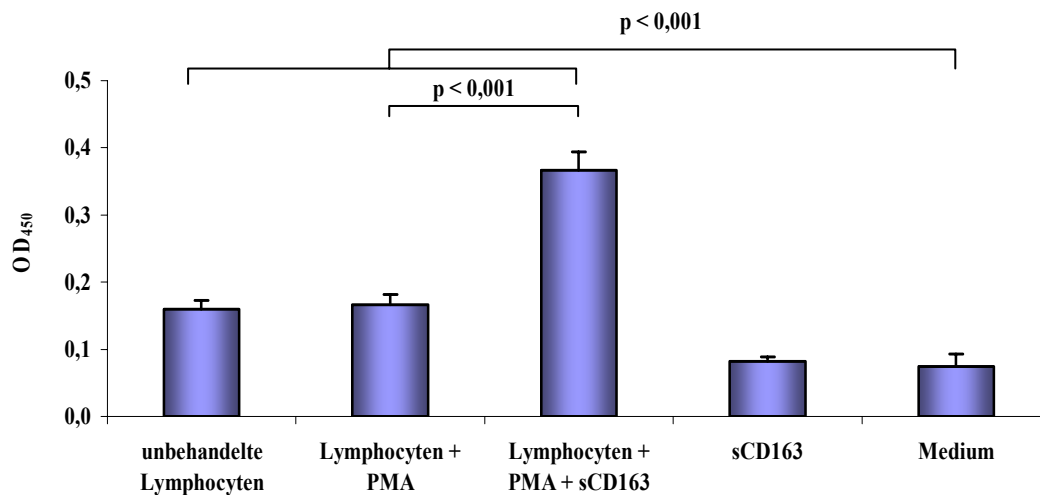


Abb. 52: ELISA zur Detektion der sCD163-Myosin-Komplexe in humanen T-Lymphocyten. Dargestellt ist die optische Dichte bei 450 nm (OD_{450}). Für jede Probe wurde eine Sechsfachbestimmung durchgeführt und jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt. Das Diagramm stellt relative Werte der Proben zur Hintergrundabsorption (Medium) dar. Statistische Signifikanz: $p < 0,001$ (ANOVA, Tukey's Test). PMA = Phorbol 12-myristat 13-acetat.

Als Kontrollen wurden Lysate von T-Lymphocyten vermessen, die lediglich mit oder ohne phorbolsterhaltigem Medium inkubiert wurden, um eine unspezifische Bindung des Myosins an den CD163-spezifischen Antikörper auszuschließen. Der Ansatz mit sCD163 allein diente zur Kontrolle einer etwaigen unspezifischen Bindung dieses Proteins an den Myosin-Antikörper. Zur Bestimmung der Hintergrundabsorption wurde das Zellkulturmedium vermessen (Medium). Die Zahl vitaler Zellen betrug in allen Versuchen $1 \cdot 10^7$ Zellen.

In den durchgeführten Versuchen wurden keine absoluten Konzentrationen bestimmt. Dies war nicht möglich, da keine Referenz für den sCD163-Myosin-Komplex zur Verfügung stand. Die Bestimmung erfolgte durch Vergleich der Proben untereinander, indem die

Absorptionen der Proben in direkte Relation zur Grundabsorption des Mediums (OD_{450} 0,074) gesetzt wurden. Die Absorption des Mediums wurde somit als Maß für die unspezifischen Bindungen des in den Proben enthaltenen bovinem Serumalbumins an die Antikörper herangezogen. Für den sCD163-Myosin-Komplex wurde eine nahezu fünffach höhere Absorption gegenüber dem Medium ermittelt (OD_{450} 0,367). Diese intensive Farbentwicklung und die daraus resultierende Absorption der Probe konnten nur dadurch zustande kommen, dass beide Bindungspartner vorhanden waren und die Antikörper gebunden waren (s. Abb. 51, A).

Die Spezifität des ELISA und damit auch die quantitativ hohe Anzahl gebildeter sCD163-Myosin-Komplexe in T-Lymphocyten nach deren Inkubation mit sCD163 wurde bestätigt. Hierfür wurden verschiedene Inkubationsansätze mit phorbolsterstimulierten und unstimulierten Zellen ohne sCD163 und mit einem zellfreien Ansatz, der nur sCD163 enthielt, untersucht. sCD163 zeigte dabei eine Absorption, die sich kaum von der Grundabsorption des Mediums unterschied ($p > 0,05$, ANOVA). Dadurch wurde gezeigt, dass sCD163 nicht unspezifisch an den Myosin-Antikörper bindet.

Die Messung der Lysate unbehandelter und mit PMA-versetzter T-Lymphocyten ohne zusätzliches sCD163 ergab Absorptionswerte, die in ihrer Intensität um den Faktor 2 höher lagen als die Grundabsorption des Mediums (Abb. 52, $OD_{450} \sim 0,16$). Nichtmuskuläres Myosin liegt in großen Mengen in T-Lymphocyten vor [316]. In den vorangegangenen Versuchen (Allgemeiner Teil, 3.1.1) konnte gezeigt werden, dass sCD163 zu einem gewissen Anteil auch in T-Lymphocyten gesunder Probanden vorhanden ist. In Konformität mit dieser Beobachtung sollten erwartungsgemäß auch sCD163-Myosin-Komplexe in frisch isolierten Zellen vorhanden sein. Eine unspezifische Bindung des Myosins mit dem Zweitantikörper hätte, bedingt durch eine hohe intrazelluläre Myosinkonzentration, zu weitaus höheren Absorptionswerten führen müssen und kann deshalb ausgeschlossen werden. Da es sich bei den gemessenen Werten nur um spezifische sCD163-Myosin-Komplexe handeln konnte, lag hiermit ein weiterer Beweis dafür vor, dass CD163 nicht nur konstitutiv gebildet und ein Teil abgespalten wurde, sondern dass auch eine geringe Menge in T-Lymphocyten aufgenommen und offenbar an Myosin gebunden wurde.

Die unbehandelten und mit PMA behandelten Proben ohne zusätzliche sCD163-Inkubation unterschieden sich in den Absorptionen kaum voneinander ($p > 0,05$). PMA führt zu einer Umverteilung des in der Zelle vorhandenen Anteils an sCD163 (Allgemeiner Teil, 3.1.3, Abb. 49 und Abb. 50). Außerdem wird durch Vorinkubation von T-Lymphocyten mit

PMA die nachfolgende Aufnahme von sCD163 in die Zellen erleichtert [307]. Da bei den vorliegenden Untersuchungen in beiden Proben kein sCD163 im Inkubationsmedium vorhanden war, war eine zusätzliche Aufnahme des Proteins nicht möglich. Gemessen wurde nur der bereits in den Zellen vorhandene Anteil an sCD163.

Die Untersuchungen zur Komplexbildung in phorbolsterstimulierten und unstimulierten T-Lymphocyten ohne sCD163-Inkubation haben somit Hinweise erbracht, dass sCD163-Myosin-Komplexe bereits unter physiologischen Bedingungen gebildet werden und in der Zelle vorliegen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme in Gegenwart von extrazellulär vorliegendem sCD163 nach Stimulation der T-Lymphocyten mit Phorbolster gesteigert werden kann. Diese Ergebnisse bestätigten die Resultate der quantitativen Bestimmung von sCD163 in T-Lymphocyten verschiedener Spender (Allgemeiner Teil, 3.1.1) zur konstitutiven Aufnahme von sCD163 in T-Lymphocyten.

3.2.4.2 sCD163-Myosin-Komplexe in T-Lymphocyten einzelner Spender

Zum Nachweis von interindividuellen Unterschieden der sCD163-Myosin-Komplexbildung wurden T-Lymphocyten 13 verschiedener Personen aus Buffy Coats isoliert. Die Zellen wurden mehrmals gewaschen, um eventuell extrazellulär an den Zellen haftendes sCD163 zu entfernen. Anschließend wurden $1 \cdot 10^7$ Zellen lysiert, um die intrazellulär lokalisierten sCD163-Myosin Komplexe freizusetzen und mittels ELISA zu detektieren (Abb. 53).

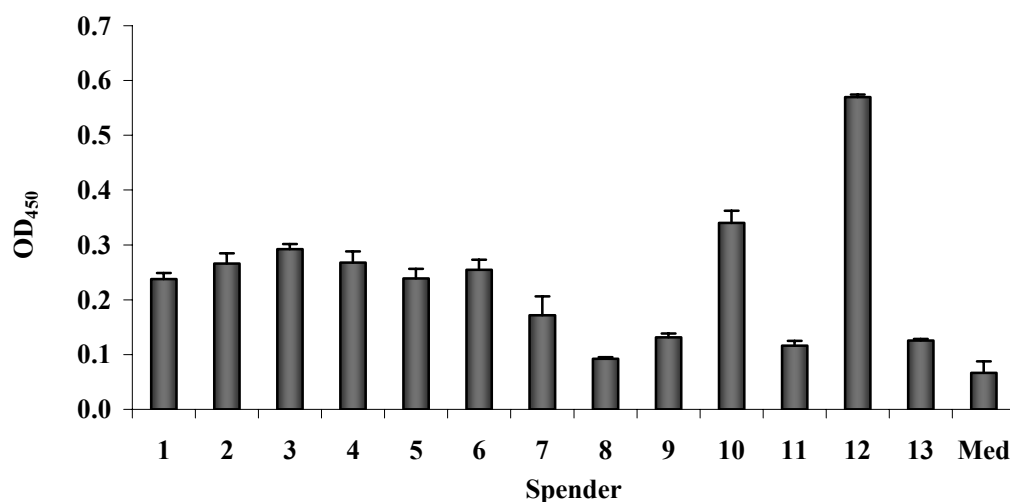


Abb. 53: ELISA auf sCD163-Myosin-Komplexe in humanen T-Lymphocyten 13 einzelner Spender (1-13). Dargestellt sind die relativen Anteile an sCD163-Myosin-Komplexen bezogen auf das Medium (Med). Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt und jeweils der Mittelwert und Mittlere Abweichung vom Mittelwert (MA) ermittelt.

Auf Grund des Fehlens einer Referenzsubstanz für den sCD163-Myosin-Komplex wurden die gemessenen Absorptionen der Spenderproben in Relation zum Medium (Med) betrachtet. Man konnte erkennen, dass bei den meisten Probanden ähnliche Mengen des Komplexes in 10^7 T-Lymphocyten vorhanden waren. Die Anteile an sCD163-Myosin-Komplexen bei den Probanden 10 und 12 lagen sehr viel höher als die der übrigen Probanden. Die Proben der Probanden 1 bis 9, 11 und 13 wiesen im Mittel eine Optische Dichte bei 450 nm (OD_{450}) von $0,200 \pm 0,073$ in den analysierten T-Lymphocyten auf. Die Absorptionen der Proben der Probanden 10 und 12 lagen mit 0,340 bzw. 0,570 ungefähr zweifach bzw. dreifach höher als bei den Proben der übrigen Probanden.

Diese Übereinstimmung der Anteile an sCD163-Myosin-Komplexen bei 11 der untersuchten Probanden zeigte, dass es sich wahrscheinlich um gesunde Probanden handelte. Durch die Bestimmung der Menge der sCD163-Myosin-Komplexe in den Zellen zeigte sich, dass auch der Komplex wahrscheinlich konstitutiv gebildet wird. Im Gegensatz zum Medium wurden deutlich höhere Werte gemessen, die eindeutig auf das Vorhandensein von sCD163-Myosin-Komplexen hinwiesen. Ähnliche intrazelluläre Verhältnisse setzen ähnliche extrazelluläre Ausgangsbedingungen voraus. Den hier untersuchten Zellen lag somit keine bzw. nur eine geringe Einwirkung eines entzündlichen Reizes zugrunde. Ein abweichender Entzündungsstatus könnte bei den Probanden 10 und 12 vorgelegen haben. Diese beiden Personen wiesen, wie auch bei der Bestimmung der Konzentration an sCD163 in T-Lymphocyten (Allgemeiner Teil, 3.1.1), erhöhte Anteile des sCD163-Myosin-Komplexes auf. Die Frage welcher Art diese Entzündung war, ließ sich anhand der Daten, vor allem aber ohne genauere Patientendaten nicht beantworten.

Bereits der Versuch zur Bestimmung der intrazellulären sCD163-Konzentration in T-Lymphocyten (Allgemeiner Teil, 3.1.1) zeigte, dass T-Lymphocyten physiologisch sCD163 aufnehmen. Ein Teil des in T-Lymphocyten aufgenommenen sCD163 schien mit Myosin einen Komplex einzugehen. Bei Betrachtung der Konzentrationen an sCD163 in $1 \cdot 10^7$ T-Lymphocyten und des Anteils sCD163-Myosin-Komplexe in T-Lymphocyten der 13 untersuchten Probanden war erwartungsgemäß eine positive Korrelation zwischen den beiden Bestimmungsgrößen zu erkennen (Abb. 54).

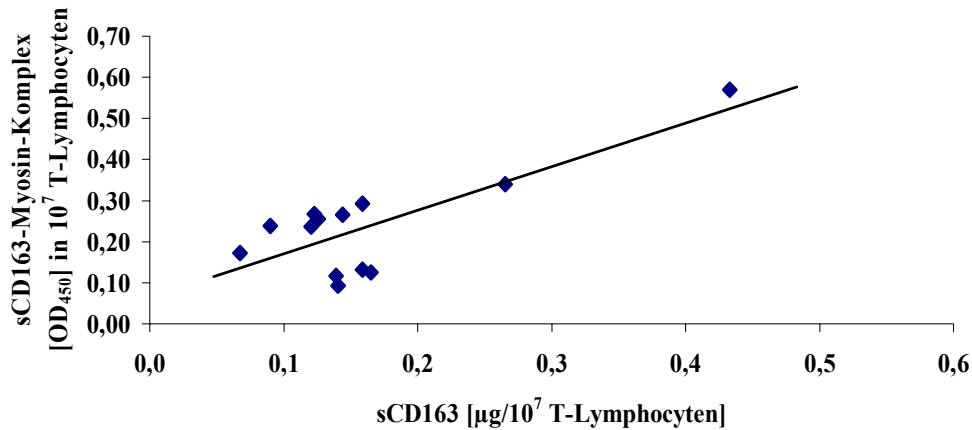


Abb. 54: Vergleich der Konzentration von sCD163 [$\mu\text{g}/\text{ml}$] (x-Achse) mit dem Anteil an sCD163-Myosin-Komplexen (y-Achse) in humanen T-Lymphocyten von 13 verschiedenen Probanden (1-13). Die Bestimmung erfolgte mittels spezifischem ELISA auf sCD163 bzw. auf sCD163-Myosin-Komplexe. Analysiert wurden die Lysate aus $1 \cdot 10^7$ vitaler Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung. Es liegt eine signifikante Korrelation zwischen den beiden Parametern vor (Spearman $r = 0,5134$, $p < 0,05$).

Je höher die Konzentration an sCD163 in den T-Lymphocyten eines Probanden war, desto mehr sCD163-Myosin-Komplexe konnten in den T-Zellen detektiert werden. Damit zeigte sich, dass das in T-Lymphocyten vorhandene sCD163 unter diesen Bedingungen mit der Bindung zwischen sCD163 und Myosin korrelierte.

3.2.5 Bestimmung der Colokalisation von sCD163 und Myosin in T-Lymphocyten

Zur Visualisierung der intrazellulären Interaktion von sCD163 und Myosin IIA sollte durch direkte photographische Aufnahme einer Zelle nach Fluoreszenzmarkierung der beiden Proteine die Lokalisation von sCD163 und Myosin sichtbar gemacht werden. Die bisherigen Versuche haben ausschließlich Hinweise dafür gegeben, dass sowohl *in vitro* als auch nativ in Spenderproben eine Komplexbildung stattfindet, da beide Proteine zusammen detektiert werden konnten. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie, durch die sCD163 und Myosin sichtbar werden, sollte die Komplexbildung bestätigt werden.

Neben der Darstellung der Verteilung eines Proteins in einer Zelle (Allgemeiner Teil, 3.1.3) ermöglicht es die Fluoreszenzmikroskopietechnik, die Verteilung mehrerer verschiedener Proteine in einer Zelle gleichzeitig darzustellen. Die Proteine werden dabei über Antikörper mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Bei den in den eigenen Versuchen verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen handelte es sich um Texas Red und

Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Die Detektion beider Fluoreszenzfarbstoffe nebeneinander ist möglich, weil beide Farbstoffe unterschiedliche Emissionswellenlängen aufweisen. Fluoresceinisothiocyanat hat ein Emissionsmaximum von 520 nm (grün). Texas Red emittiert Licht bei einem Maximum von 615 nm (rot). Das verwendete Texas Red war direkt an einen myosinspezifischen Antikörper gekoppelt und diente somit der Detektion des Myosins. FITC war an einen spezifischen Antikörper gegen sCD163 gekoppelt.

Zur Bestimmung der Colokalisation wurden die beiden Farbstoffe getrennt angeregt und die Fluoreszenzen photographisch festgehalten. Anschließend wurden die beiden Bilder übereinander projiziert. Bei Überlagerung des roten (Texas Red) und grünen (FITC) Fluoreszenzfarbstoffes ergab sich eine gelbe Mischfarbe. Die Colokalisation der beiden Proteine wurde folglich durch eine gelbe Anfärbung bestimmter Zellbereiche repräsentiert.

Die T-Lymphocyten wurden mit PMA stimuliert und anschließend mit sCD163 inkubiert. In den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 55) konnte man erkennen, dass nichtmuskuläres Myosin (A) und sCD163 (B) ein sehr ähnliches Verteilungsmuster innerhalb der T-Lymphocyten aufwiesen.

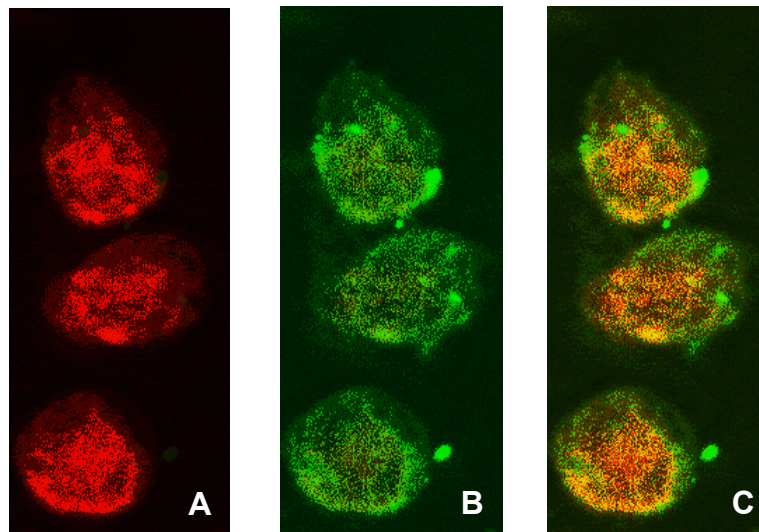


Abb. 55 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Lokalisation von nichtmuskulärem Myosin und sCD163 in PMA-aktivierten T-Lymphocyten nach Inkubation mit sCD163. Nichtmuskuläres Myosin wurde über Antikörper mit Texas Red (rot) markiert (A) und sCD163 mit FITC (grün) (B). Die gelbe Farbe repräsentiert die Colokalisation beider Proteine (C).

Für sCD163 wurden markante Anhäufungen im Cytoplasma und in der Nähe der inneren Zellmembran detektiert (B). Nichtmuskuläres Myosin war vor allem nahe der inneren Zellmembran lokalisiert (A). Die übereinander gelagerte Aufnahme beider Proteine zeigte eine auffallende Colokalisierung (C). Beide Proteine befanden sich nahe der Zelloberfläche und im perinuklearen Bereich. In diesen Bereichen war die Gelbfärbung am intensivsten.

Im Gegensatz zu den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zur Lokalisation des sCD163 in phorbolsteraktivierten T-Lymphocyten (Allgemeiner Teil, 3.1.3, Abb. 50) war sCD163 nicht ausschließlich an der inneren Zellmembran lokalisiert. In den vorangegangenen Versuchen wurde die konstitutive Menge an sCD163 in frisch isolierten T-Zellen betrachtet. Bei der hier gezeigten Bestimmung der Lokalisation der sCD163-Myosin-Komplexe in aktivierten T-Lymphocyten dagegen wurden die Zellen zusätzlich mit sCD163 inkubiert, um eine maximale Aufnahme des Proteins in die Zellen zu erreichen. Die Verteilung des sCD163 im Cytoplasma beruhte wahrscheinlich auf der intrazellulären Anwesenheit einer höheren Konzentration an sCD163.

In einem Parallelversuch wurden die beiden Proteine zur Kontrolle mit einem Isotyp-Antikörper markiert. Auf diese Weise sollte die Spezifität der Markierung durch den jeweils spezifischen Antikörper dargestellt werden (Abb. 56). Auf allen Bildern ist keine Fluoreszenz zu erkennen. Dies bedeutet, dass die Fluoreszenz spezifisch die markierten Zellstrukturen, also sCD163 und Myosin, detektierte.

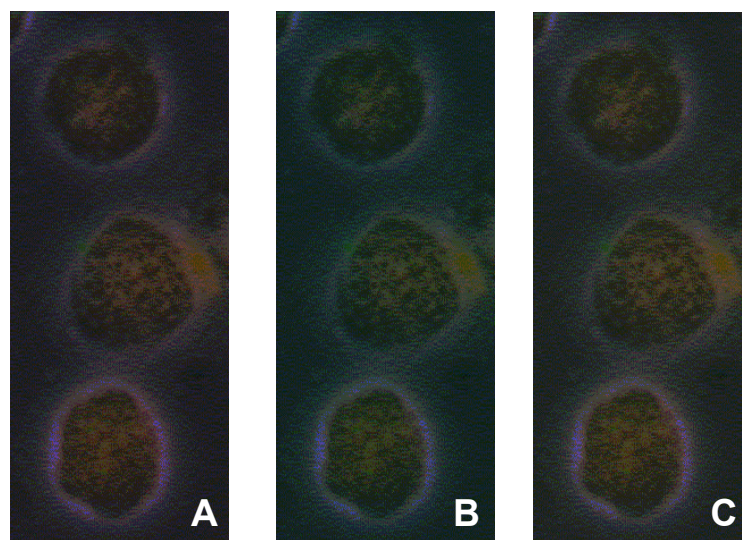


Abb. 56 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Isotyp Negativkontrollen zu nichtmuskulärem Myosin (A), sCD163 (B) und der Colokalisation beider Proteine (C).

Im Gegensatz zu den mit einem Entzündungsreiz stimulierten T-Lymphocyten wiesen unstimulierte Zellen ein anderes Verteilungsmuster sowohl von Myosin als auch von sCD163 auf (Abb. 57).

In unstimulierten T-Lymphocyten konzentrierte sich Myosin in der perinuklearen Region, ein kleiner Teil lag verstreut im Cytoplasma vor (Abb. 57, A).

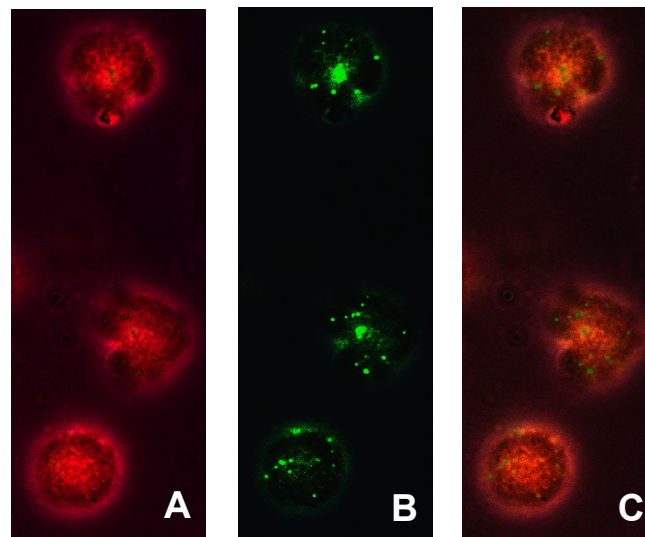


Abb. 57: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von unbehandelten T-Lymphocyten. Dargestellt ist die zelluläre Verteilung von nichtmuskulärem Myosin IIA (rot) (A), Cluster von sCD163 (grün) (s. 3.1.3, Abb. 49), (B) und eine Überlagerung beider Bilder (C).

Eine ähnliche Verteilung wurde von Bizario et al. für das Myosin V in humanen T-Lymphocyten beobachtet [321]. Wie schon unter 3.1.3 dargestellt, trat sCD163 nur in geringen Mengen in unstimulierten T-Zellen auf (Abb. 57, B). Die Projektion beider Bilder übereinander zeigte nur wenig gelbe Bereiche (Abb. 57, C). Eine Colokalisation der beiden Proteine Myosin und sCD163 war nur in sehr wenigen Bereichen vorhanden. So konnte eine schwache Gelbfärbung in der Kernnähe der beiden oberen Zellen und nahe der Zellmembran bei der unteren Zelle festgestellt werden. In unstimulierten T-Lymphocyten lagen folglich nur wenige sCD163-Myosin-Komplexe vor. Das konstitutiv in die T-Lymphocyten aufgenommene sCD163 liegt somit in der Zelle nicht direkt mit Myosin zusammen und erst nach Aktivierung der Zellen scheint eine intrazelluläre Translokalisierung und eine verstärkte Komplexbildung zwischen sCD163 und Myosin stattzufinden (Abb. 55). Bei der quantitativen Bestimmung der sCD163-Myosin-Komplexe aus lysierten Zellen mittels ELISA konnte dagegen kaum ein Unterschied in der Komplexbildung zwischen unstimulierten und mit PMA aktivierten Zellen festgestellt werden (Allgemeiner Teil, 3.2.4.1). Da für den ELISA sichergestellt worden war, dass spezifisch nur die Komplexe aus sCD163 und Myosin detektiert werden, könnte eine Erklärung für die relativ hohe Konzentration an Komplexen in unstimulierten Lymphocyten eine nachträgliche Komplexbildung sein. Denkbar ist zum einen ein durch die Zellyse bedingte Stimulation der T-Lymphocyten, wodurch die Zellen zu einer verstärkten Komplexbildung aktiviert wurden. Ein weiterer Grund könnte sein, dass nach Zerstörung der Zellen die separaten lokalisierten Proteine miteinander assoziierten und

daraufhin im Zellysate als Komplex vorlagen. Basierend auf diesen Annahmen kann mittels ELISA auf sCD163-Myosin-Komplexe in erster Linie die Gesamtmenge an möglichen Komplexen wiedergegeben werden, während die Fluoreszenzmikroskopie über die Darstellung der Lokalisation der Proteine eine genauere Aufschlüsselung der tatsächlich vorliegenden Verhältnisse ermöglicht.

Die Lokalisation im Cytoplasma oder nahe der Zellmembran von Leukocyten wurde für das nichtmuskuläre Myosin IIA schon mehrfach beschrieben. Nebl et al. konnten deutliche Mengen nichtmuskulären Myosins IIA in bovinen Leukocyten nach Extraktion der Zellmembran an so genannten Lipidsträngen, den *lipid rafts*, identifizieren [322]. Myosin IIA gehörte hierbei neben anderen Proteinen, wie Myosin IG und Aktin, zu den Membrangerüstproteinen und war auch nach Entfernung weiterer Membrangerüstproteine im Membranextrakt detektierbar [322]. Ebenfalls in bovinen Zellen konnte eine Verteilung von Myosin II im Cytosol, vor allem aber stark fokussiert in kortikalen Bereichen der Zellen, ermittelt werden [323, 324]. Die untersuchten Zellen waren adrenomedullare chromaffine Zellen, die vorzugsweise zur Untersuchung der Exocytose in neuroendokrinen Systemen verwendet werden. Dieses Verteilungsmuster des Myosins im Cytosol und nahe der Zellmembran konnte in den eigenen Versuchen ebenfalls für humane Leukocyten gezeigt werden (Abb. 57, A).

Die Bedeutung der Funktion des Myosins bei der sCD163-vermittelten Hemmung der Proliferation der T-Lymphocyten ist noch nicht bekannt. In anderen Untersuchungen wurde dem Myosin auf Grund seiner membrannahen Lage häufig eine Funktion bei Transportvorgängen und Signaltransduktionen zugeschrieben. So wurde in einer Arbeit nichtmuskuläres Myosin auch in *lipid rafts* von Jurkat T-Zellen nachgewiesen [325]. In Kombination mit Aktin und verschiedenen Komponenten des ARP2/3 Komplexes, der eine Rolle bei der zellulären Regulation der Cytoskelettfilamente spielt, könnte es an Transportvorgängen in Richtung der Grenzfläche und an einer Regulation der Reorganisation des Cytoskelettes beteiligt sein.

sCD163 könnte als extrazelluläres Protein als Auslöser für myosinvermittelte zelluläre Prozesse verantwortlich sein. Bereits früher wurde einer Verbindung von Signalstoffen als Auslöser und Myosin als Generator zur Ausführung intrazellulärer oder zellulärer Bewegungen eine wichtige Rolle im Entzündungsgeschehen und in der Immunantwort zugeschrieben. Bei der Untersuchung des Signalweges der Lymphocytenmigration wurde eine Assoziation des chemokinen Rezeptors CXCR4 mit nichtmuskulärem Myosin IIA sowohl in

Peer T-Lymphocyten als auch in Jurkat Zellen entdeckt [326]. Gemeinsam mit F-Aktin hat der Rezeptor-Myosin-Komplex eine Lokalisation an der Spitze migrierender T-Lymphocyten. Dem Rezeptor-Motorprotein-Komplex kommt damit eine Schlüsselrolle in der Chemotaxis der Zellen zu.

Ecay et al. isolierten aus Epithelgeweben verschiedener Herkunft (Rinderatemwege, Rinderniere, Rattenniere) und den humanen Zelllinien der Atemwege T84, 16HBE und MDCK ein ca. 200 kDa Protein, das mit intrazellulären Membranvesikeln assoziiert war [327]. Diese Vesikel sind vor allem in Chlorid-Kanälen angereichert, die an der Neurotransmission, Muskelkontraktion, Osmoregulation, Salz- und Wasseraustausch und pH-Regulation eine wichtige Rolle spielen. Sequenzanalyse und nachfolgende spezifische Antikörperreaktionen identifizierten das Protein eindeutig als nichtmuskuläres Myosin IIA mit einer intrazellulären Verteilung im Cytoplasma oder neben der Plasmamembran [328]. In Kombination mit den Vesikeln könnte Myosin II auch hier die Aufgabe eines Motorproteins übernehmen, das die Membranvesikel zur Plasmamembran transportiert [327].

Die Annahme einer Bindung von sCD163 und Myosin wird dadurch unterstützt, dass Myosin neben der bekannten Regulation durch Phosphorylierung auch nicht-kovalent durch Interaktion mit Proteinen reguliert werden kann. Sowohl die Bindung an Aktin als auch eine Interaktion des Myosin II mit anderen Proteinen scheint ein wichtiger Regulationsmechanismus für Myosin II *in vivo* zu sein [329]. Somit kann Myosin II durch Moleküle reguliert werden, die Myosin II-Filamente stabilisieren, beeinflussen oder auflösen können. Ein Beispiel für diese Bindung ist das vor allem in metastasierenden und freibeweglichen Zellen stark exprimierte Protein S100A4, auch Calvasculin oder Metastasin genannt. Dieses Protein reguliert die Beweglichkeit von Myosin II über eine dynamische Regulation der Polymerisation und Phosphorylierung [330]. Über eine S100A4 vermittelte Myosinregulation kann auch Zellformung und Beweglichkeit bestimmt werden [331]. Ein weiteres Protein, das 127 kDa schwere Tumorsuppressor Protein p127 aus *Drosophila melanogaster* wurde ebenfalls als nicht-kovalenter Bindungspartner für nichtmuskuläres Myosin IIA identifiziert [332]. Durch eine mit p127 assoziierte Serin-Kinase konnte die Bindung zwischen Myosin und p127 zerstört und ein Ablösen des Myosins vom membranären Cytoskelett bewirkt werden. Der zelluläre Mechanismus, der einer Verbindung beider Proteine zugrunde liegt, konnte bisher nicht aufgeklärt werden.

Durch seine antiproliferative Wirkung auf aktivierte T-Lymphocyten konnte dem sCD163 eine cytokinähnliche Funktion zugewiesen werden. Wie Cytokine wirkt es als

Kommunikator zwischen Zellen, stellt aber nicht das eigentliche Effektorprotein dar. sCD163 wird durch einen bisher unbekanntem Mechanismus in T-Lymphocyten aufgenommen. Obwohl eine geringe Menge des sCD163 auch in unstimulierte Zellen gelangte, fand nach Stimulation der T-Lymphocyten, zum Beispiel durch Phorbol ester als exogenes Entzündungsstimulanz, eine deutliche Steigerung der Aufnahme statt. Innerhalb der Zelle wurde sCD163 in Abhängigkeit von der Aktivierung der Zelle an das nichtmuskuläre Myosin IIA gebunden. Die selektive und feste Bindung der beiden Proteine konnte in eigenen Versuchen quantitativ mittels eines neu entwickelten ELISA bewiesen und mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden. Lokalisiert war der Komplex aus Myosin und sCD163 vor allem im Cytoplasma nahe der inneren Zellmembran und in Bereichen um den Zellkern. Vergleiche mit dem Verteilungsmuster beider Proteine innerhalb unstimulierter T-Zellen haben außerdem gezeigt, dass es innerhalb der Zellen zu einer Umverteilung der beiden Komponenten des Komplexes kommt.

Voraussetzung für die antiproliferative Wirkung des sCD163 scheint die Bildung des Komplexes mit dem Myosin zu sein. Trotz allem kann nicht ausgeschlossen werden, dass sCD163 und Myosin nicht direkt aneinander binden. Durch den hier beschriebenen Versuchsaufbau konnte gezeigt werden, dass eine Bindung zwischen den Proteinen zustande kommt, nicht jedoch, ob die Bindung direkt oder indirekt über ein zwischengeschaltetes Adapterprotein zustande kommt.

4 *In-vitro*-Untersuchungen zur Stimulation der Expression von CD163 durch Steroidhormone

Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* haben gezeigt, dass CD163 auf der Oberfläche von Monocyten/Macrophagen durch Stimulation mit Glucocorticoiden exprimiert und damit heraufreguliert werden kann [32, 36, 306]. Die einzelnen Glucocorticoide unterscheiden sich in der Effizienz der Induktion hinsichtlich Art und Dosierung [37].

Bereits auf der Oberfläche isolierter Monocyten von gesunden Personen wurde eine geringe Expression des CD163 gefunden [32]. Dieser konstitutive CD163-Anteil basierte auf der Heraufregulation des Proteins durch endogene Substanzen. Untersuchungen der Stimulation von Monocyten durch Hydrocortison im Vergleich zu Dexamethason zeigten für das endogene Glucocorticoid nur eine sehr geringe stimulierende Aktivität [64]. Bei der Suche nach weiteren stimulierend wirkenden Verbindungen auf die Expression des CD163 untersuchten Sulahian et al. verschiedene pro- und antiinflammatorische Cytokine [40]. Es zeigte sich, dass Interleukin-10 (IL-10) ebenfalls in der Lage war, eine Heraufregulation des CD163 auf der Zelloberfläche zu bewirken. IL-10 ist ein antiinflammatorisches Cytokin, das seine Wirkung über die Hemmung der Expression verschiedener proinflammatorischer Cytokine und durch Unterdrückung der Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung durch Inhibierung der Expression des *Major histocompatibility complex* Klasse II (MHC II), B7-1 und B7-2 ausübt [333-335]. Von Sulahian et al. konnte gezeigt werden, dass die Kombination eines Glucocorticoids mit IL-10 zu einem synergistischen Effekt auf die Expression des CD163 führte [40]. Der Zusatz eines gegen IL-10 gerichteten Antikörpers unterdrückte die IL-10-Wirkung, hatte jedoch auf die glucocorticoidinduzierte Expression keinen Einfluss. Daraus wurde geschlossen, dass für die Induktion der CD163-Expression unterschiedliche Mechanismen existieren. Gemeinsam ist den bisher als Stimulatoren der Expression identifizierten Verbindungen, dass sie antiinflammatorisch auf das Immunsystem wirken.

Eine weitere endogene Verbindung, der immunregulatorische Wirkungen zugeschrieben wird, ist das Nebennierenrindenhormon Dehydroepiandrosteron (DHEA).

Das als Vorform der männlichen und weiblichen Sexualhormone Testosteron und Estradiol bekannte DHEA zeigte in verschiedenen Untersuchungen antiinflammatorische Eigenschaften, wobei sich der Wirkmechanismus stark von dem der Glucocorticoide unterschied [336]. Während Glucocorticoide über eine Suppression des Immunsystems

wirken, führt DHEA zu einer Heraufregulation der Immunantwort. Dadurch konnte ein effektiver Schutz des Körpers vor Infektionen gezeigt werden.

DHEA wird im Körper zu weiteren aktiven Verbindungen metabolisiert. In Untersuchungen der Expression des CD163 über die Antigendichte auf der Zelloberfläche sollte der Einfluss des DHEA und seiner aktiven Metabolite als endogene Hormone mit Wirkung auf das Immunsystem hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht werden, die Expression von CD163 auf der Zelloberfläche zu stimulieren.

4.1 Dehydroepiandrosteron (DHEA) und seine Metabolite

Dehydroepiandrosteron (3β -Hydroxy-5-androsten-17-on, DHEA) ist ein endogenes Hormon, das vor allem in der Zona reticularis der Nebennierenrinde synthetisiert und sekretiert wird. Des Weiteren ist auch bekannt, dass das menschliche Gehirn mit Enzymen für die DHEA-Synthese ausgestattet ist [337]. DHEA reagiert nach Sekretion rasch weiter zum sulfonsäurekonjugierten Ester Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEA-S), der die im Körper zirkulierende Form des DHEA darstellt [338]. DHEA-S weist nur geringe biologische Aktivität auf und wird in den Zielzellen durch eine Sulfatase wieder in DHEA umgewandelt [339]. Mengenmäßig repräsentieren DHEA/DHEA-S den hauptsächlichen Hormonanteil der Nebennierenrinde [340, 341] (Abb. 58).

De novo erfolgt die Synthese des DHEA aus Cholesterol unter Einfluss verschiedener endogener Faktoren, wie dem *Corticotropin releasing hormone*, Adrenocorticotropin, Wachstumsfaktoren und Cytokinen [342, 343]. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Synthese durch verschiedene exogene Verbindungen, wie den Arzneistoffen Dexamethason, Phenytoin oder Carbamazepin, beeinflusst werden kann [343].

DHEA ist das Vorläuferhormon von Androgenen und Estrogenen, wie Testosteron oder Estradiol (Abb. 58). Die Bildung dieser Metabolite findet in den peripheren Geweben statt, wobei das Hauptzielgewebe die Gonaden sind.

Die Wirkung des DHEA erfolgt entweder direkt durch Interaktion mit einem Rezeptor oder indirekt über seine Metabolite [338]. Die Umwandlung des DHEA zu aktiven Verbindungen ist in den Zellen lokalisiert, in denen der Metabolit seine Wirkung entfaltet [344]. Über spezifische Rezeptoren von DHEA ist nur wenig bekannt [345] und obwohl hohe Bindungsaffinitäten des DHEA an cytosolische Rezeptorproteine festgestellt werden konnten

[346-349], wurde kein DHEA-Rezeptor isoliert. Von Chen et al. wurde kürzlich eine hohe Affinität des DHEA zum Estrogen-Rezeptor und eine niedrige Affinität zum Androgen-Rezeptor ermittelt [350].

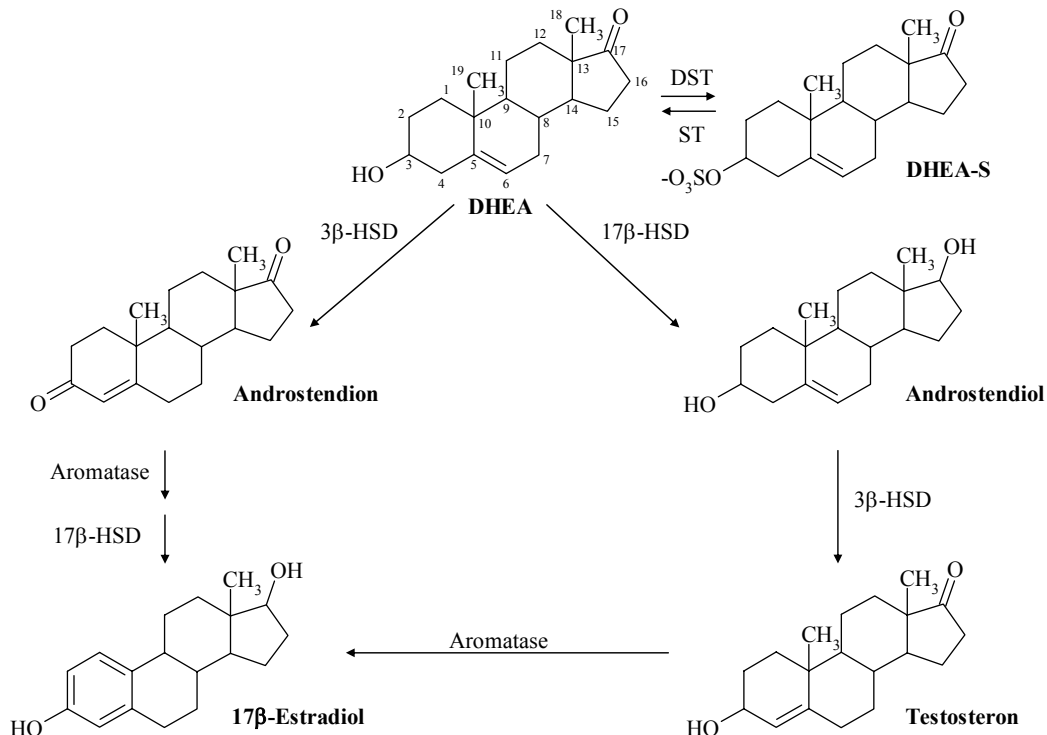


Abb. 58: Schematische Darstellung von DHEA/DHEA-S und seiner physiologisch relevanten Metabolite (modifiziert nach Beck und Handa [351]). DST: Dehydroepiandrosteron-Sulfotransferase; ST: Sulfatase; 3β-HSD: 3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase; 17β-HSD: 17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase.

Die im Körper zirkulierende Konzentration an DHEA/DHEA-S ändert sich im Laufe des Lebens. Mit zunehmendem Alter nimmt die Gesamtkonzentration beim Menschen ab [341, 352], wobei diese Abnahme wahrscheinlich auf einer gleichzeitigen Reduktion der Größe der Zona reticularis beruht [353]. Physiologische DHEA-Konzentrationen beim Menschen liegen in einem Bereich von 0,013 bis 0,024 μM , während die DHEA-S-Spiegel bei 2,5 bis 7,5 μM liegen [354].

Neben der Funktion als Prohormon von männlichen und weiblichen Sexualhormonen entfaltet DHEA auch eigene physiologische Wirkungen. In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei inflammatorischen Erkrankungen, wie Rheumatoider Arthritis [355, 356], systemischem Lupus erythematosum [357, 358] oder progressiver systemischer Sklerose [359], niedrige DHEA-Serumspiegel vorliegen. Bei diesen entzündlichen Erkrankungen korrelierte die Serumkonzentration des DHEA indirekt mit dem Schweregrad der Entzündung [356, 357, 359]. Die antiinflammatorischen Effekte des DHEA

bei chronischen Erkrankungen liegen wahrscheinlich in einer Inhibierung des *Nuclear factor kappa B* (NF- κ B) begründet [346, 360]. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass DHEA die Produktion verschiedener proinflammatorischer Cytokine, wie IL-6 oder TNF- α , von verschiedenen Zelltypen inhibiert [339, 361-364].

Die Biotransformationsprodukte des DHEA Androstendiol [339, 365], Androstendion, Androgene und Estrogene [366] spielen ebenfalls eine Rolle in der Immunantwort und zeigten zum Teil sogar ausgeprägtere [366-368] oder entgegengesetzte Wirkungen [369] auf den Entzündungsprozess als die Ausgangssubstanz DHEA.

4.2 Prinzip der Bestimmung

Da DHEA als Prohormon in den entsprechenden Zielzellen rasch in seine Metabolite umgewandelt werden kann, sollte neben dem Einfluss des DHEA auf die CD163-Expression auch der Einfluss einiger Metabolite untersucht werden. In die Bestimmung miteinbezogen wurden deshalb das Androstendiol, Androstendion sowie Testosteron und 17 β -Estradiol (Abb. 58). Zum Vergleich der Effektivität mit den bereits als Stimulanzen bekannten Glucocorticoiden wurde das endogene Hydrocortison (HC) eingesetzt.

Die Bestimmung erfolgte mittels Durchflusszytometrie, wobei nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden mit dem jeweiligen Hormon über die Antigendichte auf der Zelloberfläche der exprimierte CD163-Anteil ermittelt wurde. Da bekannt ist, dass gepoolte humane Monocyten/Macrophagen auch ohne Zusatz weiterer Stimulanzen nach einer gewissen Inkubationszeit CD163 auf ihrer Oberfläche exprimieren, wurden zur Auswertung der hormoninduzierten Expression des CD163 unstimulierte Monocyten vermessen.

Über einen spezifischen CD163-Antikörper wurde CD163 mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, dessen Fluoreszenzintensität bei der durchflusszytometrischen Analyse bestimmt wurde (Experimenteller Teil, 3.3).

4.3 Stimulation der Expression von CD163 durch Dehydroepiandrosteron (DHEA) und dessen Metabolite

Da die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Menge des gebundenen fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpers ist, erfolgte die Auswertung der hormoninduzierten Expression des CD163 aus der Verschiebung der Intensität im Vergleich zu unstimulierten Zellen (Abb. 59). Die untersuchten Hormone wurden in einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-7}$ M in Anlehnung an die physiologische Konzentration des Gesamt-Hydrocortisons eingesetzt (morgens: $1,38$ bis $6,3 \cdot 10^{-7}$ M nach Thomas [354]).

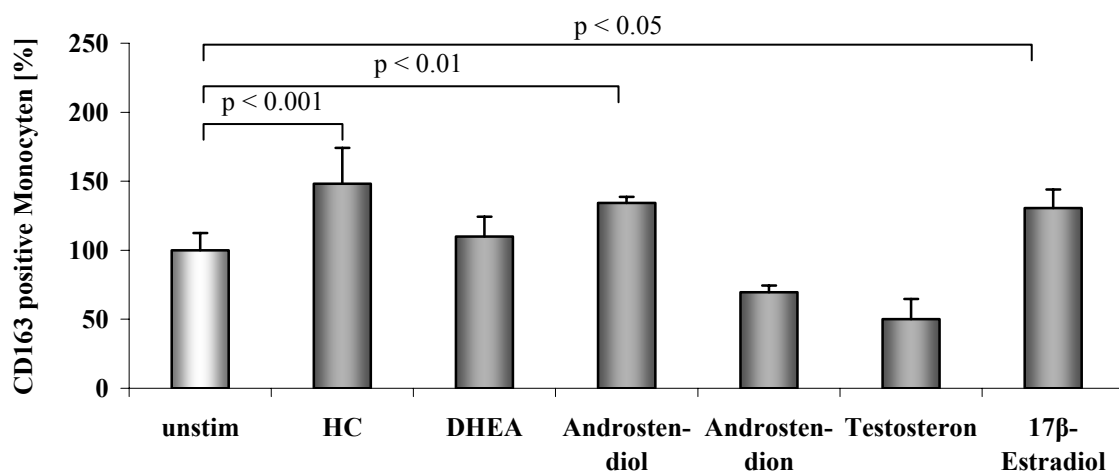


Abb. 59: Expression von CD163 [%] auf der Oberfläche humaner Monocyten nach Stimulation der Zellen mit den Steroidhormonen ($2 \cdot 10^{-7}$ M) Hydrocortison (HC), Dehydroepiandrosteron (DHEA), Androstendiol, Androstendion, Testosteron und 17β -Estradiol im Vergleich zu unstimulierten Zellen (unstim). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von Sechsfachbestimmungen. Statistische Signifikanz bezogen auf die Expression der unstimulierten Zellen für $p < 0,05$, keine statistische Signifikanz zu den unstimulierten Zellen (unstim) für $p > 0,05$ (*) (ANOVA, Tukey's Test).

Nach einer Inkubationszeit der Zellen von 48 Stunden konnte für die unstimulierten Zellen (unstim) ein Anteil CD163-positiver Zellen von $26,2 \pm 3,3$ % ermittelt werden. Dieser Anteil wurde als konstitutiv von den Monocyten exprimiertes CD163 auf den Bezugswert von 100 % gesetzt. Die Expression der Zellen nach Hormonstimulation wurden prozentual jeweils auf die unstimulierten Zellen bezogen.

Durch Stimulation der Monocyten mit Hydrocortison (HC) in physiologischer Konzentration wurde auf der Oberfläche der analysierten Zellen ein CD163-Anteil von $148,2 \pm 26,1$ % detektiert. Damit war die Gesamtexpression nach Stimulation mit dem Glucocorticoid um circa 50 % stärker ausgeprägt als die der unstimulierten Zellen.

Die physiologischen Plasmakonzentrationen des DHEA und seiner Metabolite sind im Vergleich zum HC niedriger, so dass in der Untersuchung der Stimulation der CD163-Expression suprphysiologische Konzentrationen dieser Hormone untersucht wurden.

Der Referenzbereich der DHEA-Konzentration im Plasma liegt beim Erwachsenen zwischen $0,13$ bis $0,24 \cdot 10^{-7}$ M DHEA [354]. Die in den eigenen Versuchen eingesetzte DHEA-Konzentration lag somit um das Zehnfache über der physiologischen Konzentration. Nach Inkubation der Zellen mit DHEA konnte kein signifikanter Unterschied in der Antigendichte im Vergleich zu den unstimulierten Zellen beobachtet ($110,0 \pm 14,4$ %) werden. Da im Körper allgemein niedrigere Konzentrationen auftreten ist es unwahrscheinlich, dass DHEA einen Einfluss auf die CD163-Expression hat.

Die Metabolite des DHEA wiesen unterschiedliche Einflüsse auf die Expression des CD163 auf. Diese Unterschiede variierten zum einen unter den Metaboliten selber und waren verschieden von der Ausgangssubstanz DHEA.

Als potente Stimulatoren der Expression des CD163 bei einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-7}$ M erwiesen sich Androstendiol und 17β -Estradiol. Mit einem prozentualen Anteil von $134,2 \pm 4,6$ %, respektive $130,6 \pm 13,5$ %, CD163-positiver Monocyten wurde eine Expression des Proteins erreicht, die sich der Expression nach HC-Behandlung annäherte. Während für Androstendiol in der Literatur keine physiologischen Konzentrationswerte publiziert sind, wurden für 17β -Estradiol Spitzenkonzentrationen im Plasma von $0,02 \cdot 10^{-7}$ M in der Ovulationsphase detektiert [354], die bereits 100fach niedriger ist als die in diesem Versuch eingesetzte Konzentration. Neben diesen maximalen Konzentrationen weist 17β -Estradiol im Allgemeinen Konzentrationen unter $0,01 \cdot 10^{-7}$ M auf [354], so dass auch für dieses Hormon ein direkter Einfluss *in vivo* in dieser Intensität fraglich ist und weiterer Untersuchungen bedarf.

Im Gegensatz zum stimulierenden Effekt des Androstendiols und 17β -Estradiols bei einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-7}$ M lag die Anzahl CD163-positiver Zellen nach Inkubation mit Androstendion und Testosteron sogar unterhalb des exprimierten Anteils der unstimulierten Zellen. Demnach wurde durch die Behandlung der Zellen mit diesen beiden Substanzen die übliche ohne weiteren Zusatz ablaufende Expression sogar unterdrückt. Im Vergleich mit den physiologischen Konzentrationen der beiden Hormone (Androstendion: Männer: $0,02$ bis $0,13 \cdot 10^{-7}$ M, Frauen: $0,01$ bis $0,12 \cdot 10^{-7}$ M; Testosteron (gesamt): Männer: $0,1$ bis $0,35 \cdot 10^{-7}$ M, Frauen: $0,002$ bis $0,03 \cdot 10^{-7}$ M [370]), die um ein Hundertstel bis Tausendstel niedriger

sind als die in diesem Versuch eingesetzte Konzentration, ist jedoch auch für diese Verbindungen ungewiss, ob dieser Effekt auch *in vivo* ausgelöst wird.

Für stark erhöhte Konzentrationen der Steroidhormone konnten in den Untersuchungen zur Stimulation der Expression des CD163 auf humanen Monocyten damit für DHEA und seine Metabolite unterschiedliche und zum Teil entgegengesetzte Ergebnisse erhalten werden.

Gegensätzliche Wirkungen der C₁₉-Steroide wurden bereits in anderen Untersuchungen beobachtet. Padgett und Loria fanden in einer Macrophagenzelllinie unterschiedliche und entgegengesetzte Auswirkungen in der Cytokinproduktion dieser Zellen nach Inkubation mit DHEA und zwei seiner Metabolite [339]. Nach Stimulation der Zellen mit DHEA in verschiedenen Konzentrationen wurde die Produktion von IL-1, IL-6 und TNF- α kaum beeinflusst. Im Gegensatz dazu wurde für die beiden Metabolite Androstendiol und Androstentriol eine deutliche Stimulation der Cytokinproduktion detektiert. Vor allem das Androstentriol, das in den eigenen Versuchen nicht eingesetzt wurde, erwies sich als potenter Aktivator der Sekretion von TNF- α und IL-6. Als Begründung für diese kontroversen Effekte des DHEA und seiner Metabolite wurde diskutiert, dass Macrophagen keine Zielzellen des DHEA sind [339]. Möglicherweise existieren auf diesen Zellen ausschließlich Rezeptoren für die Metabolite des DHEA, wodurch die fehlende Wirkung des DHEA im Vergleich zu Androstendiol und -triol erklärt werden könnte. Für eine Wirkung auf die entsprechenden Zellen, wie Macrophagen oder auch Lymphocyten, ist folglich die Umwandlung zu aktiven Metaboliten notwendig.

Ebenfalls unterstützt wird die Annahme der biologischen Aktivität der Metabolite des DHEA durch die Beobachtung, dass immunologische Wirkungen des DHEA auf die Freisetzung der proinflammatorischen Cytokine IL-2 und IL-3 ausschließlich nach subkutaner Applikation erreicht wurden, nicht jedoch nach intravenöser oder intrapleuraler Gabe [371]. Es ist bekannt, dass die Haut ein für die Metabolisierung notwendiges Enzym, die 7 β -Hydroxylase, enthält [372-374]. Über dieses Enzym kann DHEA zu 7-Hydroxy-DHEA umgesetzt werden, das die eigentliche Wirkform darstellt. Theoretisch wäre dieser Metabolisierungsschritt auch in Monocyten möglich. Bezogen auf die eigenen Ergebnisse, in denen das Androstendiol die wirksame Form darstellte, DHEA selbst aber keinen Effekt zeigte, schien diese Metabolisierung jedoch nicht oder noch nicht stattgefunden zu haben oder die generierte Androstendiolkonzentration war zu gering, um eine Expression zu bewirken.

Trotz der allgemeinen Kenntnis, dass DHEA und seine Metabolite antiglucocorticoide Wirkungen besitzen [375], wurde in den Versuchen zur Stimulation der Expression von

CD163 auf der Monocytenoberfläche durch Androstendiol eine dem endogenen Glucocorticoid Hydrocortison vergleichbare Wirkung erzielt. Bei der Untersuchung der Ausbildung dendritischer Zellen aus Monocyten konnte von Canning et al. gezeigt werden, dass Zellen nach DHEA- oder Dexamethasonbehandlung zur Ausbildung sowohl gleicher als auch unterschiedlicher Antigene stimuliert werden können [376]. In den eigenen Versuchen wurde ausschließlich die Expression des CD163 betrachtet, so dass sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede in der Regulation dieses Antigens durch die Metabolite des DHEA und Glucocorticoide denkbar sind.

Eine ausgeprägte Stimulation der CD163-Expression wurde durch Inkubation der Zellen mit 17 β -Estradiol erreicht (Abb. 59). Für 17 β -Estradiol ist bekannt, dass es antiinflammatorisch in verschiedenen entzündlichen Geschehen, wie Wundheilung [377], Arteriosklerose [378] oder Uveitis [379], wirkt. Diese antiinflammatorische Wirkung wird über eine Inhibierung proinflammatorischer Enzyme und Hemmung der Zellaktivierung ausgeübt [39, 380]. Außerdem konnte eine 17 β -Estradiol-induzierte Herabregulation der Genexpression der inflammatorischen Cytokine TNF- α und IFN- γ beobachtet werden [381].

Da β -Estradiol-Rezeptoren auch in humanen Monocyten nachgewiesen wurden [382], könnte die Stimulation der CD163-Expression über die Bindung des β -Estradiols an diese Rezeptoren verlaufen. Von Mues et al. wurde in der humanen Plazenta ein gehäuftes Auftreten von CD163-positiven Macrophagen gefunden [34]. Zudem konnten von Paidas et al. bei Untersuchungen der Konzentration an sCD163 im Plasma schwangerer Frauen erhöhte Spiegel des antiinflammatorischen Proteins bestimmt werden [383]. Diese Erhöhung trat im ersten Trimester der Schwangerschaft auf, in dem es auch zu einem Anstieg der Hormonkonzentration des Estradiols kommt [384]. Möglicherweise ist eine erhöhte sCD163-Konzentration auf die Stimulation der CD163-Expression des verstärkt im Plasma vorhandenen Estradiols allein oder in Kombination mit Hydrocortison zurückzuführen.

Ein ähnlich stimulierender Effekt auf die Expression des CD163 während der Schwangerschaft wurde von Cranny et al. nachgewiesen [385]. Bei *In-vitro*-Untersuchungen humaner Monocyten konnte gezeigt werden, dass durch humanes Placenta-Lactogen die dexamethasoninduzierte Expression des CD163 auf der Zelloberfläche durch kombinierte Inkubation der Zellen mit dem Placenta-Lactogen verstärkt wurde. Humanes Placenta-Lactogen gehört zur Familie der Somatotropine und wird in der Regel nur während einer Schwangerschaft produziert. Im Gegensatz zum Estradiol, das *in vitro* auch separat zu einer Stimulation der CD163-Expression führte (Abb. 59), wurde von Cranny et al. kein

stimulierender Effekt auf die CD163-Expression festgestellt, wenn die Zellen ausschließlich mit dem Lactogen inkubiert wurden [385].

Prinzipiell stellt eine Schwangerschaft als Zusammenschluss zweier „semi-allogener“ Organismen, also dem Organismus der Mutter und des Fetus, eine große Herausforderung an das mütterliche Immunsystem dar. Dieser Zusammenschluss funktioniert nur, weil die zu erwartende Immunreaktion der Mutter auf das fremde Gewebe ausbleibt. Hierfür ist es notwendig, dass eine Immunsuppression gegenüber dem Fetus entwickelt wird, so dass Abstoßungsreaktionen verhindert werden. Beispiele für eine nicht erfolgreiche Immunsuppression sind die alloimmune neonatale Neutropenie [386, 387], Thrombopenie [387, 388] und Präeclampsie [389], wobei es sich jeweils um autogene Antikörperbildungen der Mutter gegen die von der väterlichen Seite vererbten Antigene des Fetus handelt. Auf Grund der verstärkten Expression des membranständigen CD163 [34] und der erhöhten Konzentrationen an sCD163 [383] ist es somit auch wahrscheinlich, dass sCD163 durch seine antiproliferative Wirkung auf T-Lymphocyten zu dieser geforderten Unterdrückung des Immunsystems beiträgt. Damit wird durch die Stimulation der CD163-Expression durch 17β -Estradiol eine erforderliche Immunsuppression während der Schwangerschaft unterstützt.

Von Wiener et al. wurde außerdem ermittelt, dass Zerstörung der Blutplättchen bei der allogenen neonatalen Thrombopenie auf Grund einer Komplexbildung von IgG mit dem Fc γ -Rezeptor auf Monocyten eine wichtige Rolle spielt [388]. Da diese Komplexbildung auch als Aktivator für die Freisetzung von sCD163 bekannt ist [105] könnte sCD163 als endogene Verbindung einer Aktivierung des Immunsystems entgegenwirken. Zusätzlich konnte für humane Granulocyten gezeigt werden, dass 17β -Estradiol in physiologischer Konzentration über eine Aktivierung der *Nitric oxide synthase* (NOS) eine verstärkte NO-Freisetzung in den Zellen bewirkte [390]. Für diese Aktivierung wurde eine verstärkte mRNA-Expression der konstitutiv vorhandenen cNOS ermittelt [391]. Daneben konnte von Stefano et al. ein Mechanismus identifiziert werden, der innerhalb von Minuten zur NO-Freisetzung führte und deshalb unabhängig von der Transkription verlaufen musste [390]. Zusätzlich wurde auch eine Abhängigkeit der estradiolinduzierten NO-Freisetzung durch intrazelluläres Calcium gezeigt. Wie in den Untersuchungen der endogenen Aktivatoren des Shedding von CD163 gezeigt, wirken sowohl NO als auch die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration stimulierend auf die Freisetzung von sCD163 (Allgemeiner Teil, 1.2.1.5.2). Somit könnte 17β -Estradiol nicht nur die Expression des CD163 stimulieren sondern gleichzeitig auch über eine NO-Bildung die Generierung des antiinflammatorischen sCD163 bewirken.

Ebenso wie für Estrogene sind antiinflammatorische Wirkungen auch für androgene Hormone anzunehmen. Durch Testosteron konnte eine Suppression des Immunsystems erreicht werden, wobei vor allem eine Inhibierung der Zellimmunität, der Synthese von Immunglobulinen und der Produktion der inflammatorischen Cytokine IL-4, -5 und Interferon- γ beobachtet wurde [392, 393].

Bei der Untersuchung der Induktion der CD163-Expression wiesen die Zellen nach Inkubation mit Testosteron eine Suppression der Expression des Proteins im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen auf. Damit konnte für den Einfluss auf die monocytäre CD163-Expression von Testosteron ein inverser Effekt zu anderen immunmodulatorischen Verbindungen, wie Glucocorticoiden und Estrogenen, ermittelt werden. Über eine entgegengesetzte Wirkung von Androgenen und Estrogenen auf das Immunsystem wurde bei entzündlichen Begleiterscheinungen der Arteriosklerose berichtet [394]. Burger und Dayer stellten bei der Untersuchung der Freisetzung proinflammatorischer Cytokine im Rahmen der Entstehung von Entzündungen bei Arteriosklerose eine Hypothese auf, nach der Estrogene in der Lage sind, die Freisetzung von IL-1, TNF- α oder IL-6 aus aktivierten Monocyten zu hemmen, während Androgene diesen Vorgang begünstigen. Diese Hypothese beruht auf dem unterschiedlichen Einfluss der Hormone auf die Synthese des Apolipoprotein A-I des *High density lipoprotein* (HDL). An Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Bildung dieses Apolipoproteins zu einer Reduktion der entzündlichen Vorgänge bei der Arteriosklerose führte [395, 396]. Hyka et al. ermittelten eine direkte Hemmung der Produktion von proinflammatorischen Cytokinen, wie IL-1 und TNF- α , durch Apolipoprotein A-I in humanen Zellen [397]. Die antiinflammatorische Wirkung des Apolipoproteins beruht dabei auf einer Hemmung der Assoziation von T-Lymphocyten mit Monocyten, so dass die Stimulation der Monocyten zur Freisetzung der entsprechenden Cytokine unterbunden wird [397]. Estrogene bewirken eine Erhöhung der Apolipoprotein A-I-Konzentration, Testosteron dagegen führt zu einer Abnahme der HDL-Konzentration und damit zu einer Abnahme des Apolipoprotein A-I und Blockade der Estrogenwirkung auf das Apolipoprotein [398-400]. Hohe Testosteronkonzentrationen stehen somit bei der Arteriosklerose für eine proinflammatorische und antiestrogene Wirkung [394].

Bei Betrachtung der Struktur-Wirkungs-Beziehung der untersuchten Hormone fallen Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede auf. Während das Vorläuferhormon des Testosterons, das Androstendiol, zu einer deutlichen Induktion der CD163-Expression führt, wurde die Expression durch das Testosteron unterdrückt (Abb. 59). Auf der anderen Seite des

Metabolisierungsweges des DHEA wurde die Expression durch das Androstendion unterdrückt, während das Estradiol zu einer Stimulation führt (Abb. 59). Allen stimulierend wirkenden Verbindungen gemeinsam ist das Vorhandensein einer Hydroxygruppe an Position 17 des Grundgerüsts, während Verbindungen mit einer Ketogruppe an C₁₇ die Expression unterdrückten. Dieses strukturelle Schema lässt sich auch auf das endogene Glucocorticoid Hydrocortison (Abb. 60) übertragen.

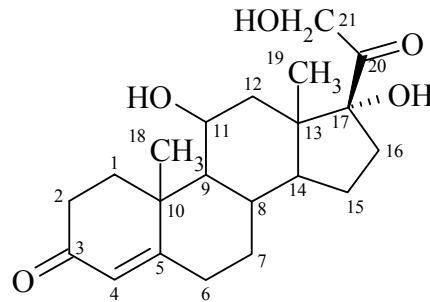


Abb. 60: Strukturformel des endogenen Glucocorticoids Hydrocortison (HC).

Die als potente Induktoren der CD163-Expression auf Monocyten/Macrophagen identifizierten synthetischen Glucocorticoide, wie Fluticasonpropionat oder Dexamethason, tragen an Position 17 eine Hydroxy-, Ester- oder eine Acetalgruppe. Für die Bindung der Glucocorticoide an ihrem Rezeptor ist bekannt, dass eine Hydroxygruppe an Position 17 für die Selektivität und Affinität der Steroide sehr wichtig ist [401]. Eine Veresterung oder Acetalisierung in Position 17 bewirkt eine deutliche Affinitätssteigerung des Glucocorticoids an seinen Rezeptor. Auf Grund dieser gemeinsamen Strukturmerkmale kann vermutet werden, dass die an Position 17 hydroxylierten Hormone Androstendiol und 17 β -Estradiol ihre Wirkungen durch unspezifische Bindungen am Glucocorticoidrezeptor ausüben. Von Muller et al. konnte bereits gezeigt werden, dass DHEA und zwei seiner Metabolite, das 7 α - und 7 β -Hydrodroxy-DHEA, keine Affinität zum Glucocorticoidrezeptor aufweisen [402]. Wie Androstendion und Testosteron weisen diese Verbindungen eine Ketogruppe am C₁₇ auf, deren Präsenz möglicherweise zu einem Aufheben der Affinität an den Glucocorticoidrezeptor führt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in den eigenen Untersuchungen zur Induktion der Expression des CD163 auf der Oberfläche humaner Monocyten und Macrophagen weitere hormonelle Verbindungen als Aktivatoren identifiziert werden konnten. DHEA als Ausgangsverbindung der untersuchten Hormone zeigte keine Wirkung auf das CD163, der Metabolit Androstendion und das androgene Testosteron unterdrückten die

Expression des CD163 und führten somit zu einer geringeren Expression ohne Zusatz von hormonellen Stimulanzen. Die Metabolite Androstendiol und Estradiol erwiesen sich dagegen bei gleicher Konzentration ähnlich potent in ihrer Wirkung wie das endogene Glucocorticoid Hydrocortison.

Die Untersuchungen der Expression des CD163 durch DHEA und seine Metabolite wurden in supraphysiologischen Konzentrationen in Anlehnung an die physiologische Hydrocortisonkonzentration durchgeführt. Es bleibt zu untersuchen, ob diese Wirkungen der Hormone auch bei physiologischen Konzentrationen vorhanden sind und ob diese Wirkungen auf die Stimulation, respektive Suppression, der Expression noch gesteigert werden können.

C. Experimenteller Teil

1 Häufig verwendete Puffer

Isotonischer Phosphatpuffer, PBS (Biochrom, Berlin)	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
	8,1 mM	Na ₂ HPO ₄
	136,9 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
		pH 7,4
Lysepuffer	0,1 %	N-Octyl-β,D-thioglucopyranosid
	1 mM	CaCl ₂
	1 Tbl.	Complete Mini [®] , EDTA free in PBS

2 Zellkultur

2.1 Reagenzien für die Zellkultur

2.1.1 Trennlösungen für die Dichtezentrifugation

Biocoll-Trennlösung (Biochrom, Berlin)	Polysucrose 400 Amidotrizoesäure Dichte (20 °C): 1,077 g/ml (isoton)
Percoll-Trennlösung (Pharmacia, Freiburg)	Silicium Überzug: nicht-dialysiertes PVP Dichte (20 °C): 1,13 g/ml (hyperosmolar)
Percoll-Mischung	45 % Percoll 5 % Earle's Salzlösung 10x 50 % MEM-Spinner (komplett)

2.1.2 Medien und Seren

Fötales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert 56 °C, 30 min (Biochrom, Berlin)

MEM-Trockenmedium mit "spinner" Salzen (Biochrom, Berlin),
nach Rekonstitution: pH 7,4

McCoy's 5 A mod. Flüssigmedium (Biochrom, Berlin)

RPMI 1640, mit 2,0 g NaHCO₃, 5 mg/l Phenolrot, ohne L-Glutamin (Biochrom, Berlin)

Vor Verwendung wurden die Medien mit folgenden Zusätzen ergänzt:

MEM-Spinner (komplett):	1 %	Penicillin/Streptomycin
	1 %	nicht essentielle Aminosäuren
	2 mM	L-Glutamin
		in rekonstituiertem MEM-Trockenmedium mit „spinner“ Salzen
McCoy's Kompletmedium:	15 %	FCS
	1 %	Penicillin/Streptomycin
	2 mM	L-Glutamin
		in McCoy's 5 A mod. Flüssigmedium
RPMI 1640 (komplett):	10 %	FCS
		in RPMI 1640

2.1.3 Stimulanz für die CD163 Expression

Fluticasonpropionat (GlaxoSmithKline, Greenford UK)

Stammlösung: 10⁻⁵ M Fluticasonpropionat in Ethanol abs.

2.1.4 Sonstige Reagenzien für die Zellkultur

Penicillin/Streptomycin 10000 IE (10000 µg/ml) (Biochrom, Berlin)

Nicht essentielle Aminosäuren (Biochrom, Berlin)

L- Glutamin (Biochrom, Berlin)

Trypanblau-Lösung, 0,4 % in PBS (Fluka, Taufkirchen)

Earle's Salzlösung 10x	6,8 g/l	NaCl
	0,4 g/l	KCl
	0,14 g/l	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O
	0,2 g/l	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
	0,2 g/l	CaCl ₂
	1,0 g/l	D-Glucose
	0,008 g/l	Phenolrot

Ethanol abs. (Sigma, Taufkirchen)

N-Octyl- β ,D-thioglucopyranosid (Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg)

Calciumchlorid (Merck, Darmstadt)

Complete Mini[®], EDTA free (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

2.2 Geräte und Materialien für die Zellkultur

Sterilbank	Laminar Air Flow	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Zentrifugenröhrchen	50 ml aus PE	Karl Roth GmbH, Karlsruhe
	Oak-Ridge-Zentrifugenröhrchen	Merck, Darmstadt
Zentrifuge	Megafuge 1.OR	Kendro, Hanau
Zählkammer	Neubauer improved, Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm ²	Superior, Marienfeld
Mikroskop	Inverted Microscope ECLIPSE TS100	Nikon, Düsseldorf
Kulturplatten	Multiwell [™] Tissue Culture Plate	Becton Dickinson, New Jersey USA
Kulturflaschen	NUNCLON [™] Surface	NUNC [™] Brand Products, Dänemark
Inkubator	Hera Cell Inkubator	Kendro, Hanau
Spritzen	BD Discardit [™] II, 10 ml, steril	Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden
Dreiwegehähne	BD Connecta [™] Plus 3	Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden
Nylon-Wolle	Nylon Wool Fiber Combed, scrubbed	Kisker GmbH, Steinfurt
Zellkratzer	Costar [®] Cell Scraper, steril	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Rotationsrad	Durchmesser 340 nm, 10 Upm	Konstruktion der Werkstatt des Instituts

2.3 Isolierung humaner Monocyten

Humane Monocyten wurden aus Blutzellsuspensionen (Bayerisches Rotes Kreuz) isoliert. Diese Suspensionen enthielten die bei Plasmaspenden abgetrennten Erythrocyten, Leukocyten und Thrombocyten in einem Puffer und wurden vom Bayerischen Roten Kreuz durch Ausspülen von Leukocytendepletionsfiltern gewonnen. Leukocytendepletionsfilter bestehen aus Polyesterfasern, die in bestimmter Packungsdichte gepresst werden, so dass Poren definierter Größe entstehen. Die Leukocyten werden in den Filtern aufgrund verschiedener Mechanismen zurückgehalten. Seit 1997 ist die Leukocytendepletion bei Blutspenden Pflicht, um Immunreaktionen und Übertragung zellständiger Erreger bei Transfusionen zu vermeiden [403].

Die Isolierung der Monocyten erfolgte über zwei unterschiedliche Dichtezentrifugationen. Der erste Gradient, eine Polysucrose 400 Polymerlösung der Dichte 1,077 g/ml (Biocoll), bewirkte eine Sedimentierung der Erythrocyten und Granulocyten. Die übrigen Zellen Monocyten, Lymphocyten und Thrombocyten, die eine geringere Dichte haben, konzentrierten sich als scharfe Bande im oberen Drittel des Gradienten [404]. Die Abtrennung der Thrombocyten erfolgte durch Zentrifugation bei niedriger Geschwindigkeit (169 x g). Über einen zweiten Gradienten, bestehend aus einer Percoll-Mischung mit einer Dichte von 1,3 g/ml erfolgte eine Trennung in Monocyten und Lymphocyten [405].

Die Blutzellsuspensionen mehrerer Spender wurden gepoolt und durch Zentrifugation (604 x g, 20 min, RT, ohne Bremse) auf 1/3 des Ausgangsvolumens eingengt. Zur Bildung des ersten Gradienten wurden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen 20 ml Biocoll-Lösung mit 30 ml der konzentrierten Blutzellsuspension überschichtet und zentrifugiert (604 x g, 40 min, RT, ohne Bremse). Monocyten, Lymphocyten und Thrombocyten wurden mit einer sterilen Messpipette abgenommen und in MEM-Spinner (komplett) resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit jeweils 50 ml MEM-Spinner (komplett) gewaschen und zentrifugiert (353 x g, 10 min, RT). Durch Zentrifugation bei niedriger Geschwindigkeit (169 x g, 10 min, RT) wurden die Thrombocyten abgetrennt. Vor der zweiten Gradientenzentrifugation ist eine Präformierung der Percoll-Mischung durchzuführen. Hierfür wurden in einem Oak-Rich-Zentrifugenröhrchen 30 ml der Percoll-Mischung bei 3345 x g (60 min, RT, ohne Bremse) zentrifugiert. Dabei bildet sich ein hypotonischer, kontinuierlicher Dichtegradient von 1 g/ml bis 1,3 g/ml aus. Dieser wurde dann mit jeweils 3 ml einer Suspension aus $5 \cdot 10^8$ mononuklearen Zellen in MEM-Spinner (komplett) überschichtet. Mittels Zentrifugation bei 1011 x g, 25 min, RT, ohne Bremse, konnte eine Trennung der

Monocyten von den Lymphocyten in zwei scharf begrenzte Banden erreicht werden, wobei die Monocyten auf Grund ihrer geringeren Dichte die obere Bande repräsentieren. Die Zellen dieser Bande wurden abgenommen und dreimal mit MEM-Spinner (komplett) gewaschen. Nach dem dritten Waschschrift wurde, wie unter 2.6 beschrieben, die Zellzahl der verbliebenen Monocyten bestimmt. Zur Kultivierung der Zellen wurden diese in einer Dichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen/2 ml McCoy's Kompletmedium in sterile 24-Loch-Platten oder $1 \cdot 10^8$ Zellen/50 ml McCoy's Kompletmedium in sterile Kulturflaschen eingesetzt.

2.4 Isolierung humaner T-Lymphocyten

Bei der Gewinnung von T-Lymphocyten wurden die unterschiedlichen Adhäsionseigenschaften der Lymphocyten ausgenutzt. Die Trennung der bei der Dichtezentrifugation erhaltenen Lymphocytenfraktion erfolgte mittels einer Nylonwolle-Säule [406]. Sterile 10-ml Spritzen wurden mit je 1 g Nylonwolle gefüllt und mit einem 3-Wege Hahn versehen. Anschließend wurden die Spritzen mit 50 ml RPMI 1640 (komplett) äquilibriert. Das RPMI 1640 (komplett) Medium wurde hierfür und bei allen folgenden Anwendungen auf eine Temperatur von 37 °C gebracht. Nach dem Äquilibrieren wurde das Medium vollständig ablaufen gelassen. Der Dreiwegehahn wurde verschlossen und 3 ml frisches Medium auf die Spritze gegeben. Anschließend wurden die Spritzen verschlossen und aufrecht für 45 min bei 37 °C und 6 % CO₂-Begasung inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium wieder vollständig ablaufen gelassen und der Hahn geschlossen.

Bei der Dichtezentrifugation über den Percoll-Gradienten stellt die untere Bande die Lymphocytenfraktion dar. Die Lymphocyten wurden mit einer sterilen Pipette abgenommen und jeweils 1 ml der Zellsuspension auf eine Spritze gegeben. Durch kurzes Öffnen des Dreiwegehahns wurde die Zellsuspension vollständig in die Nylonwolle einsickern gelassen. Um sicherzustellen, dass alle Zellen mit dem Säulenmaterial in Berührung gekommen sind, wurden noch einmal 1 ml RPMI 1640 (komplett) Medium auf die Spritze gegeben und ebenfalls einsickern gelassen. Um ein Austrocknen der Säule während der nachfolgenden Inkubation zu vermeiden wurden 3 ml RPMI 1640 (komplett) Medium auf die Säule pipettiert und die Spritze wieder verschlossen. Die Spritzen wurden 45 min bei 37 °C und 6 % CO₂-Begasung inkubiert. Während dieser Inkubation adhären die B-Lymphocyten an die Nylonwolle. Die nicht-adhären T-Lymphocyten wurden mit 50 ml RPMI 1640 (komplett)

Medium von der Säule gespült und in 50 ml PE Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Wie unter 2.6 beschrieben wurde die Zellzahl bestimmt und in einer Dichte von $1 \cdot 10^8$ Zellen/50 ml RPMI 1640 (komplett) in NUNCLON™ Surface Kulturflaschen eingesetzt.

2.5 Stimulation der Monocyten zur CD163-Expression

Monocyten der Dichte $2 \cdot 10^6$ Zellen/2 ml McCoy's Kompletmedium wurden mit 10^{-8} M Fluticasonpropionat stimuliert [36]. Anschließend wurden die Zellen für 48 Stunden bei 37°C , 100 % Luftfeuchtigkeit und 6 %iger CO_2 -Begasung inkubiert.

2.6 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl in einer Zellsuspension sowie zur Unterscheidung lebender und toter Zellen wurde ein Aliquot der Suspension entnommen und je nach Zelldichte 1:10 oder 1:100 mit Trypanblau-Lösung verdünnt. Die Verdünnung wurde auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Im Lichtmikroskop (400fache Vergrößerung) wurden die Zellen in vier Großquadranten gezählt und der Mittelwert gebildet. Die Verdünnung wurde so gewählt, dass mindestens 12 und maximal 50 Zellen pro Großquadrant ausgezählt werden konnten. Während lebende Zellen in der Lage sind den Farbstoff auszuschließen und unter dem Mikroskop hell erscheinen, nehmen tote Zellen Trypanblau auf und sind tiefblau gefärbt.

Die Zellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl} = \text{Mittelwert} \cdot \text{Kammerfaktor} (10^4) \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{Ausgangsvolumen [ml]}$$

3 Immunhistochemische Methoden

3.1 Antikörper

	Antikörper	Bezeichnung	Hersteller
Primärantikörper	CD163, anti-Mensch Maus IgG ₁ – Clone RM3/1	RM 3/1	Bachem, Heidelberg
	CD163, Maus IgG, Mac 2-48	Mac 2-48	Guyre, Dartmouth, USA
	Kaninchen anti- human nichtmuskuläres Myosin IgG	Anti Myosin IgG	BioTrend, Köln
Kontrollantikörper	Isotyp-Kontrolle Maus IgG ₁	Kontroll Maus IgG ₁	Dianova, Hamburg
	Isotyp-Kontrolle Kaninchen IgG	Kontroll Kaninchen IgG	Dianova, Hamburg
Sekundärantikörper	Ziege anti Maus FITC-gekoppelt	FITC gekoppelt	Dianova, Hamburg
	AffiniPure Ziege anti Kaninchen Texas Red [®] - gekoppelt	Texas Red [®] gekoppelt	Dianova, Hamburg
	biotinylierter RM3/1	bio-RM3/1	BMA Biomedicals AG, Augst, Switzerland

3.2 Reagenzien und Lösungen

BSA (Gerbu, Gaidorf)

Blockierlösung:

1 % BSA in PBS

3.3 Bestimmung der CD163-Dichte auf der Monocytenoberfläche mittels Durchflusszytometrie (FACS)

3.3.1 Antikörperverdünnungen

	Antikörper	Konzentration (in 1 % BSA/PBS)
Primärantikörper	CD163, Maus IgG ₁ – Clone RM3/1	4 µg/ml
Kontrollantikörper	Isotyp-Kontrolle Maus IgG ₁	4 µg/ml
Sekundärantikörper	Ziege anti Maus FITC-gekoppelt	5 µg/ml

3.3.2 Sonstige Reagenzien und Lösungen

Propidiumiodid (Fluka, Taufkirchen)

Propidiumiodid-Lösung: 1 mM Propidiumiodid in PBS

3.3.3 Geräte und Materialien

Lochplatte	96-Lochplatte, mit Rundboden	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifuge	Megafuge 1.OR	Kendro, Hanau
Pipette	Transferpette	Brand, Wertheim
Reaktionsgefäße	Eppendorf Caps, 1,5 ml, graduiert, mit Deckel	Sarstedt, Nümbrecht
FACS-Röhrchen	Tubes, 5 ml, Ø 75 x 12 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Durchflusszytometer	Coulter Epics XL™ Flow Cytometer	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

3.3.4 Probenvorbereitung

Stimulierte Zellen wurden in 200 µl PBS resuspendiert und in einer Dichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen/Loch in eine 96-Lochplatte eingesetzt. Anschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen (301 x g, 1 min, RT). Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die Zellen 30 min bei 4 °C mit Blockierlösung inkubiert. Nach Waschen mit PBS (301 x g, 1 min, 4 °C) erfolgte die Inkubation der zu analysierenden Probe und der Isotyp-Kontroll-Probe mit 100 µl/ 10^6 Zellen Primär- bzw. Kontrollantikörper für 45 min bei 4 °C. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen (301 x g, 1 min, 4 °C). Für die Kopplung mit dem Sekundärantikörper wurden jeweils $1 \cdot 10^6$ Zellen mit 50 µl des FITC-gekoppelten Sekundärantikörpers versetzt und bei 4 °C für 30 min unter Lichtschutz inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden 50 µl Propidiumiodid-Lösung zugegeben, die Zellen sofort abzentrifugiert (301 x g, 1 min, 4 °C) und dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 200 µl PBS aufgenommen und bis zur Messung bei 4 °C unter Lichtausschluss auf Eis gelagert.

3.3.5 Messung der CD163-Dichte auf der Monocytenoberfläche

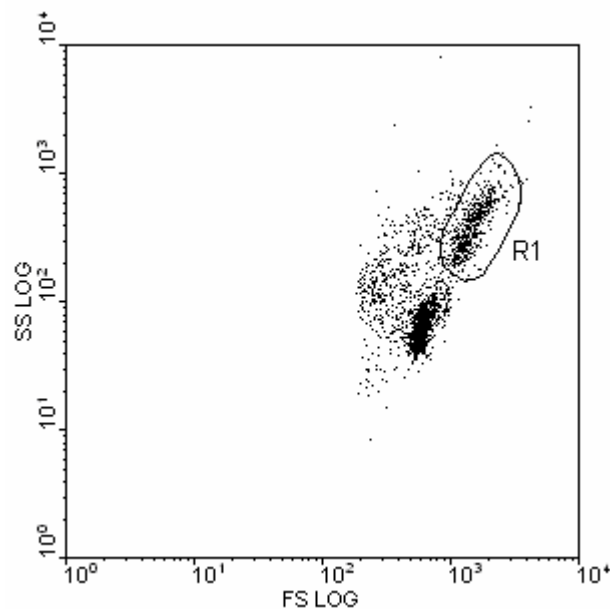
Die Bestimmung der CD163-Dichte auf der Zelloberfläche wurde mit einem Coulter Epics XL™ Flow Cytometer durchgeführt. Das Gerät ist ausgestattet mit einem Argon-Ionen-Laser, der Licht der Wellenlänge 488 nm erzeugt. Zur Zellmarkierung eignen sich somit Fluoreszenzfarbstoffe, die eine Anregungswellenlänge von 488 nm besitzen. Für die Detektion des emittierten Fluoreszenzlichtes stehen drei Fluoreszenz- und zwei Streuungsdetektoren mit fest eingestellten Filtersets zur Verfügung (Tab. 8). Diese Filtersets ermöglichen die Transmission einer genau definierten Lichtbande und löschen das Licht aller anderen Wellenlängen.

Die Flussrate wurde so eingestellt, dass 500 bis 800 Zellen pro Sekunde den Laserstrahl passieren.

Tab. 8 Detektoren mit zugehörigen Filtersets

Detektor	Filter	detektierter Fluoreszenzfarbstoff
SSC	488/25 nm	-
FSC	488/10 nm	-
FL-1	530/28 nm	FITC
FL-2	575/26 nm	Propidiumiodid
FL-3	670 nm	Propidiumiodid

Für die Messung wurden in einem Falcon[®] Tube 200 µl der markierten Zellen mit 400 µl PBS gemischt. Mit der Vorwärtsstreuung (FSC) wurde über die Zellgröße die Monocytenpopulation determiniert (Abb. 61). Durch Darstellung des FSC gegen die Emissionsfluoreszenz des Propidiumiodids (Maximum bei 617 nm) konnten tote Zellen sichtbar gemacht werden. Diese wurden bei der Datenaufnahme ausgeschlossen, so dass ausschließlich intakte Zellen ausgewertet wurden. Auf der Basis von mindestens 10000 gezählten Zellen wurde durch Bestimmung der Intensität des Emissionslichtes von FITC bei 495 nm der Anteil CD163-positiver Zellen und die Antigendichte ermittelt.

**Abb. 61:** Monocytenpopulation (R1); logarithmische Darstellung: Zellgröße (SS) gegen Granularität (FS).

3.3.6 Auswertung der FACScan Analyse

Die Messungen wurden mit einer Software WinMDI (Windows Multiple Document Interface Flow Cytometry) Version 2.8 ausgewertet. Über einen Dot Plot der jeweiligen Messung wurde erneut die Monocytenpopulation eingegrenzt. Anschließend wurde die Anzahl CD163-positiver Monocyten und die Antigendichte als Histogramm dargestellt. Bei diesem ist die jeweilige Zellzahl gegen die Fluoreszenzintensität aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde der Anteil CD163-positiver Monocyten in Proben, die mit dem Isotyp-Kontroll-Antikörper inkubiert wurden, als Nullwert gesetzt. Durch direkte Vergleiche der zu untersuchenden Proben, die mit dem spezifischen Antikörper RM 3/1 inkubiert wurden, mit der Negativkontrolle konnte der resultierende Anteil positiver Zellen ermittelt werden. Die Antigendichte wurde aus der Verschiebung der Fluoreszenzintensität des FITC gegenüber der Negativkontrolle ermittelt.

3.4 Bestimmung der Konzentration von sCD163 mittels *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA)

3.4.1 Antikörperverdünnungen

	Antikörper	Konzentration
Primärantikörper	Mac 2-48	0,5 µg/ml (in Coating-Puffer)
Sekundärantikörper	Bio-RM 3/1	0,5 µg/ml (in Blockierlösung II)
	Streptavidin-konjugierte-Peroxidase (Strep-POD)	Verdünnung 1:25000 (in Blockierlösung II)

3.4.2 Reagenzien und Lösungen

Coating Puffer:	0,5 M	Carbonat/Bicarbonatpuffer, pH 9,6
Blockierlösung I:	1 % 0,5 % 1 mM	BSA Tween 20 CaCl ₂ in PBS
Blockierlösung II:	0,1 % 0,05 % 1 mM	BSA Tween 20 CaCl ₂ in PBS
Waschlösung:	0,5 mM	CaCl ₂ in PBS
Substratlösung:	BM Blue POD Substrat, soluble (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)	
Stopplösung:	1 M	H ₂ SO ₄

3.4.3 Geräte und Materialien

Mikrotiterplatten	Microtest, 96-Loch, Flachboden, hohe Proteinbindung	BD Labware, NJ, USA
Mikrotiterplatten Wascher	Titertek [®] Microplate Washer S8/12	Flow Laboratories, McLean, VA, USA)
Mikroplatten Reader	Bio-Rad Microplate Reader	Benchmark, CA, USA

3.4.4 Probenvorbereitung

Isolierte Monocyten bzw. T-Lymphocyten wurden zweimal mit je 50 ml PBS gewaschen (604 x g, 10 min, 4 °C). Anschließend wurde, wie unter 2.6 beschrieben, die Zellzahl bestimmt und die Zellen lysiert (Allgemeiner Teil, 4.1.1). Die Lysate wurden vor der ELISA-Messung mit Blockierlösung II weiter verdünnt. Aus einer sCD163-Lösung der Konzentration 5 µg/ml wurden sechs Kalibrierlösungen in einem Konzentrationsbereich von 0,0078 bis 0,27 µg/ml in Blockierlösung II hergestellt.

3.4.5 Durchführung des ELISA zur Bestimmung der Konzentration des sCD163

Zuerst wurden die Näpfe der ELISA-Platte mit dem Primärantikörper AK Mac 2-48 beschichtet (Abb. 62). Dazu wurden je 50 µl Mac 2-48 in die Näpfe pipettiert und 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Näpfe zweimal mit je 200 µl Waschlösung gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die Näpfe für 30 min mit 200 µl Blockierlösung I bei 37 °C inkubiert. Die Platte wurde drei Mal gewaschen und für 60 min bei 37 °C mit 50 µl der zu untersuchenden sCD163-Proben bzw. mit den Standardlösungen inkubiert. Nach weiteren drei Waschgängen wurden jeweils 50 µl des Zweitantikörpers Bio-RM 3/1 zupipettiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über 60 min. Anschließend wurde erneut dreimal gewaschen und 30 min mit 100 µl Streptavidin-POD inkubiert und wiederum dreimal mit Waschlösung gewaschen. Zur Farbentwicklung wurden 50 µl BM Blue POD Substrat zupipettiert. Die Farbentwicklung erfolgte über 15 min bei RT. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Stopplösung beendet und die Platte sofort bei 450 nm vermessen.

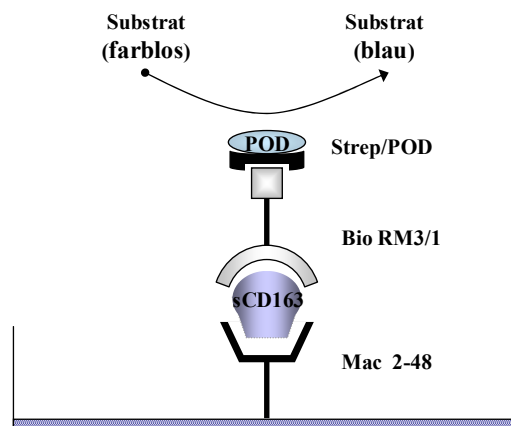


Abb. 62: Schematische Darstellung des ELISA zur Quantifizierung von sCD163.

3.4.6 Auswertung des sCD163-ELISA

Für die Ermittlung der sCD163-Konzentration in der Probe wurde mit Hilfe der Standardlösungen eine Kalibriergerade aufgestellt. Dazu wurden die Konzentrationen der Standardlösungen gegen die jeweiligen Absorptionen bei 450 nm aufgetragen. Durch diese Messwerte wurde dann mittels linearer Regression eine Ausgleichsgerade gelegt und die dazugehörige Geradengleichung aufgestellt (Abb. 63). Der Korrelationskoeffizient r der Geraden [130] lag bei allen durchgeführten Versuchen bei $0,993 \pm 0,005$. Durch Einsetzen der

entsprechenden Absorptionswerte der Proben in die ermittelte Kalibrierfunktion konnte die Konzentration an sCD163 ermittelt werden.

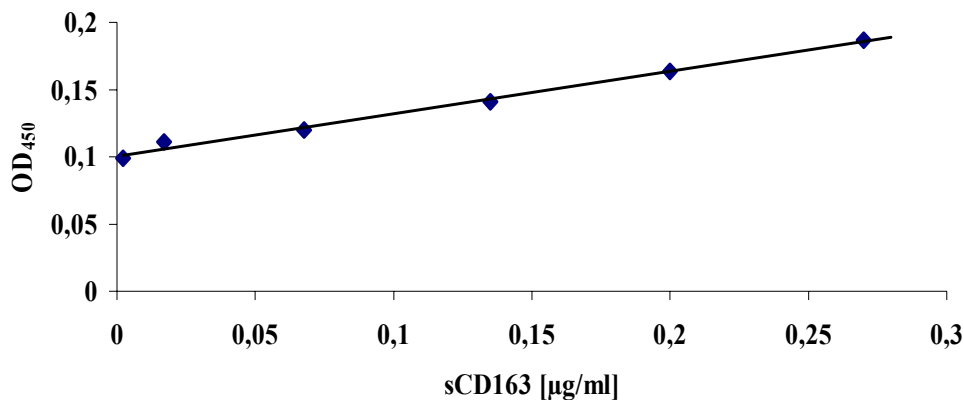


Abb. 63: Exemplarische Darstellung einer Kalibriergeraden des sCD163-Standards. Aufgetragen ist die Konzentration des sCD163 [µg/ml] gegen die Optische Dichte bei 450 nm (OD₄₅₀).

3.5 *Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)* zur Bestimmung von intrazellulären sCD163-Myosin-Komplexen

3.5.1 Antikörperverdünnungen

	Antikörper	Konzentration
Primärantikörper	Mac 2-48	0,5 µg/ml (in Coating-Puffer)
	Anti Myosin IgG	0,2 µg/ml (in Coating-Puffer)
Sekundärantikörper	Bio-RM 3/1	0,5 µg/ml (in Blockierlösung II)
	Streptavidin-konjugierte-Peroxidase (Strep-POD)	Verdünnung 1:25000 (in Blockierlösung II)

3.5.2 Reagenzien und Lösungen

Wie unter 3.4.3 beschrieben

3.5.3 Geräte und Materialien

Wie unter 3.4.3 beschrieben

3.5.4 Probenvorbereitung

Isolierte T-Lymphocyten der Dichte $1 \cdot 10^8$ wurden zweimal mit je 50 ml PBS gewaschen und zentrifugiert (604 x g, 10 min, 4 °C). Die gewaschenen T-Lymphocyten wurden anschließend mit 10^{-8} M PMA in Medium allein oder einer Kombination aus PMA und sCD163 (0,15 µg/ml) inkubiert. sCD163 wurde *in vitro* durch Abspaltung von der Zelloberfläche nach Inkubation mit dem Phorbolster PMA aus $1 \cdot 10^8$ Monocyten gewonnen. Die Konzentration an sCD163 wurde mittels ELISA bestimmt (Experimenteller Teil, 3.4). Die Inkubation erfolgte in RPMI 1640 (komplett) Medium für 15 h in einer 6 %igen CO₂-haltigen Atmosphäre und einer Temperatur von 37 °C. Zur Kontrolle wurden $1 \cdot 10^8$ Zellen unter den gleichen Bedingungen nur in Medium ohne weitere Zusätze inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut gezählt (Experimenteller Teil, 2.6) und lysiert (Experimenteller Teil, 4.1.2) Die Überstände wurden abgenommen und sofort weiterverwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Vor der Verwendung wurden die Proben 1:3 mit Blockierlösung II verdünnt.

3.5.5 Durchführung des ELISA zur Bestimmung von intrazellulären sCD163-Myosin-Komplexen

Der ELISA auf intrazelluläre sCD163-Myosin-Komplexe wurde wie in Kapitel 3.4.5 beschrieben durchgeführt. 50 µl Anti Myosin IgG wurden als Primärantikörper verwendet. Als Proben wurden in einer Verdünnung von 1:3 in Blockierlösung II die Lysate aus mit PMA- und PMA/sCD163-inkubierten Zellen und als Kontrolle sCD163 und ein Zell-Lysat aus unstimulierten Zellen aufgetragen. Die Messwellenlänge betrug 450 nm.

Bei diesem Versuch wurden keine absoluten Konzentrationen ermittelt, sondern nur die Verhältnisse der Absorptionen bei 450 nm der unterschiedlich behandelten Zellen zueinander bestimmt.

3.6 Bestimmung der anti Myosin IgG-Konzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA)

Die Konzentration des anti Myosin IgG wurde spektralphotometrisch nach der Bicinchoninsäure-Methode [407] bestimmt.

3.6.1 Reagenzien und Lösungen

Bicinchoninic acid solution (BCA)	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	(Merck, Darmstadt)
Rinderserumalbumin (BSA)	(Gerbu Biochemicals GmbH)
4 % CuSO ₄ -Lösung:	4,0 g CuSO ₄ · 5 H ₂ O ad 100 ml Millipore [®] Wasser
Reaktionslösung:	50 Teile BCA 1 Teil 4 % CuSO ₄ -Lösung (wurde unmittelbar vor der Verwendung hergestellt)
BSA-Stammlösung:	10 mg/ml in Millipore [®] Wasser

3.6.2 Herstellung der Probe- und Kalibrierlösungen

Anti Myosin IgG (in PBS) wurde vor der Bestimmung mit Millipore[®]-Wasser 1:10 verdünnt. Die Kalibrierlösungen wurden durch Verdünnung der BSA-Stammlösung (10 mg/ml) mit Millipore[®]-Wasser hergestellt. Es wurden 10 Kalibrierlösungen in einem Konzentrationsbereich von 0,02 bis 1,0 mg/ml hergestellt.

3.6.3 Durchführung der BCA-Methode

In einer 96-Lochplatte wurden 10 µl der Probe-, Kalibrierlösungen bzw. Wasser (Leerwert) mit 200 µl Reaktionslösung versetzt und vorsichtig gemischt. Die Mischung wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 1 min auf Eis gekühlt und die

Absorption mit dem bei 562 nm gegen die Leerprobe (Nullabgleich) vermessen. Mit Hilfe der ermittelten Kalibriergeraden wurde der Proteingehalt der AK-Lösung bestimmt.

3.7 Untersuchung der Lokalisation von sCD163 und Myosin in T-Lymphocyten mittels Fluoreszenzmikroskopie

3.7.1 Antikörperverdünnungen

	Antikörper	Konzentration (in 1 % BSA/PBS)
Primärantikörper	CD163, Maus IgG ₁ – Clone RM3/1	5 µg/ml
	anti-Myosin IgG	5 µg/ml
Kontrollantikörper	Isotyp-Kontrolle Maus IgG ₁	5 µg/ml
	Isotyp-Kontrolle Rabbit IgG	5 µg/ml
Sekundärantikörper	Ziege anti Maus FITC-gekoppelt	5 µg/ml
	AffiniPure Ziege anti Kaninchen Texas Red [®] - gekoppelt	2 µg/ml

3.7.2 Sonstige Reagenzien und Lösungen

Poly-L-lysin 0,01 % (Sigma, Taufkirchen)

Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt)

Paraformaldehyd-Lösung 11,1 %: 5,55 g Paraformaldehyd
40 ml Millipore[®] Wasser (50 °C)
4 gtt NaOH 1 M

Vorsichtig unter Rühren lösen.

5 ml PBS 10x
ad 50 ml Millipore[®] Wasser

Fixierlösung: 3,7 % Paraformaldehyd: 10 ml PBS x10
33,4 ml Paraformaldehyd-Lösung 11,1 %

	0,6 ml	30 % Triton X-100
	56 ml	Millipore® Wasser
Triton X-100	(Sigma, Taufkirchen)	
Glycin	(Riedel-deHaën, Seelze)	
Quenchlösung:	10 mM	Glycin
	in PBS	
Vectashield® Mounting Medium	(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)	

3.7.3 Geräte und Materialien

Objektträger	76 x 26 mm, geschnitten	Meyer + Kersting, Karlsruhe
Deckgläschen	18 x 18 mm	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Fluoreszenzmikroskop	Modell DM R	Leica, Wetzlar
Obektivlinsen	HCX PL FLUOTAR, 100x, NA 1,30, PH3	Leica, Wetzlar
Kamera	SPOT, Model 2.3.1	Diagnostic Instruments. Inc,
Bildsoftware	MetaVue™	Universal Imaging Corporation, Downingtown PA, USA

3.7.4 Zellfixierung

Zur Förderung der Zelladhäsion auf dem Objektträger wurde die Objektträgeroberfläche mit 200 µl 0,01 % Poly-L-lysin beschichtet (10 min, RT). Überschüssiges Poly-L-lysin wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und der verbleibende dünne Film wurde trocknen gelassen. Anschließend wurden 200 µl Zellsuspension ($1 \cdot 10^6$ Zellen/ml PBS) auf den Objektträger gegeben und 1 h bei RT inkubiert. Die überschüssige Zellsuspension wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und der so beschichtete Objektträger einmal mit PBS gespült. Zur Fixierung der Zellen wurde der Objektträger mit 500 µl Fixierlösung 30 min bei 37 °C inkubiert. Gleichzeitig wurden die Zellen durch das in der Fixierlösung enthaltene Triton X-100 permeabilisiert. Der Objektträger wurde zwei Mal mit je 1 ml PBS gespült. Um die Eigenfluoreszenz der Aldehydgruppen auszuschalten, wurden die fixierten Zellen für 10 min

mit 200 μ l Quenchlösung bei RT inkubiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen erneut mit 1 ml PBS gewaschen.

3.7.5 Zellmarkierung

Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die fixierten Zellen mit 200 μ l Blockierlösung für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Absaugen der Blockierlösung erfolgte die Inkubation der Zellen mit 100 μ l/Objektträger Primär- bzw. Kontrollantikörper. Dabei wurden sowohl Proben mit den einzelnen Antikörpern als auch mit einem Mix der beiden Primär- bzw. Kontrollantikörper eingesetzt (Tab. 9). Die Inkubation erfolgte über 1 h bei RT. Anschließend wurde die überschüssige Antikörperlösung mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Objektträger dreimal 5 min mit PBS gewaschen. Die Kopplung der Sekundärantikörper erfolgte durch Inkubation der Zellen mit 100 μ l/Objektträger des jeweiligen Antikörpers bzw. mit einem Mix für 1 h bei RT.

Tab. 9: Antikörperkopplungsschema

	Antikörper	Nachweis von		
		CD163	Myosin	Colokalisation CD163-Myosin
Primärantikörper*	CD163	100 μ l		
	anti Myosin IgG		100 μ l	
	MIX I			100 μ l
Sekundärantikörper	FITC gekoppelt	100 μ l		
	Texas Red [®] gekoppelt		100 μ l	
	MIX II			100 μ l

*Die Kopplung mit den Kontrollantikörpern erfolgte analog zu den entsprechenden Primärantikörpern.

Die Antikörperlösungen wurden vorsichtig abgegossen und die Objektträger dreimal 5 min mit PBS gewaschen.

Um die Fluoreszenzintensität länger aufrecht zu erhalten, wurde 10 μ l Vectashield[®] Mounting Medium auf ein Deckgläschen gegeben und das markierte Präparat auf das

Deckgläschen gestürzt. Überschüssiges Medium wurde vorsichtig mit einem faserfreien Tuch entfernt. Zur Fixierung der Deckgläschen wurde der äußere Rand des Gläschens mit einer dünnen Schicht Nagellack bestrichen und 3 min trocknen gelassen. Die Präparate wurden bis zur Messung im Dunkeln gelagert.

3.7.6 Aufnahme der fluoreszenzmikroskopischen Bilder

Das Fluoreszenzmikroskop Leica DM R ist mit einer variabel einstellbaren 100 W Quecksilberhochdrucklampe und verschiedenen Filtern für die fluoreszierenden Farbstoffe ausgestattet (Tab. 10).

Tab. 10: Filtersysteme für Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoff	Emission EX	Farbteiler DM	Excitation BA
DAPI	340 – 380	400	435 – 485
Texas Red	540 – 580	595	600 – 660
FITC	465 – 495	505	515 – 555

Der Belichtungsmodus war eingestellt auf 3 s. Das Kamerasystem SPOT mit Kontrolleinheit wurde von der MetaVue™ Software unterstützt.

3.7.7 Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen

Zur Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder wurde die Bildverarbeitungssoftware Microsoft Photo Editor 3.0.2.3 verwendet.

3.8 Bestimmung der Konzentration von 8-iso Prostaglandin F_{2α} in bronchoalveolärer Lavage Flüssigkeit (BALF)

3.8.1 Reagenzien

Für die Quantifizierung des 8-iso Prostaglandin F_{2α} in BALF wurde das 8-Isoprostan EIA Kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) verwendet.

3.8.2 Geräte und Materialien

Mikrotiterplatten Wascher	Titertek [®] Microplate Washer S8/12
Schüttelgerät	Unimax 1010, Heidolph Instruments
Mikroplatten Reader	Bio-Rad Microplate Reader

3.8.3 Herstellung der Probe- und Kalibrierlösungen

Die bronchoalveolären Lavage-Proben wurden aufgetaut und mit EIA Puffer 1:10 verdünnt. Die verdünnten Proben wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Aus einer 8-iso Prostaglandin-Stammlösung der Konzentration 5000 pg/ml wurden durch Verdünnung mit EIA Puffer acht 8-iso Prostaglandin-Standards (S) in einem Konzentrationsbereich von 3,9 pg/ml bis 500 pg/ml hergestellt.

3.8.4 Bestimmung der Konzentration des 8-iso Prostaglandin F_{2α}

Die Bestimmung des 8-iso Prostaglandin F_{2α} erfolgt nach den Angaben des Herstellers Cayman Chemical. Jede Probe wurde dreifach bestimmt. Der ELISA basiert auf dem Prinzip der Competition.

In die Näpfe einer ELISA-Platte, die vom Hersteller mit einem monoklonalen Maus anti-Kaninchen IgG beschichtet war, wurden jeweils 50 µl der verdünnten Proben bzw. Standards pipettiert. Zusätzlich wurden in jeden Napf 50 µl 8-iso Prostaglandin AchE Tracer und 50 µl 8-iso Prostaglandin-spezifischen Hase-Antiserum pipettiert. Bei dem Prostaglandin AchE

Tracer handelte es sich um 8-iso Prostaglandin, an das eine Acetylcholinesterase gebunden ist. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung (NSB; *non-specific binding*) wurden in 3 Näpfe 100 μ l EIA Puffer und 50 μ l Prostaglandin AchE Tracer pipettiert. In weitere 3 Näpfe wurden für die Bestimmung der maximalen Menge an Tracer (B_0), die in Abwesenheit des freien Analyten an das Antiserum binden kann, 50 μ l EIA Puffer, 50 μ l Prostaglandin AchE Tracer und 50 μ l Antiserum gegeben. Zur Bestimmung des Leerwertes und der totalen Aktivität (TA) des ELISA wurden jeweils 3 Näpfe freigelassen (Tab. 11). Alle Ansätze wurden mit einer durchsichtigen Plastikfolie abgedeckt, vorsichtig gemischt und die Platte für 18 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Platte fünf Mal mit je 300 μ l Waschpuffer, der im Kit enthalten war, gewaschen. Anschließend wurde in die Näpfe zur Bestimmung der TA 5 μ l 8-iso Prostaglandin AchE Tracer gegeben. In alle Näpfe wurden 200 μ l Ellman’s Reagenz als Substrat pipettiert (Tab. 11).

Tab. 11: Pipettierschema zur Bestimmung der 8-iso PG $F_{2\alpha}$ -Konzentration in BALF

	Probe/Standard	NSB	B_0	Leerwert	TA
EIA Puffer		100 μ l	50 μ l	-	-
Probe-/Standardlösung	50 μ l	-	-	-	-
Prostaglandin AchE Tracer	50 μ l	50 μ l	50 μ l	-	-
Antiserum	50 μ l	-	50 μ l	-	-
18 h Inkubation bei RT, 5 Mal Waschen					
Prostaglandin AchE Tracer	-	-	-	-	5 μ l
Ellman’s Reagenz	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l

Alle Ansätze wurden erneut mit einer durchsichtigen Plastikfolie abgedeckt und 90 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert. Die Inkubation wurde auf einem Schüttelgerät mit 100 Upm durchgeführt.

Nach 90 Minuten wurde die Absorption der Ansätze bei 415 nm gemessen.

3.8.5 Auswertung

Zur Berechnung der Konzentration an 8-iso Prostaglandin $F_{2\alpha}$ in den BALF-Proben wurde der Leerwert von allen anderen Werten abgezogen. Anschließend wurde für jede Konzentration des 8-iso Prostaglandin Standards der Wert $\% B/B_0$ nach folgender Formel berechnet (Gl. 1):

$$\text{Gl. 1} \quad \% \frac{B}{B_0} = \left(\frac{S - NSB}{B_0 - NSB} \right) * 100$$

$\% \frac{B}{B_0}$ Verhältnis der Konzentration der Standards/Probe zum Leerwert [%]
 S Konzentration des Standards
 NSB Unspezifische Bindung
 B_0 Leerwert

Die $\% B/B_0$ -Werte für die Standards wurden anschließend halblogarithmisch gegen die eingesetzten Konzentrationen aufgetragen (Abb. 64). Durch die Werte des Standards wurde mittels linearer Regression eine Ausgleichsgerade gelegt und die zugehörige Geradengleichung ermittelt. Der Korrelationskoeffizient r lag bei allen Versuchen zur Konzentrationsbestimmung an 8-iso $PGF_{2\alpha}$ bei $0,986 \pm 0,0002$.

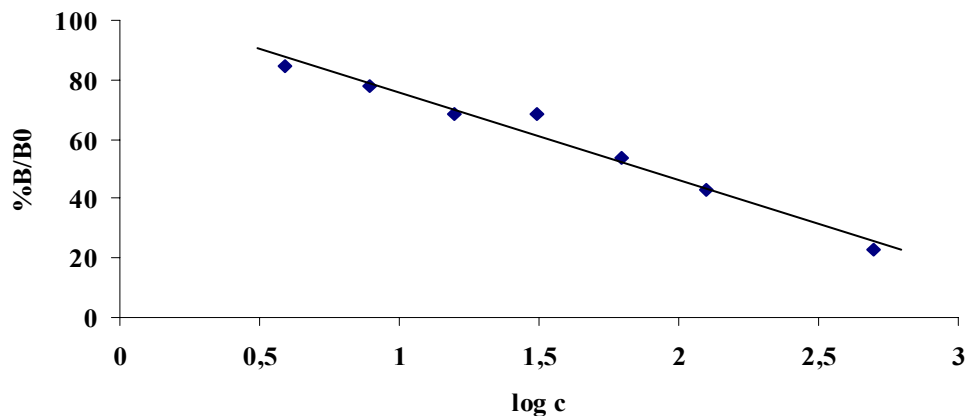


Abb. 64: Halblogarithmische Auftragung der Konzentration der 8-iso-Prostaglandin Standards [pg/ml] gegen $\% B/B_0$

Anschließend wurde $\% B/B_0$ für jede Probe ermittelt und über die Kalibriergerade die korrespondierenden Konzentrationen auf der x-Achse bestimmt.

3.9 Bestimmung der Konzentration des Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α)

3.9.1 Reagenzien

Für die Quantifizierung des TNF- α wurde das Quantikine[®] human TNF- α Immunoassay Kit (R&D Systems GmbH, Wiesbaden) verwendet.

Die Stimulation der Monocyten zur TNF- α -Freisetzung erfolgte durch folgende Reagenzien:

Stimulanz	Bezeichnung	Hersteller
Cyclosporin A	CsA	Sigma, Taufkirchen
8-iso Prostaglandin F _{2α}	8-iso PG F _{2α}	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA
Prostaglandin F _{2α}	PG F _{2α}	Cayman Chemical
Lipopolysaccharid, bakteriell	LPS	Sigma
Phorbol 12-myristat 13-acetat	PMA	Sigma
S-nitroso-N-acetylpenicillamin	SNAP	Sigma
Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt

3.9.2 Geräte und Materialien

Mikrotiterplatten Wascher Titertek[®] Microplate Washer S8/12

Mikroplatten Reader Bio-Rad Microplate Reader

3.9.3 Stimulation der Monocyten zur Freisetzung des TNF- α

Zur Untersuchung der Fähigkeit zur Freisetzung von TNF- α aus humanen Monocyten wurden Zellen der Dichte $2 \cdot 10^6$ für 48 Stunden mit Fluticasonpropionat stimuliert. Anschließend wurde das Kulturmedium vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit frischem McCoy's Kompletmedium versetzt. Die Monocyten wurden zwei Stunden bei 37 °C ruhen gelassen.

Zur Stimulation der TNF- α -Freisetzung wurden die Zellen mit dem jeweiligen Stimulanz für weitere zwei Stunden bzw. für 30 Minuten mit H₂O₂ bei 37 °C inkubiert. Lösungen der Stimulanzen wurden jeweils in McCoy's Kompletmedium hergestellt, das auf 37 °C temperiert war (Tab. 12).

Tab. 12: Eingesetzte Konzentrationen der Stimulanzen zur TNF- α -Freisetzung

Stimulanz	Endkonzentration
CsA	$2 \cdot 10^{-7}$ M
LPS	1 μ g/ml
PMA	$1 \cdot 10^{-8}$ M
8-iso PG F _{2α}	$1 \cdot 10^{-9}$ M
PG F _{2α}	$1 \cdot 10^{-9}$ M
SNAP	$1 \cdot 10^{-3}$ M
H ₂ O ₂	$1 \cdot 10^{-3}$ M

Nach der Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert (353 x g, 15 min, 4 °C). Die Überstände wurden aliquotiert und sofort weiterverarbeitet, oder bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.9.4 Bestimmung der Konzentration des TNF- α

Die Bestimmung der Konzentration des TNF- α in den Zellüberständen erfolgte mittels ELISA-Kit nach Vorgaben des Herstellers R&D Systems.

Aus einer TNF- α -Stammlösung, die rekombinantes humanes TNF- α der Konzentration 10000 pg/ml enthält, wurden durch Verdünnung mit einer Kalibrator-Verdünnungslösung für Zellkulturüberstände (RD6-35) neun TNF- α -Standards in einem Konzentrationsbereich von 15,6 pg/ml bis 10000 pg/ml hergestellt.

Die Näpfe der ELISA-Platte sind vom Hersteller mit einem monoklonalen Maus anti-TNF- α Antikörper beschichtet. In die Näpfe wurden nacheinander jeweils 50 μ l einer gepufferten Verdünnungslösung (RD1F) und 200 μ l Probe- bzw. Standardlösung gegeben und gut gemischt. Anschließend wurde die Platte für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Lösungen aus den Näpfen abgesaugt und die Platte vier Mal mit je 250

μl Waschpuffer gewaschen. Nach dem Waschen wurden in jeden Napf 200 μl TNF- α -Konjugat pipettiert. Das Konjugat besteht aus einem polyklonalen Antikörper gegen TNF- α , an den eine Meerrettich-Peroxidase gebunden ist. Die Platte wurde für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen des TNF- α -Konjugats und viermaligem Waschen mit 250 μl Waschpuffer wurden in jeden Napf 200 μl einer Substratlösung pipettiert. Die Substratlösung wurde kurz vor Verwendung aus einer stabilisierten Hydrogenperoxidlösung und dem Chromogen Tetramethylbenzidin hergestellt. Für die Reaktion des Substrats mit der Meerrettich-Peroxidase wurde die ELISA-Platte für 20 min bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss inkubiert. Nach 20 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 μl Stopp-Lösung (2 N Schwefelsäurelösung) beendet und die Absorption innerhalb 30 min bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 570 nm gemessen.

3.9.5 Auswertung

Für die Ermittlung der Konzentration an TNF- α in der Probe wurde mit Hilfe der Standardlösungen eine Kalibriergerade aufgestellt. Dazu wurden die Konzentrationen der Standardlösungen gegen die jeweiligen Absorptionen bei 450 nm/570 nm aufgetragen. Durch diese Messwerte wurde dann mittels linearer Regression eine Ausgleichsgerade gelegt und die dazugehörige Geradengleichung aufgestellt. Der Korrelationskoeffizient r der Geraden lag bei allen durchgeführten Versuchen bei $0,997 \pm 0,009$. Durch Einsetzen der entsprechenden Absorptionswerte der Proben in die ermittelte Kalibrierfunktion konnte die Konzentration an TNF- α ermittelt werden.

3.10 Bestimmung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) mittels Chemolumineszenz

3.10.1 Reagenzien und Lösungen

Natriumphosphatpuffer 50 mM, pH 7,9

Luminol (Sigma, Taufkirchen), 3 mM, in Natriumphosphatpuffer

3.10.2 Geräte und Materialien

Mikroplatte	96-Lochplatte, schwarz	Sarstedt, Nümbrecht
Chemolumineszenzgerät	LB 960 Mikroplatten Luminometer Centro	Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad, Germany
PE-Gefäße		Sarstedt, Nümbrecht

3.10.3 Probenvorbereitung und Messung

Fluticasonpropionatstimulierte Monocyten wurden zwei Mal mit je 50 ml PBS gewaschen und zentrifugiert (604 x g, 10 min, 4 °C). Anschließend wurde, wie unter 2.6 beschrieben, die Zellzahl bestimmt. Die Monocyten wurden in einer Konzentration von $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml in Natriumphosphatpuffer suspendiert. Jeweils 100 µl dieser Zellsuspension wurden bei den Chemolumineszenzmessungen pro Napf eingesetzt.

3.10.3.1 Analyse der Bildung Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Shedding-induzierender Substanzen auf die Bildung Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wurde die Zellsuspension mit jeweils 20 µl Luminol und 60 µl Natriumphosphatpuffer pH 7,9 versetzt. Die Ansätze wurden gemischt, 10 Minuten bei 37 °C inkubiert und direkt im Anschluss die Lichtemission als Relative Lichteinheiten (RLU, *relative light units*) im Luminometer gemessen. Eine Lichteinheit entspricht dabei 10^3 Lichtzahlen pro Sekunde.

Die Herstellung der Stimulanzen erfolgte in Natriumphosphatpuffer pH 7,9. Für jedes Stimulanz wurde eine Stammlösung hergestellt, die bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert wurde (Tab. 13).

Die Bestimmung der Freisetzung ROS erfolgte in einem Mikroplatten Luminometer. Die Geräteparameter wurden so eingestellt, dass alle 14 Sekunden die Chemolumineszenz der einzelnen Proben gemessen wurde. Zuerst wurde für 10 Minuten die basale Lichtemission jeder Probe bestimmt. Anschließend wurden 20 µl der Stammlösung des jeweiligen Sheddingstimulanz bzw. Natriumphosphatpuffers (Kontrolle) zupipettiert.

Tab. 13: Eingesetzte Stimulanzen zum Nachweis der Bildung ROS mittels Chemolumineszenz.

Stimulanz	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
PMA	$1 \cdot 10^{-7}$ M	$1 \cdot 10^{-8}$ M
8-iso PG F _{2α}	$1 \cdot 10^{-8}$ M	$1 \cdot 10^{-9}$ M
CsA	$2 \cdot 10^{-6}$ M	$2 \cdot 10^{-7}$ M
SNAP	$1 \cdot 10^{-2}$ M	$1 \cdot 10^{-3}$ M

Die Chemolumineszenz wurde nach Zugabe der Stimulanzen kontinuierlich alle 14 Sekunden über einen Zeitraum von 1 Stunde gemessen. Zur Untersuchung, ob die Stimulanzen selbst in der Lage sind, eine Chemolumineszenz auszubilden, wurden unter den gleichen Versuchsbedingungen die Stimulanzen nach Zugabe von Luminol ohne Zellsuspension vermessen (Tab. 14).

Das Gesamtvolumen pro Well betrug bei allen Versuchen 200 µl.

Tab. 14: Pipettierschema bei der Analyse der Bildung ROS durch verschiedene Stimulanzen mittels Chemolumineszenz.

	Probe	Kontrolle	Kontrolle der Eigen-Chemolumineszenz der Stimulanzen
Zellsuspension ($2 \cdot 10^7$ Zellen/ml)	100 µl	100 µl	-
Natriumphosphatpuffer pH 7,9	60 µl	80 µl	160 µl
Luminol	20 µl	20 µl	20 µl
Stimulanz	20 µl	-	20 µl
gesamt	200 µl	200 µl	200 µl

3.10.3.2 Analyse der Hemmung der H₂O₂-induzierten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Zur Untersuchung der Hemmung der Bildung H₂O₂-induzierter ROS wurden die Zellen vor der Zugabe des Stimulanz mit einem Inhibitor versetzt (Tab. 15).

Die Herstellung der Inhibitoren erfolgte in Natriumphosphatpuffer pH 7,9. Für jeden Inhibitor wurde eine Stammlösung hergestellt, die bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert wurde (Tab. 15).

Tab. 15: Eingesetzte Inhibitoren zur Hemmung der ROS-Freisetzung aus stimulierten Monocyten.

Inhibitor	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
BAPTA/AM	$1 \cdot 10^{-3}$ M	$5 \cdot 10^{-5}$ M
NALC	$2 \cdot 10^{-2}$ M	$1 \cdot 10^{-3}$ M
TAPI-1	$2 \cdot 10^{-7}$ M	$1 \cdot 10^{-8}$ M

Die Bestimmung der Hemmung der Freisetzung von ROS erfolgte unter denselben Bedingungen in einem Mikroplatten Luminometer wie unter 3.10.3.1 beschrieben. Die Zellsuspension wurde für die Untersuchung der Wirkung der Inhibitoren 15 Minuten vor Zugabe der jeweiligen Stimulanzen zur Bildung von ROS mit 20 µl des jeweiligen Inhibitors versetzt und inkubiert. Zur Kontrolle der ROS-induzierten CL wurden die Zellen ohne Zusatz der induzierenden Stimulanzen vermessen (Tab. 16). Die Ausbildung einer Eigenlumineszenz der Inhibitoren wurde durch Inkubation der jeweiligen Inhibitoren mit Luminol ohne Zellen bestimmt.

Tab. 16: Pipettierschema bei der Analyse der Hemmung der Bildung von ROS durch verschiedene Inhibitoren mittels Chemolumineszenz.

	Probe	Kontrolle	Kontrolle der Eigen-Chemolumineszenz der Inhibitoren
Zellsuspension ($2 \cdot 10^7$ Zellen/ml)	100 µl	100 µl	-
Natriumphosphatpuffer pH 7,9	50 µl	80 µl	170 µl
Luminol	20 µl	20 µl	20 µl
Inhibitor	10 µl	-	10 µl
Stimulanz	20 µl	-	-
gesamt	200 µl	200 µl	200 µl

3.10.3.3 Auswertung

Die Messung der Chemolumineszenz erfolgte in Relativen Lichteinheiten (RLU) über einen Zeitraum von 60 Minuten.

Die Auswertung der bei der CL-Messung aufgenommenen Daten erfolgte über die Bestimmung der *Area under the curve* (AUC) mittels GraphPad Prism 4, wobei die Fläche mit der totalen Lichtmenge korrelierte, die über den Messzeitraum bestimmt wurde. Die AUC wurde nach folgender Formel berechnet:

$$AUC_{t_0-t_1} = \sum_{i=1}^n \frac{RLU(t_1) + RLU(t_{i-1})}{2} \times (t_i - t_{i-1})$$

Die errechneten Flächen wurden anschließend ins Verhältnis zur AUC der Kontrolle gesetzt, um ausschließlich die durch das jeweilige Stimulanz erzeugte Lichtmenge zu erhalten.

4 Proteinchemische Methoden

4.1 Herstellung von Proteinextrakten

4.1.1 Herstellung von Monocyten-Lysaten

$1 \cdot 10^8$ Monocyten wurden wie unter 1.12.3 beschrieben isoliert und anschließend mit oder ohne Zugabe von Stimulanzien 48 Stunden in Kulturflaschen bei 37 °C und 6 % CO₂-Begasung inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgegossen. Zum Ablösen adhärenter Zellen wurden 50 ml PBS in die Kulturflaschen gegeben und mit einem Zellkratzer die Zellen vom Flaschenboden gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml-Röhrchen überführt und bei 604 x g für 15 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in PBS resuspendiert und 2 Mal mit jeweils 50 ml PBS gewaschen und zentrifugiert (353 x g, 15 min, 22 °C). Nach erneutem Suspendieren in PBS wurde ein Aliquot zur Zellzahlbestimmung entnommen. Die Zellen wurden anschließend noch einmal bei 353 x g 15 min zentrifugiert. Der PBS-Überstand wurde abdekantiert und je $1 \cdot 10^8$ Zellen in 5 ml Lyse-Puffer suspendiert. Die Lyse erfolgte über 60 min auf einem Rotationsrad bei einer konstanten Rotationsgeschwindigkeit von 10 Upm. Die Zellfragmente wurden bei 3345 x g 15 min abzentrifugiert. Die Überstände, die das CD163 enthielten, wurden vorsichtig abgenommen, sofort weiterverwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.1.2 Herstellung von T-Lymphocyten-Lysaten

$1 \cdot 10^8$ T-Lymphocyten wurden wie unter 2.4 beschrieben isoliert und 24 Stunden in Kulturflaschen bei 37 °C und 6 % CO₂-Begasung inkubiert. Das Medium, das die T-Lymphocyten enthält, wurde vorsichtig in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 604 x g für 15 min zentrifugiert. Anschließend wurde wie unter 4.1.1 beschrieben verfahren. Die Überstände, die das sCD163 enthielten, wurden vorsichtig abgenommen, sofort weiterverwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.2 Bestimmung der *In-vitro*-Bildung von löslichem CD163 (sCD163)

4.2.1 Reagenzien für die Abspaltung des sCD163

Reagenz	Bezeichnung	Hersteller
Cyclosporin A	CsA	
8-iso Prostaglandin F _{2α}	8-iso PG F _{2α}	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA
D-Penicillamin	D-Pen	Sigma, Taufkirchen
Phorbol 12-myristat 13-acetat	PMA	
Prostaglandin F _{2α}	PG F _{2α}	
S-nitroso-N-acetylpenicillamin	SNAP	
Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂	

4.2.2 Stimulation der Monocyten zur Abspaltung des sCD163 von der Zelloberfläche

Mit Fluticasonpropionat stimulierte Monocyten der Dichte $2 \cdot 10^6$ Zellen/2 ml McCoy's Kompletmedium wurden 2 Mal mit je 1 ml PBS gewaschen (604 x g, 5 min, 22 °C). Anschließend wurden die Zellen zur Abspaltung des sCD163 von der Zelloberfläche 2 h bei 37 °C mit einem Abspaltungsstimulanz inkubiert. Die Herstellung der Abspaltungsstimulanzien erfolgte in McCoy's Kompletmedium, welches auf 37 °C temperiert war (Tab. 17).

Die Inkubationsdauer betrug bei SNAP, D-Penicillamin, 8-iso PG F_{2α}, PG F_{2α}, CsA und PMA zwei Stunden. H₂O₂ wurde für 30 Minuten den Zellen zur Abspaltung des sCD163 zugesetzt.

Nach der Inkubation wurden die Zellen bei 353 x g und 22 °C 15 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand, der sCD163 enthält, wurde abgenommen und mittels ELISA (Experimenteller Teil, 3.4) die Konzentration an sCD163 bestimmt. Die Überstände wurden dann bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Tab. 17: Eingesetzte Konzentrationen der Abspaltungsreagenzien

Abspaltungs-Reagenz	Endkonzentration
H ₂ O ₂	1 · 10 ⁻³ M
SNAP	1 · 10 ⁻³ M
P-Pen	1 · 10 ⁻³ M
8-iso PG F _{2α}	1 · 10 ⁻⁹ M
PG F _{2α}	1 · 10 ⁻⁹ M
CsA	2 · 10 ⁻⁷ M
PMA	1 · 10 ⁻⁸ M

Die Zellen wurden drei Mal mit PBS gewaschen (353 x g, 5 min, 4 °C) und sofort zur Bestimmung der CD163-Dichte auf der Monocytenoberfläche mittels Durchflusszytometrie (Experimenteller Teil, 3.31.1) verwendet.

4.3 Bestimmung der *In-vitro*-Hemmung der Bildung von löslichem CD163 (sCD163)

4.3.1 Inhibitoren

Inhibitor	Bezeichnung	Hersteller
1,2-Bis-(2-aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure, tetraacetoxy-methylester	BAPTA/AM	Sigma, Taufkirchen
N-Acetyl-L-cystein	NALC	Sigma, Taufkirchen
{N-®-[2-Hydroxyamino carbonyl)methyl]-4-methylpentanoyl-L-naphtylalanyl-L-alanin, 2-Aminoethylamid	TAPI-1	Merck Bioscience GmbH, Bad Soden
Azazucker 2-hydroxamsäure basierte Inhibitoren:		
1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 1g,		Arbeitskreis von Prof. Herdeis, Institut für Pharmazie und LMC der Universität Würzburg

4.3.2 Bestimmung der Wirkung von Inhibitoren auf Abspaltung des sCD163 von der Monocytenoberfläche

Fluticasonpropionat-stimulierte Monocyten der Dichte $2 \cdot 10^6$ Zellen/2 ml McCoy's Kompletmedium wurden wie unter 4.2.2 beschrieben gewaschen. Die Zellen wurden für 30 Minuten mit dem jeweiligen Inhibitor oder einer Inhibitormischung bei 37 °C inkubiert. Die Inhibitoren wurden in McCoy's Kompletmedium hergestellt (Tab. 18).

Tab. 18: Eingesetzte Konzentrationen der Inhibitoren zur Hemmung der Abspaltung des sCD163 von der Monocytenoberfläche.

Inhibitor	Endkonzentration
BAPTA/AM	$2 \cdot 10^{-7}$ M
NALC	$1 \cdot 10^{-3}$ M
TAPI-1	$1 \cdot 10^{-9}$ M, $1 \cdot 10^{-6}$ M
1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 1g	$1 \cdot 10^{-6}$ M

Nach 30 Minuten wurden, wie unter 4.2.2 beschrieben, die Zellen zur Abspaltung des sCD163 von der Zelloberfläche stimuliert.

Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (353 x g, 5 min, 4 °C) und drei Mal mit PBS gewaschen. Die Bestimmung der Inhibitorwirkung erfolgte mittels Durchflusszytometrie (Experimenteller Teil, 3.3) über die Bestimmung des auf der Zelloberfläche verbliebenen Anteils an CD163.

4.4 *In-vitro*-Untersuchung zur Hormon-induzierten Expressierung von CD163 auf der Monocytenoberfläche

4.4.1 Untersuchte Hormone

Androstendiol	Endokrinologie des Universitätsklinikums Würzburg
4-Androsten-3,17-dion	Sigma, Taufkirchen
Dehydroepiandrosteron (DHEA)	Endokrinologie des Universitätsklinikums Würzburg
17 β -Estradiol	Sigma
Hydrocortison (HC)	Sigma
Testosteron	Sigma

4.4.2 Stimulation der Monocyten zur Expression von CD163

Humane Monocyten der Dichte $2 \cdot 10^6$ wurden in einer 24-Lochplatte ausgesät und für 48 h mit den Hormonen bei 37 °C, 6 % CO₂ Begasung und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Herstellung der Hormon-Lösungen erfolgte in McCoy's Kompletmedium. Die eingesetzten Konzentrationen der Hormone betragen $2 \cdot 10^{-7}$ M.

Nach Beendigung der Stimulationszeit wurde das Medium nach Zentrifugation (353 x g und 4 °C für 5 min) vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Die Zellen wurden in 200 μ l PBS resuspendiert und 3 Mal mit 200 μ l PBS gewaschen (353 x g, 5 min, 4 °C).

Anschließend wurde, wie unter 3.3 beschrieben, die CD163-Dichte auf der Monocytenoberfläche mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

D. Tabellarischer Anhang

1 *In-vitro*-Untersuchungen zur Abspaltung des löslichen sCD163 von der Zelloberfläche humaner Monocyten

1.1 Einzelergebnisse der Bestimmung der CD163-Dichte auf der Monocytenoberfläche

Die ermittelten Werte beziehen sich auf 10000 gezählte vitale Monocyten. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) von Sechsfachmessungen. Mit FP (Fluticasonpropionat) werden die zur maximalen CD163-Expression angeregten Monocyten bezeichnet. Die maximal-stimulierten Zellen wurden auf 100 % CD163-positive Monocyten gesetzt.

1.1.1 Einzelergebnisse des Shedding von CD163 mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

n = 6

	Mittelwert CD163-positive Monocyten [%]	SD [%]	CD163-positive Monocyten bezogen auf maximal-stimulierte Monocyten (FP = 100 %) [%]	SD bezogen auf maximal-stimulierte Monocyten [%]
FP	55,6	8,8	100	15,8
H ₂ O ₂ 1 mM	24,1	4,0	43,4	7,1
NALC + H ₂ O ₂	40,9	6,8	85,9	14,3
TAPI-1 + H ₂ O ₂	37,8	7,9	79,3	16,7
BAPTA/AM + H ₂ O ₂	41,4	11,5	86,9	24,1
BAPTA/AM + NALC + H ₂ O ₂	46,3	10,2	97,0	21,3

1.1.2 Einzelergebnisse des Shedding von CD163 mit S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP)

n = 6

	Mittelwert CD163- ositive Monocyten [%]	SD [%]	CD163-positive Monocyten bezogen auf maximal- stimulierte Monocyten (FP = 100 %) [%]	SD bezogen auf maximal- stimulierte Monocyten [%]
FP	32,2	3,3	100,0	10,2
SNAP	23,7	2,1	76,1	6,9
NALC + SNAP	29,0	2,6	89,9	8,1
TAPI-1 + SNAP	31,5	2,4	97,8	7,5
D-Pen	32,0	1,7	99,4	5,3

1.1.3 Einzelergebnisse der Bestimmung des konzentrationsabhängigen Shedding von CD163 mit 8-iso Prostaglandin F_{2α} (8-iso PGF_{2α}) und Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α})

n = 6

	Mittelwert CD163-positive Monocyten [%]	SD [%]	CD163-positive Monocyten bezogen auf maximal- stimulierte Monocyten (FP = 100 %) [%]	SD bezogen auf maximal- stimulierte Monocyten [%]
FP	42,2	4,6	100,0	11,0
8-iso PGF_{2α} 10⁻¹¹ M	36,2	5,7	85,9	13,4
8-iso PGF_{2α} 10⁻⁹ M	21,6	0,9	51,2	2,1
8-iso PGF_{2α} 10⁻⁷ M	24,8	2,6	58,8	6,3
8-iso PGF_{2α} 10⁻⁵ M	25,0	1,5	59,3	3,5
PGF_{2α} 10⁻¹¹ M	38,9	3,9	97,3	9,6
PGF_{2α} 10⁻⁹ M	39,3	0,5	93,2	1,2
PGF_{2α} 10⁻⁷ M	40,5	2,4	96,0	5,7
PGF_{2α} 10⁻⁵ M	41,4	2,2	98,2	5,3

1.1.4 Einzelergebnisse des Shedding von CD163 mit 8-iso Prostaglandin F_{2α} (8-iso PGF_{2α})

n = 6

	Mittelwert CD163-positive Monocyten [%]	SD [%]	CD163-positive Monocyten bezogen auf maximal- stimulierte Monocyten (FP = 100 %) [%]	SD bezogen auf maximal- stimulierte Monocyten [%]
FP	62,4	7,1	100,0	11,4
8-iso PGF_{2α} 10⁻⁹ M	49,0	5,4	64,0	8,7
PGF_{2α} 10⁻⁹ M	59,7	3,6	95,6	5,8
NALC + 8-iso PGF_{2α}	58,8	10,2	94,2	16,3
TAPI-1 + 8-iso PGF_{2α}	63,6	4,3	101,9	7,0
BAPTA/AM + 8-iso PGF_{2α}	79,0	8,0	126,6	12,7
BAPTA/AM + NALC + 8-iso PGF_{2α}	75,7	4,3	121,5	6,9

1.1.5 Einzelergebnisse des Shedding von CD163 mit Cyclosporin A (CsA)

n = 6

	Mittelwert CD163-positive Monocyten [%]	SD [%]	CD163-positive Monocyten bezogen auf maximal- stimulierte Monocyten (FP = 100 %) [%]	SD bezogen auf maximal- stimulierte Monocyten [%]
FP	78,1	11,7	100,0	15,0
CsA	30,9	9,5	39,5	12,2
NALC + CsA	49,1	6,7	62,9	8,5
TAPI-1 + CsA	63,1	4,8	80,7	6,1
BAPTA/AM + CsA	88,2	6,8	112,9	8,7
BAPTA/AM + NALC + CsA	78,9	14,1	101,0	18,1

1.1.6 Einzelergebnisse des Shedding von CD163 durch Kombinationen von Induktoren

n = 6

	Mittelwert CD163-positive Monocyten [%]	SD [%]	CD163-positive Monocyten bezogen auf maximal- stimulierte Monocyten (FP = 100 %) [%]	SD bezogen auf maximal- stimulierte Monocyten [%]
FP	60,7	3,4	100,0	5,7
H₂O₂	19,9	9,2	32,8	15,1
SNAP	53,1	4,3	87,5	7,1
8-iso PGF_{2α}	38,9	10,7	64,1	17,6
CsA	24,6	2,7	40,5	4,4
Kombi. 1. H₂O₂ 2. SNAP	18,1	8,1	29,9	13,4
Kombi. 1. H₂O₂ 2. 8-isoPGF_{2α}	26,3	9,7	43,2	16,0
Kombi. 1. H₂O₂ 2. CsA	5,1	1,7	8,4	2,8
Kombi. 1. SNAP 2. 8-isoPGF_{2α}	46,5	6,3	76,6	10,3
Kombi. 1. SNAP 2. CsA	36,9	5,8	60,8	9,6
Kombi. 1. 8-isoPGF_{2α} 2. CsA	47,3	1,7	77,9	2,8

1.1.7 Einzelergebnisse der Bestimmung des Einflusses der Inhibitoren auf das Shedding von CD163

n = 6

	CD163-positive Monocyten bezogen auf maximal-stimulierte Monocyten (FP = 100 %) [%]	SD bezogen auf maximal-stimulierte Monocyten [%]
FP	100,0	3,4
NALC	96,5	6,2
BAPTA/AM	93,0	9,7
TAPI-1	101,3	1,2

1.1.8 ANOVA-Statistik, einseitige Varianzanalyse der Bestimmung der CD163-Dichte auf der Monocytenoberfläche

Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz wurde das Programm GraphPad Prism Version 4.0 verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels ANOVA mit dem Test nach Tukey. Dargestellt sind die einzelnen Gruppen zueinander (*vs.*, *versus*). Eine statistische Signifikanz liegt bei einem $p < 0,05$ vor. Gruppen mit einem p -Wert $> 0,05$ unterscheiden sich statistisch nicht voneinander (n.s.).

1.1.8.1 Shedding von CD163 mit Wasserstoffperoxid

Tukey's Multipler Vergleichstest	p-Wert
FP vs H ₂ O ₂ 1 mM	$p < 0,001$
FP vs (NALC + H ₂ O ₂)	$p < 0,05$
FP vs (TAPI-1 + H ₂ O ₂)	$p < 0,01$
FP vs (BAPTA/AM + H ₂ O ₂)	$p < 0,05$
FP vs (BAPTA/AM + NALC + H ₂ O ₂)	n.s.

1.1.8.2 Shedding von CD163 durch S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP)

Tukey's Multipler Vergleichstest	p-Wert
FP vs SNAP	p < 0,05
FP vs NALC + SNAP	n.s.
FP vs TAPI-1 + SNAP	n.s.

1.1.8.3 Shedding von CD163 durch 8-iso Prostaglandin F_{2α} (8-iso PGF_{2α})

Tukey's Multipler Vergleichstest	p-Wert
FP vs 8-iso PGF _{2α}	p < 0,001
FP vs (NALC + 8-iso PGF _{2α})	n.s.
FP vs (TAPI-1 + 8-iso PGF _{2α})	n.s.
FP vs (BAPTA/AM + 8-iso PGF _{2α})	n.s.
FP vs (BAPTA/AM + NALC + 8-iso PGF _{2α})	n.s.
FP vs PGF _{2α}	n.s.

1.1.8.4 Shedding von CD163 durch Cyclosporin A (CsA)

Tukey's Multipler Vergleichstest	p-Wert
FP vs CsA	p < 0,001
FP vs (NALC + CsA)	p < 0,05
FP vs (TAPI-1 + CsA)	n.s.
FP vs (BAPTA/AM + CsA)	n.s.
FP vs (BAPTA/AM + NALC + CsA)	n.s.

1.1.8.5 Einfluss der Inhibitoren auf das Shedding von CD163

Tukey's Multipler Vergleichstest	p-Wert
FP vs NALC	n.s.
FP vs BAPTA/AM	n.s.
FP vs TAPI-1	n.s.

1.2 Einzelergebnisse der Bestimmung von sCD163 im Zellüberstand mittels spezifischem ELISA

Zur Wiedergabe gleicher Bedingungen wurden die ermittelten sCD163-Konzentrationen jeweils auf $2 \cdot 10^6$ Monocyten normalisiert. Alle Werte beziehen sich auf unstimulierte Zellen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Mittleren Abweichungen vom Mittelwert (MA) von Dreifachmessungen.

n = 3

	Zellzahl [$\cdot 10^6$ Zellen]	Mittelwert (OD450)	MA	sCD163 [% der Kontrolle] in $1 \cdot 10^6$ Zellen	MA [%]
Kontrolle	1,85	0,211	0,021	-	-
FP	2,00	0,229	0,001	4,3	0,3
H₂O₂	1,50	0,255	0,011	13,9	0,2
SNAP	2,00	0,259	0,005	11,4	1,1
D-Pen	1,60	0,219	0,004	2,3	1,1
8-iso PGF_{2α}	1,40	0,292	0,008	27,4	2,7
PG F_{2α}	1,90	0,224	0,006	3,2	1,6
CsA	1,60	0,299	0,004	26,0	1,1

1.3 Einzelergebnisse der Untersuchung von neuen Hydroxamsäure-Derivaten auf H₂O₂-induziertes Shedding von CD163

Die ermittelten Werte beziehen sich auf 10000 gezählte vitaler Monocyten. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) von Sechsfachmessungen. Die prozentuale Hemmung der Abspaltung wurde auf den Anteil CD163-positiver Zellen bezogen, die ausschließlich mit H₂O₂ behandelt wurden (keine Hemmung).

n = 6

	Mittelwert CD163-positive Monocyten [%]	SD [%]	% Hemmung des CD163-Shedding	SD [%]
FP	78,4	1,0		
H₂O₂	28,4	1,0	0,0	0,0
TAPI-1	78,8	0,9		
TAPI-1 + H₂O₂	67,3	0,6	85,9	0,8
1a	79,5	3,1		
1a + H₂O₂	61,1	2,1	66,1	2,1
1b	78,9	0,4		
1b + H₂O₂	48,6	8,1	40,4	6,7
1c	78,1	2,5		
1c + H₂O₂	45,4	1,6	34,1	1,2
1d	79,0	3,5		
1d + H₂O₂	37,2	9,8	17,6	4,7
1e	78,0	1,6		
1e + H₂O₂	46,1	2,6	35,3	2,0
1f	78,9	3,4		
1f + H₂O₂	42,9	3,6	29,0	2,5
1g	77,6	2,6		
1g + H₂O₂	54,0	4,8	51,2	4,6

1.4 Einzelergebnisse der *In-vitro*-Bestimmung der Produktion von ROS

Ergebnisse wurden durch Berechnung der Fläche unter der Chemolumineszenz-Kurve (AUC) mit Hilfe der Software GraphPad Prism 4 erhalten. Die Chemolumineszenz wurde in Relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Mittleren Abweichungen vom Mittelwert (MA) von Dreifachmessungen. Die Chemolumineszenz von Zellen ohne weitere Zusätze (Kontrolle) wurde jeweils auf 100 % gesetzt.

1.4.1 Einzelergebnisse der Produktion von ROS durch sheddinginduzierende Verbindungen

n = 3

	AUC [RLU]	MA	AUC [% der Kontrolle]	MA [%]
Kontrolle (H₂O₂)	4591300,00	441471,15	100,0	10,4
H₂O₂	16790666,67	1215111,11	365,7	26,5
Kontrolle (SNAP)	2725410,04	239071,05	100,0	8,8
SNAP	4589703,33	43858,89	168,4	16,1
Kontrolle (8-iso PGF_{2α})	1681030,15	135566,94	100,0	8,1
8-iso PGF_{2α}	3147156,67	764771,11	187,2	47,8
Kontrolle (CsA)	3807600,20	359207,55	100,0	9,4
CsA	24024500,00	4482500,00	631,0	117,7
Kontrolle (PMA)	1220000,00	24897,96	100,0	2,0
PMA	2667800,00	130339,46	218,7	10,7

1.4.2 Einzelergebnisse des Inhibierung der H₂O₂-induzierten Chemolumineszenz

n = 3

	AUC [RLU]	MA	AUC [% der Kontrolle]	MA [%]
Kontrolle	4914200,00	165733,33	100,0	3,4
H₂O₂	27626666,67	2511555,56	562,2	9,1
NALC + H₂O₂	5253566,67	262355,56	106,9	5,0
BAPTA/AM + H₂O₂	18167333,33	444222,22	369,7	2,4
BAPTA/AM + NALC + H₂O₂	3602666,67	22355,56	103,3	0,6
TAPI-1 + H₂O₂	22551333,33	888888,89	458,9	3,9

1.5 Einzelergebnisse des Konzentrationsbestimmung von TNF- α

Dargestellt sind die Ergebnisse von Einfachbestimmungen (*) oder die Mittelwerte und Mittleren Abweichungen vom Mittelwert (MA) von Dreifachbestimmungen. Die prozentualen Angaben beziehen sich jeweils auf Zellüberstände vor der Simulation der Zellen (Kontrolle = 100 %).

n = 3

	TNF- α [pg/ml]	MA	TNF- α [% der Kontrolle]	MA [%]
Kontrolle unstim. Zellen	9,280 *	-	100,0	-
Unstimulierte Zellen	16,796 *	-	181,0	-
Kontrolle CsA	10,789 *	-	100,0	-
CsA	13,355 *	-	123,8	-
Kontrolle 8-iso PGF_{2α}	7,112	2,202	100,0	32,0
8-iso PGF_{2α}	122,040	30,446	1716,0	328,1
Kontrolle PGF_{2α}	18,903	4,486	100,0	23,9
PGF_{2α}	208,305	11,159	1102,0	120,3
Kontrolle H₂O₂	9,333	2,497	100,0	26,8
H₂O₂	34,790	11,044	372,8	119,0
Kontrolle SNAP	8,436	3,001	100,0	35,6
SNAP	13,459	1,392	159,5	15,0
Kontrolle PMA	14,944 *	-	100,0	-
PMA	279,693 *	-	1871,6	-
Kontrolle LPS	8,999 *	-	100,0	-
LPS	3314,519 *	-	36832,1	-

* Einzelmessung

2 Einzelergebnisse der Bestimmung von sCD163 und 8-iso PGF_{2α} in BALF von Patienten mit Cystischer Fibrose

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (MW) und Mittleren Abweichungen vom Mittelwert (MA) von Dreifachbestimmungen. Die 1. bronchoalveoläre Lavage (1. BAL) wurde bei allen Patienten als basale Konzentrationen für die Bestimmung von sCD163, respektive 8-iso PGF_{2α} auf 100 % gesetzt. Zur Auswertung wurden die Konzentrationen der 2. und 3. BAL prozentual auf die 1. BAL bezogen.

Für die Auswertung der Konzentrationen an sCD163 und 8-iso PGF_{2α} in BALF der wurden nur die Proben aufgenommen, von denen der Basiswert (1. BAL) vorhanden war.

2.1 Einzelergebnisse der Proben nach Behandlung mit rhDNase I (Interventionsgruppe)

Studienzentrum A

n = 3

Proben-Nr.	sCD163				8-iso PGF _{2α}				
	MW [µg/ml]	MA [µg/ml]	MW [%]	MA [%]	MW [pg/ml]	MA [pg/ml]	MW [%]	MA [%]	
1.BAL	408	0,278	0,020	100,0	7,2	23,220	5,413	100,0	23,3
	416	0,263	0,005	100,0	1,9	24,300	7,607	100,0	31,3
	421	0,121	0,002	100,0	1,7	24,890	2,730	100,0	8,4
2.BAL	408	0,366	0,023	131,7	6,3	13,720	4,620	56,5	19,0
	416	0,305	0,041	116,0	13,4	16,120	4,367	66,3	18,0
	421	0,271	0,029	224,0	10,7	23,530	3,890	94,5	15,6
3.BAL	408	0,337	0,014	121,2	4,2	18,503	11,276	79,7	18,6
	416	0,310	0,018	117,9	9,4	16,420	3,496	67,6	21,2
	421	0,275	0,008	227,3	2,9	10,300	0,760	41,4	3,5

Studienzentrum B

n = 3

	Proben-Nr.	sCD163				8-iso PGF _{2α}			
		MW [µg/ml]	MA [µg/ml]	MW [%]	MA [%]	MW [pg/ml]	MA [pg/ml]	MW [%]	MA [%]
1.BAL	101	0,244	0,005	100,0	18,3	16,276	7,322	100,0	45,0
	106	0,364	0,027	100,0	7,8	16,165	9,096	100,0	43,7
	107	0,349	0,027	100,0	29,6	2,965	0,915	100,0	1,9
	111	0,262	0,078	100,0	9,1	18,710	13,830	100,0	64,2
	121	0,192	0,064	100,0	9,1	129,673	35,262	100,0	27,2
2.BAL	101	-	-	-	-	-	-	-	-
	106	0,221	0,014	60,9	3,9	21,884	8,7	121,8	48,3
	107	0,279	0,022	79,9	6,1	38,228	16,7	369,0	161,5
	111	0,160	0,061	61,0	23,3	24,950	10,7	124,1	53,2
	121	0,028	0,010	14,3	5,2	28,597	2,7	94,3	8,8
3.BAL	101	-	-	-	-	-	-	-	-
	106	0,183	0,023	50,2	6,3	49,440	10,8	275,2	59,9
	107	0,107	0,032	30,8	9,3	33,631	11,2	324,7	108,1
	111	0,057	0,012	21,6	4,7	64,895	21,0	351,9	85,2
	121	-	-	-	-	-	-	-	-

Mittelwerte Studienzentrum A und B

	sCD163		8-iso PGF _{2α}	
	MW [µg/ml]	MW [%]	MW [pg/ml]	MW [%]
1. BAL	0,261	100,0	34,275	100,0
2. BAL	0,233	98,5	23,861	132,4
3. BAL	0,211	94,8	32,198	190,1

2.2 Einzelergebnisse der Proben nach Behandlung mit rhDNase I (Kontrollgruppe)

Studienzentrum A

n = 3

	Proben-Nr.	sCD163				8-iso PGF _{2α}			
		MW [µg/ml]	MA [µg/ml]	MW [%]	MA [%]	MW [pg/ml]	MA [pg/ml]	MW [%]	MA [%]
1.BAL	401	0,282	0,025	100,0	8,9	26,410	6,187	100,0	23,4
	402	0,460	0,056	100,0	12,2	10,060	2,045	100,0	20,3
	423	0,371	0,045	100,0	12,1	33,680	16,511	100,0	49,0
2.BAL	401	0,369	0,015	130,9	4,1	24,270	9,467	104,5	40,8
	402	0,267	0,053	58,0	19,9	18,220	5,493	74,0	22,6
	423	0,281	0,045	75,7	16,0	69,060	4,312	205,0	12,8
3.BAL	401	0,355	0,064	125,9	18,0	23,910	1,326	90,5	5,0
	402	0,259	0,019	56,3	7,3	60,960	0,325	575,1	3,1
	423	0,289	0,021	77,9	7,3	11,190	2,140	33,2	6,4

Studienzentrum B

n = 3

	Proben-Nr.	sCD163				8-iso PGF _{2α}			
		MW [µg/ml]	MA [µg/ml]	MW [%]	MA [%]	MW [pg/ml]	MA [pg/ml]	MW [%]	MA [%]
1.BAL	105	0,016	0,003	100,0	7,5	24,229	9,328	100,0	38,5
	108	-	-			-	-		
	109	-	-			-	-		
	119	0,016	0,001	100,0	33,2	26,158	1,889	100,0	7,2
	124	0,016	0,001	100,0	12,8	30,334	5,726	100,0	18,9
2.BAL	105	0,161	0,034	1006,3	212,5	22,130	4,362	91,3	18,0
	108	0,034	0,014	-	-	27,844	7,416	-	-
	109	0,073	0,027	-	-	69,170	20,717	-	-
	119	0,045	0,003	281,3	18,8	24,014	6,066	91,8	23,2
	124	0,238	0,053	1487,5	331,3	41,671	11,392	20,7	14,5

Proben-Nr.	sCD163				8-iso PGF _{2α}			
	MW [µg/ml]	MA [µg/ml]	MW [%]	MA [%]	MW [pg/ml]	MA [pg/ml]	MW [%]	MA [%]
3.BAL								
105	-	-			-	-		
108	0,168	0,003	-	-	23,150	9,522	-	-
109	-	-			-	-		
119	-	-			-	-		
124	-	-			-	-		

Mittelwerte der Kontrollgruppe Studienzentrum A und B

	sCD163		8-iso PGF _{2α}	
	MW [µg/ml]	MW [%]	MW [pg/ml]	MW [%]
1. BAL	0,193	100,0	25,145	100,0
2. BAL	0,183	506,6	37,047	98,1
3. BAL	0,268	86,7	29,803	233,0

3 Interaktion von sCD163 mit aktivierten humanen T-Lymphocyten

3.1 Einzelergebnisse der Bestimmung der Konzentration von sCD163 in humanen Spezimen verschiedener Blutspender

Die folgende Tabelle zeigt die mittels ELISA ermittelten Konzentrationen an sCD163 und die Moleküle sCD163 pro T-Lymphocyt für ein Molekulargewicht von 130 kDa. Dargestellt sind die Mittelwerte und Mittlere Abweichungen vom Mittelwert (MA) von Dreifachbestimmungen.

n = 3

	Konzentration sCD163 in T-Lymphocyten [$\mu\text{g}/10^7$ T-Lymphocyten]		Moleküle sCD163/ T-Lymphocyt		Konzentration sCD163 in Plasma [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	
	Mittelwert	MA	Mittelwert	MA	Mittelwert	MA
Spender 1	0,120	0,024	55753,7	11126,4	0,031	0,011
Spender 2	0,144	0,019	66706,3	8692,5	0,071	0,024
Spender 3	0,159	0,015	73486,5	6954,0	0,079	0,031
Spender 4	0,123	0,032	56796,8	14603,4	0,074	0,021
Spender 5	0,090	0,008	41671,9	3824,7	0,065	0,027
Spender 6	0,126	0,025	58361,5	11474,1	0,070	0,024
Spender 7	0,067	0,003	31240,9	1390,8	0,055	0,034
Spender 8	0,141	0,006	65149,9	2820,3	0,048	0,020
Spender 9	0,159	0,003	73610,9	1410,2	0,050	0,003
Spender 10	0,265	0,005	122938,7	2444,3	0,073	0,036
Spender 11	0,139	0,041	64444,8	18802,3	0,020	0,003
Spender 12	0,433	0,027	200545,1	12472,2	0,165	0,067
Spender 13	0,165	0,013	76431,3	6110,7	0,027	0,014

3.2 Einzelergebnisse der Bestimmung der Menge sCD163-Myosin-Komplexe in humanen T-Lymphocyten

3.2.1 Einzelergebnisse der Bestimmung in T-Lymphocyten verschiedener Spender

Die Bestimmung erfolgte jeweils aus $1 \cdot 10^7$ T-Lymphocyten. Die prozentualen Werte beziehen sich auf die Absorption des Mediums, die auf 100 % gesetzt wurde. Für die Spender 1 bis 7 diente *Medium 1* als Bezug und für die Spender 8 bis 13 *Medium 2*. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (MW) und Mittleren Abweichungen vom Mittelwert (MA) von Dreifachbestimmungen.

n = 3

	MW (OD ₄₅₀)	MA	MW [%] bezogen auf Medium	MA [%]
Medium 1	0,086	0,001	100,0	1,0
Spender 1	0,238	0,011	277,3	9,8
Spender 2	0,266	0,019	310,6	15,7
Spender 3	0,292	0,009	341,4	10,3
Spender 4	0,267	0,021	312,2	2,8
Spender 5	0,239	0,017	279,1	15,0
Spender 6	0,255	0,018	297,7	24,1
Spender 7	0,172	0,035	200,4	37,1
Medium 2	0,048	0,001	100,0	1,4
Spender 8	0,092	0,003	192,4	6,5
Spender 9	0,131	0,007	273,6	14,8
Spender 10	0,340	0,022	709,0	46,1
Spender 11	0,116	0,008	242,4	17,6
Spender 12	0,570	0,004	1186,8	9,3
Spender 13	0,126	0,003	261,8	6,0

3.2.2 Einzelergebnisse der Bestimmung in humanen T-Lymphocyten gepoolter Spender

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der Optischen Dichte bei 450 nm (OD_{450}) von Sechsfachmessungen.

n = 6

	Mittelwert (OD_{450})	SD
Medium	0,074	0,019
Unbehandelte T-Lymphocyten	0,160	0,013
T-Lymphocyten + PMA	0,166	0,015
T-Lymphocyten + PMA + sCD163	0,367	0,027
sCD163	0,082	0,007

3.2.2.1 ANOVA-Statistik, einseitige Varianzanalyse

Dargestellt sind jeweils die einzelnen Gruppen zueinander (*vs, versus*). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen liegen bei einem p-Wert $< 0,05$ vor. Bei $p > 0,05$ unterscheiden sich die Gruppen nicht signifikant (n.s.) voneinander.

Tukey`s Multipler Vergleichstest	p-Wert
Medium vs unbehandelte T-Lymphocyten	p < 0,001
Medium vs T-Lymphocyten + PMA	p < 0,001
Medium vs T-Lymphocyten + PMA + sCD163	p < 0,001
Medium vs sCD163	n.s.
unbehandelte T-Lymphocyten vs T-Lymphocyten + PMA	n.s.
unbehandelte T-Lymphocyten vs T-Lymphocyten + PMA + sCD163	p < 0,001
unbehandelte T-Lymphocyten vs sCD163	p < 0,001
T-Lymphocyten + PMA vs T-Lymphocyten + PMA + sCD163	p < 0,001
T-Lymphocyten + PMA + sCD163 vs sCD163	p < 0,001

4 Stimulation der Expression von CD163 durch Steroidhormone

4.1 Einzelergebnisse der Stimulation der Expression von CD163 durch Steroidhormone

Die ermittelten Werte beziehen sich auf 10000 gezählte vitaler Monocyten. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) von Sechsfachmessungen. Die Zellen ohne Zugabe von Stimulanzen (unstim) wurden auf 100 % CD163-positive Monocyten gesetzt.

n = 6

	Mittelwert CD163 positive-Monocyten [%]	SD [%]	CD163 positive-Monocyten bezogen auf maximal-stimulierte Monocyten (FP = 100 %) [%]	SD bezogen auf maximal-stimulierte Monocyten [%]
unstim	26,8	3,3	100,0	12,5
HC	38,8	6,8	148,2	26,1
DHEA	28,8	3,8	110,0	14,4
Androstendiol	35,2	1,2	134,2	4,6
Androstendion	18,2	1,3	69,6	4,9
Testosteron	13,2	3,8	50,2	14,5
17β-Estradiol	34,2	3,5	130,6	13,5

4.2 ANOVA-Statistik, einseitige Varianzanalyse der Bestimmung der CD163-Dichte auf der Monocytenoberfläche

Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz wurde das Programm GraphPad Prism Version 4.0 verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels ANOVA mit dem Test nach Tukey. Dargestellt sind die einzelnen Gruppen zueinander (vs, *versus*). Eine statistische Signifikanz liegt bei einem $p < 0,05$ vor. Gruppen die eine p -Wert $> 0,05$ haben unterscheiden sich statistisch nicht voneinander (n.s.).

Tukey`s Multipler Vergleichstest	p-Wert
unstim vs HC	$p < 0,001$
unstim vs DHEA	$p > 0,05$
unstim vs Androstendiol	$p < 0,01$
unstim vs Androstendion	$p < 0,05$
unstim vs Testosteron	$p < 0,001$
unstim vs 17β -Estradiol	$p < 0,05$

E. Zusammenfassung

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die zelluläre Regulation des monocyten- und macrophagenspezifischen Oberflächenproteins CD163 untersucht und klinische Aspekte der löslichen Form des CD163 (sCD163) diskutiert. Da bekannt war, dass sCD163 durch eine Hemmung der Proliferation von T-Lymphocyten antiinflammatorisch wirkt, wurde zudem die Interaktion des sCD163 mit T-Lymphocyten näher betrachtet.

sCD163 wird *in vivo* durch einen inflammatorischen Reiz von der Zelloberfläche abgespalten. Bislang waren jedoch noch keine Mediatoren charakterisiert worden, die immer unter Entzündungsbedingungen vorhanden sind. In den eigenen Untersuchungen des Shedding von CD163 konnten für die Generierung des sCD163 neue endogene Aktivatoren identifiziert werden. Sowohl reaktive Sauerstoffspezies, wie Wasserstoffperoxid oder Stickstoffmonoxid, als auch das Produkt von endogenen Oxidationsreaktionen mit reaktiven Sauerstoffspezies 8-iso Prostaglandin $F_{2\alpha}$ erwiesen sich als potente Aktivatoren des Shedding von CD163. Neben den bekannten physiologischen Funktionen des 8-iso Prostaglandin $F_{2\alpha}$, wie Vasokonstriktion und Plättchenaggregation, konnte erstmals eine neue Funktion bei Entzündungen definiert werden. Dieser Effekt wurde spezifisch durch 8-iso Prostaglandin $F_{2\alpha}$ hervorgerufen, da das isomere Prostaglandin $F_{2\alpha}$ unter gleichen Bedingungen keinen Einfluss auf das Shedding von CD163 ausübte.

Das Immunsuppressivum Cyclosporin A als exogene Verbindung konnte ebenfalls als Induktor des Shedding von CD163 ermittelt werden. Damit konnte zusätzlich zur bekannten immunmodulatorischen Wirkung des Cyclosporin A durch die Hemmung der Interleukin-2-Synthese eine weitere antiinflammatorische Wirkung über Monocyten/Macrophagen aufgezeigt werden.

Durch Untersuchungen der Inhibierung des Shedding von CD163 konnten Gemeinsamkeiten bezüglich der in die sCD163-Generierung involvierten Mediatoren dargestellt werden. Obwohl die untersuchten Verbindungen wahrscheinlich über unterschiedliche Signalwege das Shedding von CD163 induzieren, waren die Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies und intrazellulärem Calcium und die Beteiligung einer TIMP-3-sensitiven Metalloproteinase an diesem Prozess essentiell. Am Beispiel der intrazellulären Bildung von Wasserstoffperoxid konnte für alle untersuchten Aktivatoren gezeigt werden,

dass sie in der Lage waren, in unterschiedlichem Ausmaß die Bildung dieser Sauerstoffspezies zu induzieren.

Für das induzierte Shedding von CD163 konnte darüber hinaus eine Möglichkeit aufgezeigt werden, die Inhibierung der Abspaltung als Testsystem zum Screening der Wirksamkeit und Toxizität neu entwickelter Hydroxamsäure-Derivate einzusetzen.

Bei einem Vergleich zwischen dem Shedding von CD163 und *Tumor necrosis factor- α* (TNF- α) ergaben sich Gemeinsamkeiten durch die Induktion des Shedding beider Verbindungen durch 8-iso Prostaglandin F_{2 α} und in sehr viel geringerem Maße durch Wasserstoffperoxid. Im Gegensatz dazu waren deutliche Unterschiede in dem Ausmaß der induzierten Stimulation des Shedding durch Stickstoffmonoxid, Prostaglandin F_{2 α} und Cyclosporin A zu erkennen. Im Hinblick auf die entgegengesetzten Wirkungen von sCD163 als antiinflammatorisch wirkende Verbindung und TNF- α als proinflammatorisches Cytokin, konnte dargestellt werden, dass die Freisetzung durch unterschiedliche Aktivatoren erfolgt. An der Freisetzung dieser Verbindungen sind wahrscheinlich verschiedene, aber nahe verwandte Metalloproteinasen beteiligt.

Nach Bestimmung der Konzentrationen von sCD163 und 8-iso PGF_{2 α} in bronchoalveolärer Lavage-Flüssigkeit von Patienten mit Cystischer Fibrose konnten keine abschließende Aussagen über die Eignung beider Parameter als biologische Marker für chronische Entzündungen der Lunge bei diesen Patienten getroffen werden. Ziel dieser Untersuchung war ein Vergleich des sCD163 als antiinflammatorische Verbindung und 8-iso Prostaglandin F_{2 α} als Produkt proinflammatorischer Oxidationsreaktionen im Entzündungsgeschehen unter Behandlung mit antiinflammatorischer rhDNase I. Zur Bestimmung der Konzentrationen der beiden Parameter wurden aus einer klinischen Studie 13 Patientenproben von zwei Studienzentren untersucht. Obwohl innerhalb der einzelnen Studienzentren Trends in den Konzentrationsänderungen von sCD163 und 8-iso Prostaglandin F_{2 α} zu erkennen waren, konnten diese Tendenzen nicht auf die gesamte Studiengruppe übertragen werden. Im Mittel wurden keine deutlichen Konzentrationsänderungen für beide Parameter ermittelt.

Weiterführend zu der Kenntnis, dass sCD163 die antiinflammatorische Wirkung über eine Interaktion des Proteins mit humanen T-Lymphocyten und nachfolgender Hemmung der Proliferation dieser Zellen ausübt, wurde diese Wechselwirkung genauer untersucht. In

quantitativen Bestimmungen des sCD163 in isolierten T-Lymphocyten verschiedener Spender konnte erstmals gezeigt werden, dass sCD163 zu einem Teil konstitutiv in die T-Lymphocyten aufgenommen wird und dass diese Aufnahme durch proinflammatorische Aktivierung der T-Lymphocyten stark gesteigert werden kann.

Durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen unstimulierter T-Lymphocyten konnte die intrazelluläre Lokalisation des sCD163 visualisiert werden. Nach Aktivierung der Zellen mit einem proinflammatorischen Reiz fand innerhalb der Zellen eine Translokation des sCD163 aus dem cytoplasmatischen Bereich zur Zellmembran statt. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass abhängig vom Aktivierungsstatus der T-Lymphocyten eine Umverteilung des sCD163 innerhalb der Zellen erfolgt.

Eine quantitative Bestimmung des sCD163 und seines Bindungspartners in T-Lymphocyten nichtmuskuläres Myosin Typ IIA gelang mittels eines neu entwickeltem ELISA, der spezifisch sCD163 und Myosin ausschließlich im Komplex erfasst.

Neben endogenen Verbindungen, die eine Herabregulation des CD163 durch Abspaltung von der Zelloberfläche induzieren, konnten in dieser Arbeit auch endogene Steroidhormone identifiziert werden, die stimulierend oder suppressiv auf die Expression des CD163 auf der Zelloberfläche wirkten. So erwiesen sich Androstendiol und 17 β -Estradiol bei gleicher Konzentration ähnlich potent in der Induktion der Expression des CD163 wie Hydrocortison. Im Gegensatz dazu wurde die konstitutiv ablaufende CD163-Expression durch Androstendion und Testosteron unterdrückt. Das biosynthetische Vorläufermolekül dieser Hormone Dehydroepiandrosteron zeigte in diesen Versuchen keinen Einfluss auf die CD163-Expression, woraus gefolgert wurde, dass erst nach Metabolisierung eine Reaktion mit entsprechenden Monocyten-/ Macrophagenrezeptoren erfolgt.

Die eingesetzten Konzentrationen der Hormone lagen in Anlehnung an die physiologische Hydrocortisonkonzentration insgesamt in einem supraphysiologischen Bereich. Eine *In-vivo*-Relevanz kann damit zunächst nicht angenommen werden und muss in weiteren Versuchen mit niedrigeren Hormonkonzentrationen geklärt werden.

Damit konnte durch die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen ein grundlegender Beitrag zur Charakterisierung der Regulation der Proteinexpression und des Shedding von CD163 in humanen Monocyten sowie der Interaktion des sCD163 mit T-Lymphocyten geleistet werden.

Summary

In the present thesis, cellular regulation of the monocyte/macrophage specific membrane protein CD163 was investigated and clinical aspects of the soluble form of CD163 (sCD163) were discussed. Based on the knowledge that sCD163 plays a role in the down-regulation of inflammations via inhibition of T-lymphocytes, the interaction of sCD163 with T-lymphocytes was examined in more detail.

sCD163 is shed from the cell surface *in vivo* upon an inflammatory stimulus. So far no mediators had been characterized that are persistently present under inflammatory conditions. In the present investigation of the shedding of CD163, new endogenous activators for the generation of sCD163 were successfully identified. Both reactive oxygen species, as hydrogen peroxide or nitric monoxide, and the product of endogenous oxidative reactions 8-iso prostaglandin F_{2α} turned out to be potent activators of the shedding of CD163. In addition to the known physiological functions of 8-iso prostaglandin F_{2α} as vasoconstriction and platelet aggregation a novel function of this compound in inflammation was defined. This effect was specifically generated by 8-iso prostaglandin F_{2α} as prostaglandin F_{2α} did not influence the shedding of CD163 under the same conditions.

As an exogenous compound the immunosuppressive drug cyclosporine A was also established as an inductor of the shedding of CD163. Accordingly, another anti-inflammatory effect via monocytes/macrophages was pointed out in addition to the well known immunomodulatory effects of cyclosporine A via inhibition of interleukin-2 synthesis.

Investigations of the inhibition of shedding of CD163 led to the identification of key mediators involved in the generation of sCD163. Even though the tested compounds may induce shedding via different signal transduction pathways, the presence of reactive oxygen species and intracellular calcium and the involvement of a TIMP-3 sensitive metalloproteinase were essential in this process. The tested activators revealed different abilities for inducing the formation of reactive oxygen species.

The inhibition of hydrogen peroxide induced shedding of CD163 was successfully established as a model system for screening the potency and toxicity of newly developed hydroxamic acid derivatives.

Comparing shedding of CD163 and tumor necrosis factor- α (TNF- α), similarities in induced shedding by 8-iso prostaglandin $F_{2\alpha}$ and to a lower extent by hydrogen peroxide were seen. In contrast, significant differences were recognized in the extent of shedding induced via stimulation by nitric oxide, prostaglandin $F_{2\alpha}$, and cyclosporine A. With regard to the opposite effects of sCD163 as an anti-inflammatory compound and TNF- α as a pro-inflammatory cytokine it was demonstrated that shedding occurred via induction by different activators. Most probably different but closely related metalloproteinases were involved in the shedding of these compounds.

The determination of concentrations of sCD163 and 8-iso prostaglandin $F_{2\alpha}$ in bronchoalveolar lavage fluid of patients with cystic fibrosis allowed no conclusive statement about the suitability of both parameters as marker for chronic inflammation. The aim of this investigation was a comparison of sCD163 as an anti-inflammatory compound and 8-iso prostaglandin $F_{2\alpha}$ as a product of pro-inflammatory oxidative reactions during inflammation under therapy with anti-inflammatory rhDNase I. For quantification of the concentrations of both parameters, samples of 13 patients participating in a clinical study from two study centres were obtained. Even though trends in changes of the concentrations of sCD163 and 8-iso prostaglandin $F_{2\alpha}$ were obvious within the samples from the individual centres, no tendencies conferred to the whole group of both centres. Consequently, the mean value displayed no changes of the concentrations of both parameters.

In extension to earlier insights in the anti-inflammatory effects of sCD163 via interaction of the protein with human T-lymphocytes and subsequent inhibition of the proliferation of these cells these interactions were analyzed in detail. Quantifications of sCD163 in isolated T-lymphocytes from different donors revealed for the first time that sCD163 is constitutively taken up into T-lymphocytes and that this process can significantly be enhanced by pro-inflammatory activation of T-lymphocytes.

The intracellular localization of sCD163 was visualized by fluorescence microscopy of T-lymphocytes. Upon activation of the cells by a pro-inflammatory stimulus a translocalization of sCD163 was observed within the cells from the cytoplasmic region to the cell membrane. Thus, it was shown for the first time that an activation dependent translocalization of sCD163 occurs within the T-lymphocytes.

The quantitative determination of sCD163 and non-muscular myosin type IIA as its intracellular binding partner in T-lymphocytes was successful using a newly developed ELISA that detects specifically sCD163 and myosin as a complex.

In addition to endogenous compounds that induce the down-regulation of CD163 via shedding, endogenous steroid hormones that stimulate or suppress the expression of CD163 on the cell surface of human monocytes/macrophages were identified. Particularly androstenediol and 17 β -estradiol turned out to be as potent in the induction of the protein expression as hydrocortisone at equimolar concentrations. In contrast, androstenedione and testosterone suppressed the constitutive expression of CD163. The biosynthetic precursor of these hormones, dehydroepiandrosterone, showed no influence on the expression of CD163 in these investigations. It was concluded that an interaction with corresponding monocyte/macrophage receptors occurs only after metabolization.

The concentrations of the hormones used in these experiments corresponded to the physiological concentration of hydrocortisone, but were in a supraphysiological range for the other hormones. At this point an *in vivo* relevance of these observations cannot be assumed yet. Additional investigations with lower concentrations of the hormones are needed.

To conclude, the investigations described in this thesis contributed substantially to the understanding of the regulation of the protein expression and shedding of CD163 in human monocytes and of the interaction of sCD163 with T-lymphocytes.

F. Abkürzungsverzeichnis

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Einheiten sind nicht aufgeführt.

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
AK	Antikörper
AUC	Fläche unter der Kurve (engl.: <i>area under the curve</i>)
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BALF	bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit
BSA	bovines Serumalbumin
CD	Differenzierungsantigen (engl.: <i>cluster of differentiation</i>)
CF	Cystische Fibrose (Synonym: Mukoviszidose)
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductant receptor</i>
CL	Chemolumineszenz
CsA	Cyclosporin A
d	Tag (lat.: <i>dies</i>)
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEA-S	Dehydroepiandrosteron-Sulfat
D-Pen	D-Penicillamin
ELISA	enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest (engl.: <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflusszytometrie (eng.: <i>fluorescence activated cell sorter</i>)
FCS	fötales Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i>)
FSC	Vorwärtsstreuung (engl.: <i>forward scatter</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FP	Fluticason-17-propionat
ggt	Tropfen
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin

kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MA	Mittlere Abweichung vom Mittelwert
MG	Molekulargewicht
MMP	Matrixmetalloproteinase
NALC	N-Acetylcystein
NO	Stickstoffmonoxid
n.s.	nicht signifikant
NSB	unspezifische Bindung (engl.: <i>non specific binding</i>)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Polyethylen
Pen	Penicillin
PG	Prostaglandin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
POD	Peroxidase
PVP	Polyvinylpyrrolidon
rhDNase I	rekombinante humane DNase I
RLU	Relative Lichteinheit (engl.: <i>relative light unit</i>)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl.: <i>reactive oxygen species</i>)
RT	Raumtemperatur
sCD163	lösliches (<i>soluble</i>) CD163
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SNAP	S-Nitroso-N-acetylpenicillamin
SSC	Seitwärtsstreuung (engl. <i>Sideward scatter</i>)
Strep	Streptavidin
Tab.	Tabelle
TACE	<i>Tumor necrosis Factor-α converting enzyme</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
U	Enzymeinheit (Unit)
UV	Ultraviolett
vs	gegen (lat.: <i>versus</i>)

G. Literaturverzeichnis

1. Gourley, T.S., et al., *Generation and maintenance of immunological memory*. Semin Immunol, 2004. **16**(5): p. 323-33.
2. Kurtz, J., *Memory in the innate and adaptive immune systems*. Microbes Infect, 2004. **6**(15): p. 1410-7.
3. Carroll, M.C. and V.M. Holers, *Innate autoimmunity*. Adv Immunol, 2005. **86**: p. 137-57.
4. Illes, P., et al., *Pathophysiologie der Entzündung*, in *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, W. Forth, et al., Editors. 1998, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, Berlin, Oxford. p. 217-219.
5. Wang, X., H. Zhao, and R. Andersson, *Proteomics and leukocytes: an approach to understanding potential molecular mechanisms of inflammatory responses*. J Proteome Res, 2004. **3**(5): p. 921-9.
6. Ogawa, M., *Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells*. Blood, 1993. **81**(11): p. 2844-53.
7. Clark, S.C. and R. Kamen, *The human hematopoietic colony-stimulating factors*. Science, 1987. **236**(4806): p. 1229-37.
8. Dexter, T.M. and E. Spooncer, *Growth and differentiation in the hemopoietic system*. Annu Rev Cell Biol, 1987. **3**: p. 423-41.
9. Welte, K., et al., *Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. Effects on hematopoiesis in normal and cyclophosphamide-treated primates*. J Exp Med, 1987. **165**(4): p. 941-8.
10. Begemann, M., *Praktische Hämatologie*. Vol. 11. 1998, Stuttgart: Thieme Verlag. XXXIV, 676.
11. Gullberg, U., et al., *Processing and targeting of granule proteins in human neutrophils*. J Immunol Methods, 1999. **232**(1-2): p. 201-10.
12. Clifford, D.P. and J.E. Repine, *Hydrogen peroxide mediated killing of bacteria*. Mol Cell Biochem, 1982. **49**(3): p. 143-9.
13. Ryrfeldt, A., G. Bannenberg, and P. Moldeus, *Free radicals and lung disease*. Br Med Bull, 1993. **49**(3): p. 588-603.
14. Askenase, P.W., *Mechanisms of hypersensitivity: cellular interactions. Basophil arrival and function in tissue hypersensitivity reactions*. J Allergy Clin Immunol, 1979. **64**(2): p. 79-89.
15. Popper, H., et al., *Activation and release of enzymes and major basic protein from guinea pig eosinophil granulocytes induced by different inflammatory stimuli and other substances. A histochemical, biochemical, and electron microscopic study*. Inflammation, 1989. **13**(2): p. 147-62.
16. Zola, H., et al., *CD molecules 2005: human cell differentiation molecules*. Blood, 2005.

17. Kupfer, A. and S.J. Singer, *Cell biology of cytotoxic and helper T cell functions: immunofluorescence microscopic studies of single cells and cell couples*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 309-37.
18. Taylor, A., et al., *T regulatory cells in allergy and health: a question of allergen specificity and balance*. Int Arch Allergy Immunol, 2004. **135**(1): p. 73-82.
19. Muller, W.A. and G.J. Randolph, *Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(5): p. 698-704.
20. Johnston, R.B., Jr., *Current concepts: immunology. Monocytes and macrophages*. N Engl J Med, 1988. **318**(12): p. 747-52.
21. Kleine, B., *Das Immunsystem des Menschen*, in *Biogene Arzneistoffe*, H. Rimpler, Editor. 1999, Deutscher Apotheker Verlag: Stuttgart. p. 525-543.
22. Zigmond, S.H., *Chemotaxis by polymorphonuclear leukocytes*. J Cell Biol, 1978. **77**(2): p. 269-87.
23. Takahashi, K., M. Naito, and M. Takeya, *Development and heterogeneity of macrophages and their related cells through their differentiation pathways*. Pathol Int, 1996. **46**(7): p. 473-85.
24. Khansari, N. and H.H. Fudenberg, *Functional heterogeneity of human cord blood monocytes*. Scand J Immunol, 1984. **19**(4): p. 337-42.
25. Wang, S.Y., et al., *Heterogeneity of human blood monocyte: two subpopulations with different sizes, phenotypes and functions*. Immunology, 1992. **77**(2): p. 298-303.
26. Herrmann, F., et al., *Interleukin-2 and interferon-gamma recruit different subsets of human peripheral blood monocytes to secrete interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha*. Clin Exp Immunol, 1989. **77**(1): p. 97-100.
27. Lewis, C.E., et al., *Heterogeneity among human mononuclear phagocytes in their secretion of lysozyme, interleukin 1 and type-beta transforming growth factor: a quantitative analysis at the single-cell level*. Eur J Immunol, 1989. **19**(11): p. 2037-43.
28. Dransfield, I., et al., *Comparison of human monocytes isolated by elutriation and adherence suggests that heterogeneity may reflect a continuum of maturation/activation states*. Immunology, 1988. **63**(3): p. 491-8.
29. Rutherford, M.S., A. Witsell, and L.B. Schook, *Mechanisms generating functionally heterogeneous macrophages: chaos revisited*. J Leukoc Biol, 1993. **53**(5): p. 602-18.
30. Bursuker, I. and R. Goldman, *On the origin of macrophage heterogeneity: a hypothesis*. J Reticuloendothel Soc, 1983. **33**(3): p. 207-20.
31. Ormerod, M.G., *Flow Cytometry*. Vol. 2. 1999, New York: Springer Verlag New York Inc. XII, 109.
32. Zwadlo, G., et al., *A monoclonal antibody to a novel differentiation antigen on human macrophages associated with the down-regulatory phase of the inflammatory process*. Exp Cell Biol, 1987. **55**(6): p. 295-304.
33. Van den Heuvel, M.M., et al., *Regulation of CD 163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(5): p. 858-66.

34. Mues, B., et al., *Phenotypic characterization of macrophages in human term placenta*. Immunology, 1989. **67**(3): p. 303-7.
35. Law, S.K., et al., *A new macrophage differentiation antigen which is a member of the scavenger receptor superfamily*. Eur J Immunol, 1993. **23**(9): p. 2320-5.
36. Högger, P., et al., *Identification of the integral membrane protein RM3/1 on human monocytes as a glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family (CD163)*. J Immunol, 1998. **161**(4): p. 1883-90.
37. Högger, P., et al., *Biochemical characterization of a glucocorticoid-induced membrane protein (RM3/1) in human monocytes and its application as model system for ranking glucocorticoid potency*. Pharm Res, 1998. **15**(2): p. 296-302.
38. Resnick, D., A. Pearson, and M. Krieger, *The SRCR superfamily: a family reminiscent of the Ig superfamily*. Trends Biochem Sci, 1994. **19**(1): p. 5-8.
39. Hayashi, T., et al., *Physiological concentrations of 17beta-estradiol inhibit the synthesis of nitric oxide synthase in macrophages via a receptor-mediated system*. J Cardiovasc Pharmacol, 1998. **31**(2): p. 292-8.
40. Sulahian, T.H., et al., *Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155*. Cytokine, 2000. **12**(9): p. 1312-21.
41. Droste, A., C. Sorg, and P. Hogger, *Shedding of CD163, a novel regulatory mechanism for a member of the scavenger receptor cysteine-rich family*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **256**(1): p. 110-3.
42. Moller, H.J., et al., *Identification of the hemoglobin scavenger receptor/CD163 as a natural soluble protein in plasma*. Blood, 2002. **99**(1): p. 378-80.
43. Sarrias, M.R., et al., *The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system*. Crit Rev Immunol, 2004. **24**(1): p. 1-37.
44. Aruffo, A., et al., *CD6-ligand interactions: a paradigm for SRCR domain function?* Immunol Today, 1997. **18**(10): p. 498-504.
45. Kodama, T., et al., *Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils*. Nature, 1990. **343**(6258): p. 531-5.
46. Elomaa, O., et al., *Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages*. Cell, 1995. **80**(4): p. 603-9.
47. Koths, K., et al., *Cloning and characterization of a human Mac-2-binding protein, a new member of the superfamily defined by the macrophage scavenger receptor cysteine-rich domain*. J Biol Chem, 1993. **268**(19): p. 14245-9.
48. Goldberger, G., et al., *Human complement factor I: analysis of cDNA-derived primary structure and assignment of its gene to chromosome 4*. J Biol Chem, 1987. **262**(21): p. 10065-71.
49. Kitamoto, Y., et al., *cDNA sequence and chromosomal localization of human enterokinase, the proteolytic activator of trypsinogen*. Biochemistry, 1995. **34**(14): p. 4562-8.
50. Saito, H., et al., *Regulation of a novel gene encoding a lysyl oxidase-related protein in cellular adhesion and senescence*. J Biol Chem, 1997. **272**(13): p. 8157-60.

51. Dangott, L.J., et al., *Cloning of the mRNA for the protein that crosslinks to the egg peptide speract*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(7): p. 2128-32.
52. Wijngaard, P.L., et al., *Molecular characterization of the WC1 antigen expressed specifically on bovine CD4-CD8- gamma delta T lymphocytes*. J Immunol, 1992. **149**(10): p. 3273-7.
53. Jones, N.H., et al., *Isolation of complementary DNA clones encoding the human lymphocyte glycoprotein TI/Leu-1*. Nature, 1986. **323**(6086): p. 346-9.
54. Aruffo, A., et al., *The lymphocyte glycoprotein CD6 contains a repeated domain structure characteristic of a new family of cell surface and secreted proteins*. J Exp Med, 1991. **174**(4): p. 949-52.
55. Gebe, J.A., et al., *Molecular cloning, mapping to human chromosome 1 q21-q23, and cell binding characteristics of Spalpa, a new member of the scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) family of proteins*. J Biol Chem, 1997. **272**(10): p. 6151-8.
56. Gronlund, J., et al., *Cloning of a novel scavenger receptor cysteine-rich type I transmembrane molecule (M160) expressed by human macrophages*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6406-15.
57. Mayer, W.E. and H. Tichy, *A cDNA clone from the sea lamprey *Petromyzon marinus* coding for a scavenger receptor Cys-rich (SRCR) domain protein*. Gene, 1995. **164**(2): p. 267-71.
58. Li, X.J. and S.H. Snyder, *Molecular cloning of Ebnerin, a von Ebner's gland protein associated with taste buds*. J Biol Chem, 1995. **270**(30): p. 17674-9.
59. Cheng, H., M. Bjerknes, and H. Chen, *CRP-ductin: a gene expressed in intestinal crypts and in pancreatic and hepatic ducts*. Anat Rec, 1996. **244**(3): p. 327-43.
60. Takito, J., C. Hikita, and Q. Al-Awqati, *Hensin, a new collecting duct protein involved in the in vitro plasticity of intercalated cell polarity*. J Clin Invest, 1996. **98**(10): p. 2324-31.
61. Nunes, D.P., et al., *Bovine gall-bladder mucin contains two distinct tandem repeating sequences: evidence for scavenger receptor cysteine-rich repeats*. Biochem J, 1995. **310** (Pt 1): p. 41-8.
62. Zwadlo-Klarwasser, G., et al., *Glucocorticoid-induced appearance of the macrophage subtype RM 3/1 in peripheral blood of man*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1990. **91**(2): p. 175-80.
63. Zwadlo-Klarwasser, G., et al., *Influence of dexamethasone on the RM 3/1-positive macrophages in the peripheral blood and tissues of a New World monkey (the marmoset *Callithrix jacchus*)*. Int Arch Allergy Immunol, 1992. **97**(2): p. 178-80.
64. Buechler, C., et al., *Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(1): p. 97-103.
65. Topoll, H.H., et al., *Phenotypic dynamics of macrophage subpopulations during human experimental gingivitis*. J Periodontal Res, 1989. **24**(2): p. 106-12.
66. Verschure, P.J., C.J. Van Noorden, and C.D. Dijkstra, *Macrophages and dendritic cells during the early stages of antigen-induced arthritis in rats: immunohistochemical*

- analysis of cryostat sections of the whole knee joint.* Scand J Immunol, 1989. **29**(3): p. 371-81.
67. Goldstein, J.I., et al., *Increase in plasma and surface CD163 levels in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery.* Atherosclerosis, 2003. **170**(2): p. 325-32.
68. Philippidis, P., et al., *Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery.* Circ Res, 2004. **94**(1): p. 119-26.
69. Kristiansen, M., et al., *Identification of the haemoglobin scavenger receptor.* Nature, 2001. **409**(6817): p. 198-201.
70. Graversen, J.H., M. Madsen, and S.K. Moestrup, *CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma.* Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(4): p. 309-14.
71. Baeten, D., et al., *Macrophages expressing the scavenger receptor CD163: a link between immune alterations of the gut and synovial inflammation in spondyloarthritis.* J Pathol, 2002. **196**(3): p. 343-50.
72. Matsushita, N., et al., *Elevated levels of soluble CD163 in sera and fluids from rheumatoid arthritis patients and inhibition of the shedding of CD163 by TIMP-3.* Clin Exp Immunol, 2002. **130**(1): p. 156-61.
73. Hiraoka, A., et al., *Soluble CD163 in patients with liver diseases: very high levels of soluble CD163 in patients with fulminant hepatic failure.* J Gastroenterol, 2005. **40**(1): p. 52-6.
74. Högger, P. and C. Sorg, *Soluble CD163 inhibits phorbol ester-induced lymphocyte proliferation.* Biochem Biophys Res Commun, 2001. **288**(4): p. 841-3.
75. Frings, W., J. Dreier, and C. Sorg, *Only the soluble form of the scavenger receptor CD163 acts inhibitory on phorbol ester-activated T-lymphocytes, whereas membrane-bound protein has no effect.* FEBS Lett, 2002. **526**(1-3): p. 93-6.
76. Hintz, K.A., et al., *Endotoxin induces rapid metalloproteinase-mediated shedding followed by up-regulation of the monocyte hemoglobin scavenger receptor CD163.* J Leukoc Biol, 2002. **72**(4): p. 711-7.
77. Carpenter, G. and S. Cohen, *125I-labeled human epidermal growth factor. Binding, internalization, and degradation in human fibroblasts.* J Cell Biol, 1976. **71**(1): p. 159-71.
78. Downing, J.R., M.F. Roussel, and C.J. Sherr, *Ligand and protein kinase C downmodulate the colony-stimulating factor 1 receptor by independent mechanisms.* Mol Cell Biol, 1989. **9**(7): p. 2890-6.
79. Hooper, N.M., E.H. Karran, and A.J. Turner, *Membrane protein secretases.* Biochem J, 1997. **321** (Pt 2): p. 265-79.
80. McGeehan, G.M., et al., *Regulation of tumour necrosis factor-alpha processing by a metalloproteinase inhibitor.* Nature, 1994. **370**(6490): p. 558-61.
81. Mohler, K.M., et al., *Protection against a lethal dose of endotoxin by an inhibitor of tumour necrosis factor processing.* Nature, 1994. **370**(6486): p. 218-20.

82. Pandiella, A., et al., *Cleavage of membrane-anchored growth factors involves distinct protease activities regulated through common mechanisms*. J Biol Chem, 1992. **267**(33): p. 24028-33.
83. Massague, J., *Transforming growth factor-alpha. A model for membrane-anchored growth factors*. J Biol Chem, 1990. **265**(35): p. 21393-6.
84. Kishimoto, T.K., et al., *Regulation of L-selectin expression by membrane proximal proteolysis*. Agents Actions Suppl, 1995. **47**: p. 121-34.
85. Kahn, J., et al., *Membrane proximal cleavage of L-selectin: identification of the cleavage site and a 6-kD transmembrane peptide fragment of L-selectin*. J Cell Biol, 1994. **125**(2): p. 461-70.
86. del Pozo, M.A., et al., *Regulation of ICAM-3 (CD50) membrane expression on human neutrophils through a proteolytic shedding mechanism*. Eur J Immunol, 1994. **24**(11): p. 2586-94.
87. Ehlers, M.R., et al., *Proteolytic release of membrane-bound angiotensin-converting enzyme: role of the juxtamembrane stalk sequence*. Biochemistry, 1996. **35**(29): p. 9549-59.
88. Sadhukhan, R., et al., *The distal ectodomain of angiotensin-converting enzyme regulates its cleavage-secretion from the cell surface*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(1): p. 138-43.
89. Brakebusch, C., et al., *Structural requirements for inducible shedding of the p55 tumor necrosis factor receptor*. J Biol Chem, 1994. **269**(51): p. 32488-96.
90. Schwager, S.L., et al., *Phorbol ester-induced juxtamembrane cleavage of angiotensin-converting enzyme is not inhibited by a stalk containing intrachain disulfides*. Biochemistry, 1998. **37**(44): p. 15449-56.
91. Bazil, V. and J.L. Strominger, *Metalloprotease and serine protease are involved in cleavage of CD43, CD44, and CD16 from stimulated human granulocytes. Induction of cleavage of L-selectin via CD16*. J Immunol, 1994. **152**(3): p. 1314-22.
92. Arribas, J. and A. Borroto, *Protein ectodomain shedding*. Chem Rev, 2002. **102**(12): p. 4627-38.
93. Seals, D.F. and S.A. Courtneidge, *The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions*. Genes Dev, 2003. **17**(1): p. 7-30.
94. Schlondorff, J. and C.P. Blobel, *Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding*. J Cell Sci, 1999. **112 (Pt 21)**: p. 3603-17.
95. Nagase, H. and J.F. Woessner, Jr., *Matrix metalloproteinases*. J Biol Chem, 1999. **274**(31): p. 21491-4.
96. Kelly, E.A. and N.N. Jarjour, *Role of matrix metalloproteinases in asthma*. Curr Opin Pulm Med, 2003. **9**(1): p. 28-33.
97. Mohammed, F.F., D.S. Smookler, and R. Khokha, *Metalloproteinases, inflammation, and rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2003. **62 Suppl 2**: p. ii43-7.
98. Brew, K., D. Dinakarpanian, and H. Nagase, *Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1477**(1-2): p. 267-83.

99. Mullberg, J., et al., *Further evidence for a common mechanism for shedding of cell surface proteins*. FEBS Lett, 1997. **401**(2-3): p. 235-8.
100. Fan, H. and R. Derynck, *Ectodomain shedding of TGF- α and other transmembrane proteins is induced by receptor tyrosine kinase activation and MAP kinase signaling cascades*. Embo J, 1999. **18**(24): p. 6962-72.
101. Coyne, C.P., C. Willetto, and B.W. Fenwick, *A mechanism of TNFR type II (75 kDa) "shedding" in macrophages*. Shock, 1999. **11**(1): p. 19-28.
102. Althoff, K., et al., *Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins*. Eur J Biochem, 2000. **267**(9): p. 2624-31.
103. Jones, S.A., et al., *Shedding of the soluble IL-6 receptor is triggered by Ca²⁺ mobilization, while basal release is predominantly the product of differential mRNA splicing in THP-1 cells*. Eur J Immunol, 1998. **28**(11): p. 3514-22.
104. Suffredini, A.F., H.D. Hochstein, and F.G. McMahon, *Dose-related inflammatory effects of intravenous endotoxin in humans: evaluation of a new clinical lot of Escherichia coli O:113 endotoxin*. J Infect Dis, 1999. **179**(5): p. 1278-82.
105. Sulahian, T.H., et al., *Cross-linking of Fc γ R triggers shedding of the hemoglobin-haptoglobin scavenger receptor CD163*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(1): p. 271-7.
106. Henrotin, Y.E., P. Bruckner, and J.P. Pujol, *The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage*. Osteoarthritis Cartilage, 2003. **11**(10): p. 747-55.
107. Siwik, D.A. and W.S. Colucci, *Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium*. Heart Fail Rev, 2004. **9**(1): p. 43-51.
108. Yoo, H.G., et al., *IL-1 β induces MMP-9 via reactive oxygen species and NF- κ B in murine macrophage RAW 264.7 cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **298**(2): p. 251-6.
109. Belkhiri, A., et al., *Increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 by human endothelial cells after sublethal H₂O₂ exposure*. Lab Invest, 1997. **77**(5): p. 533-9.
110. Zhang, Z., et al., *Activation of tumor necrosis factor- α -converting enzyme-mediated ectodomain shedding by nitric oxide*. J Biol Chem, 2000. **275**(21): p. 15839-44.
111. Zhang, Z., et al., *Reactive oxygen species mediate tumor necrosis factor α -converting, enzyme-dependent ectodomain shedding induced by phorbol myristate acetate*. Faseb J, 2001. **15**(2): p. 303-5.
112. Mathy-Hartert, M., et al., *Reactive oxygen species downregulate the expression of pro-inflammatory genes by human chondrocytes*. Inflamm Res, 2003. **52**(3): p. 111-8.
113. Forman, H.J. and M. Torres, *Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **166**(12 Pt 2): p. S4-8.

114. Lander, H.M., *An essential role for free radicals and derived species in signal transduction*. *Faseb J*, 1997. **11**(2): p. 118-24.
115. Nemoto, S., et al., *Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(19): p. 7311-8.
116. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update*. *FEBS Lett*, 1992. **307**(1): p. 108-12.
117. Remacle, J., et al., *Low levels of reactive oxygen species as modulators of cell function*. *Mutat Res*, 1995. **316**(3): p. 103-22.
118. Finkel, T. and N.J. Holbrook, *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing*. *Nature*, 2000. **408**(6809): p. 239-47.
119. Fridovich, I., *Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?* *Ann N Y Acad Sci*, 1999. **893**: p. 13-8.
120. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts*. *Arch Biochem Biophys*, 1986. **246**(2): p. 501-14.
121. Cadenas, E., et al., *Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria*. *Arch Biochem Biophys*, 1977. **180**(2): p. 248-57.
122. Turrens, J.F., *Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain*. *Biosci Rep*, 1997. **17**(1): p. 3-8.
123. Boveris, A. and B. Chance, *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen*. *Biochem J*, 1973. **134**(3): p. 707-16.
124. Devalon, M.L., G.R. Elliott, and W.E. Regelman, *Oxidative response of human neutrophils, monocytes, and alveolar macrophages induced by unopsonized surface-adherent Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 1987. **55**(10): p. 2398-403.
125. Teixeira, M.M., et al., *Production of singlet oxygen by eosinophils activated in vitro by C5a and leukotriene B4*. *FEBS Lett*, 1999. **453**(3): p. 265-8.
126. Haddad, J.J., *Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors*. *Cell Signal*, 2002. **14**(11): p. 879-97.
127. Halliwell, B. and C.E. Cross, *Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress*. *Environ Health Perspect*, 1994. **102 Suppl 10**: p. 5-12.
128. Mueller, S., et al., *Sensitive and real-time determination of H₂O₂ release from intact peroxisomes*. *Biochem J*, 2002. **363**(Pt 3): p. 483-91.
129. Valko, M., H. Morris, and M.T. Cronin, *Metals, toxicity and oxidative stress*. *Curr Med Chem*, 2005. **12**(10): p. 1161-208.
130. Sachs, L., *Angewandte Statistik*. Vol. 10. 2002, Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag. 889.
131. Tukey, J.W., *Conclusions vs. decisions*. *Technometrics*, 1960. **2**: p. 423-433.
132. Hino, T., et al., *Hydrogen peroxide enhances shedding of type I soluble tumor necrosis factor receptor from pulmonary epithelial cells*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999. **20**(1): p. 122-8.

133. Clement, M.V., A. Ponton, and S. Pervaiz, *Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion concentration and reduction of intracellular milieu*. FEBS Lett, 1998. **440**(1-2): p. 13-8.
134. Teramoto, S., et al., *Hydrogen peroxide-induced apoptosis and necrosis in human lung fibroblasts: protective roles of glutathione*. Jpn J Pharmacol, 1999. **79**(1): p. 33-40.
135. Bemelmans, M.H., D.J. Gouma, and W.A. Buurman, *LPS-induced sTNF-receptor release in vivo in a murine model. Investigation of the role of tumor necrosis factor, IL-1, leukemia inhibiting factor, and IFN-gamma*. J Immunol, 1993. **151**(10): p. 5554-62.
136. Kim, J., et al., *An oxidative stress mechanism mediates chelerythrine-induced heparin-binding EGF-like growth factor ectodomain shedding*. J Cell Biochem, 2005. **94**(1): p. 39-49.
137. Jaworska, M., et al., *[N-acetylcysteine: a functional oxygen radical scavenger in vitro and ex vivo in monocytes and neutrophilic granulocytes of patients with COPD]*. Pneumologie, 1995. **49**(10): p. 539-45.
138. Gillissen, A., et al., *Nacystelyn, a novel lysine salt of N-acetylcysteine, to augment cellular antioxidant defence in vitro*. Respir Med, 1997. **91**(3): p. 159-68.
139. Repine, J.E., A. Bast, and I. Lankhorst, *Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(2 Pt 1): p. 341-57.
140. Picquart, M., et al., *Spectroscopic study of N-acetylcysteine and N-acetylcystine/hydrogen peroxide complexation*. Chem Phys, 1998. **228**: p. 279-291.
141. Dello Sbarba, P. and E. Rovida, *Transmodulation of cell surface regulatory molecules via ectodomain shedding*. Biol Chem, 2002. **383**(1): p. 69-83.
142. Erpenstein, U., *Biochemische Charakterisierung eines durch Glukokortikoide induzierbaren Oberflächenantigens auf Monocyten/Macrophagen*. 1993.
143. Volk, T., M. Hensel, and W.J. Kox, *Transient Ca²⁺ changes in endothelial cells induced by low doses of reactive oxygen species: role of hydrogen peroxide*. Mol Cell Biochem, 1997. **171**(1-2): p. 11-21.
144. Milla, M.E., et al., *Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)*. J Biol Chem, 1999. **274**(43): p. 30563-70.
145. Springman, E.B., et al., *Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(1): p. 364-8.
146. Hotchkiss, R.S., et al., *Calcium antagonists inhibit oxidative burst and nitrite formation in lipopolysaccharide-stimulated rat peritoneal macrophages*. Shock, 1997. **8**(3): p. 170-8.
147. Cathcart, M.K., *Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(1): p. 23-8.

148. Valdez, L.B. and A. Boveris, *Nitric oxide and superoxide radical production by human mononuclear leukocytes*. *Antioxid Redox Signal*, 2001. **3**(3): p. 505-13.
149. Wheeler, M.D. and R.G. Thurman, *Production of superoxide and TNF-alpha from alveolar macrophages is blunted by glycine*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(5 Pt 1): p. L952-9.
150. Amour, A., et al., *TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3*. *FEBS Lett*, 1998. **435**(1): p. 39-44.
151. Nath, D., et al., *Shedding of c-Met is regulated by crosstalk between a G-protein coupled receptor and the EGF receptor and is mediated by a TIMP-3 sensitive metalloproteinase*. *J Cell Sci*, 2001. **114**(Pt 6): p. 1213-20.
152. Fitzgerald, M.L., et al., *Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase*. *J Cell Biol*, 2000. **148**(4): p. 811-24.
153. Borland, G., G. Murphy, and A. Ager, *Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits shedding of L-selectin from leukocytes*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(5): p. 2810-5.
154. Parkin, E.T., et al., *Structure-activity relationship of hydroxamate-based inhibitors on the secretases that cleave the amyloid precursor protein, angiotensin converting enzyme, CD23, and pro-tumor necrosis factor-alpha*. *Biochemistry*, 2002. **41**(15): p. 4972-81.
155. Rodeberg, D.A., et al., *Nitric oxide: an overview*. *Am J Surg*, 1995. **170**(3): p. 292-303.
156. Wink, D.A. and J.B. Mitchell, *Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide*. *Free Radic Biol Med*, 1998. **25**(4-5): p. 434-56.
157. Martinez-Ruiz, A. and S. Lamas, *S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction*. *Cardiovasc Res*, 2004. **62**(1): p. 43-52.
158. Yamamoto, T. and R.J. Bing, *Nitric oxide donors*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 2000. **225**(3): p. 200-6.
159. Wei, T., et al., *Nitric oxide induces oxidative stress and apoptosis in neuronal cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1498**(1): p. 72-9.
160. Bolanos, J.P., et al., *Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases*. *J Neurochem*, 1997. **68**(6): p. 2227-40.
161. Bredt, D.S. and S.H. Snyder, *Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(2): p. 682-5.
162. Mayer, B. and B. Hemmens, *Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells*. *Trends Biochem Sci*, 1997. **22**(12): p. 477-81.
163. Bundy, R.E., et al., *A redox-based mechanism for nitric oxide-induced inhibition of DNA synthesis in human vascular smooth muscle cells*. *Br J Pharmacol*, 2000. **129**(7): p. 1513-21.
164. Trachtman, H., et al., *Nitric oxide stimulates the activity of a 72-kDa neutral matrix metalloproteinase in cultured rat mesangial cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **218**(3): p. 704-8.

165. Okamoto, T., et al., *Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxytrite: a novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide*. Arch Biochem Biophys, 1997. **342**(2): p. 261-74.
166. Murrell, G.A., D. Jang, and R.J. Williams, *Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **206**(1): p. 15-21.
167. Hirai, Y., et al., *Effects of nitric oxide on matrix metalloproteinase-2 production by rheumatoid synovial cells*. Life Sci, 2001. **68**(8): p. 913-20.
168. Pratico, D., *Lipid peroxidation in mouse models of atherosclerosis*. Trends Cardiovasc Med, 2001. **11**(3-4): p. 112-6.
169. Pratico, D., et al., *F2-isoprostanes as indices of lipid peroxidation in inflammatory diseases*. Chem Phys Lipids, 2004. **128**(1-2): p. 165-71.
170. Janssen, L.J., *Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. **280**(6): p. L1067-82.
171. Morrow, J.D., et al., *Free radical-induced generation of isoprostanes in vivo. Evidence for the formation of D-ring and E-ring isoprostanes*. J Biol Chem, 1994. **269**(6): p. 4317-26.
172. Morrow, J.D., et al., *A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(23): p. 9383-7.
173. Morrow, J.D. and L.J. Roberts, *The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation*. Prog Lipid Res, 1997. **36**(1): p. 1-21.
174. Liu, T.Z., A. Stern, and J.D. Morrow, *The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. An overview*. J Biomed Sci, 1998. **5**(6): p. 415-20.
175. Taber, D.F., J.D. Morrow, and L.J. Roberts, 2nd, *A nomenclature system for the isoprostanes*. Prostaglandins, 1997. **53**(2): p. 63-7.
176. Takahashi, K., et al., *Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, in the rat. Evidence for interaction with thromboxane A2 receptors*. J Clin Invest, 1992. **90**(1): p. 136-41.
177. Kang, K.H., et al., *Airway and vascular effects of 8-epi-prostaglandin F2 alpha in isolated perfused rat lung*. J Appl Physiol, 1993. **74**(1): p. 460-5.
178. Pratico, D., et al., *Local amplification of platelet function by 8-Epi prostaglandin F2alpha is not mediated by thromboxane receptor isoforms*. J Biol Chem, 1996. **271**(25): p. 14916-24.
179. Wang, Z., et al., *Immunological characterization of urinary 8-epi-prostaglandin F2 alpha excretion in man*. J Pharmacol Exp Ther, 1995. **275**(1): p. 94-100.
180. Wood, L.G., et al., *Lipid peroxidation as determined by plasma isoprostanes is related to disease severity in mild asthma*. Lipids, 2000. **35**(9): p. 967-74.
181. Minuz, P., et al., *The F2-isoprostane 8-epiprostaglandin F2alpha increases platelet adhesion and reduces the antiadhesive and antiaggregatory effects of NO*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(8): p. 1248-56.

182. Tossios, P., et al., *N-acetylcysteine prevents reactive oxygen species-mediated myocardial stress in patients undergoing cardiac surgery: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003. **126**(5): p. 1513-20.
183. Wentzel, P. and U.J. Eriksson, *8-Iso-PGF(2alpha) administration generates dysmorphogenesis and increased lipid peroxidation in rat embryos in vitro*. Teratology, 2002. **66**(4): p. 164-8.
184. Hou, X., et al., *Augmented vasoconstriction and thromboxane formation by 15-F(2t)-isoprostane (8-iso-prostaglandin F(2alpha)) in immature pig periventricular brain microvessels*. Stroke, 2000. **31**(2): p. 516-24; discussion 525.
185. Scholz, H., et al., *8-isoprostane increases scavenger receptor A and matrix metalloproteinase activity in THP-1 macrophages, resulting in long-lived foam cells*. Eur J Clin Invest, 2004. **34**(7): p. 451-8.
186. Wenzel, I., J. Roth, and C. Sorg, *Identification of a novel surface molecule, RM3/1, that contributes to the adhesion of glucocorticoid-induced human monocytes to endothelial cells*. Eur J Immunol, 1996. **26**(11): p. 2758-63.
187. Ruegger, A., et al., *[Cyclosporin A, a Peptide Metabolite from Trichoderma polysporum (Link ex Pers.) Rifai, with a remarkable immunosuppressive activity]*. Helv Chim Acta, 1976. **59**(4): p. 1075-92.
188. Rezzani, R., *Cyclosporine A and adverse effects on organs: histochemical studies*. Prog Histochem Cytochem, 2004. **39**(2): p. 85-128.
189. Taylor, A.L., C.J. Watson, and J.A. Bradley, *Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy*. Crit Rev Oncol Hematol, 2005.
190. Schreiber, S.L. and G.R. Crabtree, *The mechanism of action of cyclosporin A and FK506*. Immunol Today, 1992. **13**(4): p. 136-42.
191. Jirapongsananuruk, O. and D.Y. Leung, *The modulation of B7.2 and B7.1 on B cells by immunosuppressive agents*. Clin Exp Immunol, 1999. **118**(1): p. 1-8.
192. Wasowska, B.A., et al., *Adjunctive rapamycin and CsA treatment inhibits monocyte/macrophage associated cytokines/chemokines in sensitized cardiac graft recipients*. Transplantation, 2001. **71**(8): p. 1179-83.
193. Lee, J.I., et al., *Cyclosporine A inhibits the expression of costimulatory molecules on in vitro-generated dendritic cells: association with reduced nuclear translocation of nuclear factor kappa B*. Transplantation, 1999. **68**(9): p. 1255-63.
194. Salgado, C.G., et al., *Differential effects of cytokines and immunosuppressive drugs on CD40, B7-1, and B7-2 expression on purified epidermal Langerhans cells I*. J Invest Dermatol, 1999. **113**(6): p. 1021-7.
195. Wolf, A., et al., *Cyclosporin A-induced oxidative stress in rat hepatocytes*. JPET, 1997. **280**(3): p. 1328-1334.
196. Chen, H.W., et al., *Cyclosporine A regulate oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes: mechanisms via ROS generation, iNOS and Hsp70*. Br J Pharmacol, 2002. **137**(6): p. 771-81.

197. Calo, L.A., et al., *Oxidative stress in kidney transplant patients with calcineurin inhibitor-induced hypertension: effect of ramipril*. J Cardiovasc Pharmacol, 2002. **40**(4): p. 625-31.
198. Lo Russo, A., A.C. Passaquin, and U.T. Ruegg, *Mechanism of enhanced vasoconstrictor hormone action in vascular smooth muscle cells by cyclosporin A*. Br J Pharmacol, 1997. **121**(2): p. 248-52.
199. Rodicio, J.L., *Calcium antagonists and renal protection from cyclosporine nephrotoxicity: long-term trial in renal transplantation patients*. J Cardiovasc Pharmacol, 2000. **35**(3 Suppl 1): p. S7-11.
200. Lo Russo, A., et al., *Cyclosporin A potentiates receptor-activated [Ca²⁺]_i increase*. J Recept Signal Transduct Res, 1997. **17**(1-3): p. 149-61.
201. Frapier, J.M., et al., *Cyclosporin A increases basal intracellular calcium and calcium responses to endothelin and vasopressin in human coronary myocytes*. FEBS Lett, 2001. **493**(1): p. 57-62.
202. Andres, D., et al., *Changes in antioxidant defence systems induced by cyclosporine A in cultures of hepatocytes from 2- and 12-month-old rats*. Biochem Pharmacol, 2000. **59**(9): p. 1091-100.
203. Lopez-Ongil, S., et al., *Role of reactive oxygen species in the signalling cascade of cyclosporine A-mediated up-regulation of eNOS in vascular endothelial cells*. Br J Pharmacol, 1998. **124**(3): p. 447-54.
204. Bolzani, G., et al., *Cyclosporin A inhibits production and activity of matrix metalloproteinases by gingival fibroblasts*. J Periodontal Res, 2000. **35**(1): p. 51-8.
205. Crompton, M., H. Ellinger, and A. Costi, *Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress*. Biochem J, 1988. **255**(1): p. 357-60.
206. Montero, M., et al., *Calcineurin-independent inhibition of mitochondrial Ca²⁺ uptake by cyclosporin A*. Br J Pharmacol, 2004. **141**(2): p. 263-8.
207. Babior, B.M., *NADPH oxidase: an update*. Blood, 1999. **93**(5): p. 1464-76.
208. Karlsson, A. and C. Dahlgren, *Assembly and activation of the neutrophil NADPH oxidase in granule membranes*. Antioxid Redox Signal, 2002. **4**(1): p. 49-60.
209. El-Benna, J., et al., *Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2005. **53**(3): p. 199-206.
210. Albrecht, H.O., *Über die Chemilumineszenz des Aminophthalsäurehydrazids*. Z Phys Chem, 1928. **136**: p. 321-330.
211. Albrecht, S., H. Brandl, and W. Adam, *Chemilumineszenz-Reaktionen*. CHIUZ, 1990. **5**: p. 227-238.
212. Brolin, S. and G. Wettermark, *Bioluminescence Analysis*. 1992: VCH Weinheim.
213. Lundqvist, H. and C. Dahlgren, *Isoluminol-enhanced chemiluminescence: a sensitive method to study the release of superoxide anion from human neutrophils*. Free Radic Biol Med, 1996. **20**(6): p. 785-92.
214. Williams, A.J. and P.J. Cole, *Investigation of alveolar macrophage function using lucigenin-dependent chemiluminescence*. Thorax, 1981. **36**(11): p. 866-9.

215. Muller, T., E.V. Davies, and A.K. Campbell, *Pholasin chemiluminescence detects mostly superoxide anion released from activated human neutrophils*. J Biolumin Chemilumin, 1989. **3**(3): p. 105-13.
216. Imada, I., et al., *Analysis of reactive oxygen species generated by neutrophils using a chemiluminescence probe L-012*. Anal Biochem, 1999. **271**(1): p. 53-8.
217. Brown, G.C. and V. Borutaite, *Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(11): p. 1440-50.
218. Forfia, P.R., et al., *Role of nitric oxide in the control of mitochondrial function*. Adv Exp Med Biol, 1999. **471**: p. 381-8.
219. Brown, G.C., *Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1504**(1): p. 46-57.
220. Poderoso, J.J., et al., *Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles*. Arch Biochem Biophys, 1996. **328**(1): p. 85-92.
221. Poderoso, J.J., et al., *Nitric oxide regulates oxygen uptake and hydrogen peroxide release by the isolated beating rat heart*. Am J Physiol, 1998. **274**(1 Pt 1): p. C112-9.
222. Morrow, J.D., T.A. Minton, and L.J. Roberts, 2nd, *The F2-isoprostane, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, a potent agonist of the vascular thromboxane/endoperoxide receptor, is a platelet thromboxane/endoperoxide receptor antagonist*. Prostaglandins, 1992. **44**(2): p. 155-63.
223. Longmire, A.W., L.J. Roberts, and J.D. Morrow, *Actions of the E2-isoprostane, 8-ISO-PGE2, on the platelet thromboxane/endoperoxide receptor in humans and rats: additional evidence for the existence of a unique isoprostane receptor*. Prostaglandins, 1994. **48**(4): p. 247-56.
224. Yin, K., et al., *Antiaggregatory activity of 8-epi-prostaglandin F2 alpha and other F-series prostanoids and their binding to thromboxane A2/prostaglandin H2 receptors in human platelets*. J Pharmacol Exp Ther, 1994. **270**(3): p. 1192-6.
225. Pavelkova, M. and L. Kubala, *Luminol-, isoluminol- and lucigenin-enhanced chemiluminescence of rat blood phagocytes stimulated with different activators*. Luminescence, 2004. **19**(1): p. 37-42.
226. Pillemer, L., et al., *The properdin system and immunity. III. The zymosan assay of properdin*. J Exp Med, 1956. **103**(1): p. 1-13.
227. Thelen, M., B. Dewald, and M. Baggiolini, *Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst*. Physiol Rev, 1993. **73**(4): p. 797-821.
228. Hu, T.H., et al., *Intracellular free calcium regulates the onset of the respiratory burst of human neutrophils activated by phorbol myristate acetate*. Cell Signal, 1999. **11**(5): p. 355-60.
229. Rost, M., E. Karge, and W. Klinger, *What do we measure with luminol-, lucigenin- and penicillin-amplified chemiluminescence? I. Investigations with hydrogen peroxide and sodium hypochlorite*. J Biolumin Chemilumin, 1998. **13**(6): p. 355-63.
230. Kessels, G.C., D. Roos, and A.J. Verhoeven, *fMet-Leu-Phe-induced activation of phospholipase D in human neutrophils. Dependence on changes in cytosolic free*

- Ca²⁺ concentration and relation with respiratory burst activation.* J Biol Chem, 1991. **266**(34): p. 23152-6.
231. Pozzan, T., et al., *Is cytosolic ionized calcium regulating neutrophil activation?* Science, 1983. **221**(4618): p. 1413-5.
232. Lew, P.D., et al., *Modulation of cytosolic-free calcium transients by changes in intracellular calcium-buffering capacity: correlation with exocytosis and O₂-production in human neutrophils.* J Cell Biol, 1984. **99**(4 Pt 1): p. 1212-20.
233. Zhu, L., V. Castranova, and P. He, *fMLP-stimulated neutrophils increase endothelial [Ca²⁺]_i and microvessel permeability in the absence of adhesion: role of reactive oxygen species.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(3): p. H1331-8.
234. Nelson, K.K. and J.A. Melendez, *Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases.* Free Radic Biol Med, 2004. **37**(6): p. 768-84.
235. Bemelmans, M.H., L.J. van Tits, and W.A. Buurman, *Tumor necrosis factor: function, release and clearance.* Crit Rev Immunol, 1996. **16**(1): p. 1-11.
236. Haddad, J.J., *Redox regulation of pro-inflammatory cytokines and IkappaB-alpha/NF-kappaB nuclear translocation and activation.* Biochem Biophys Res Commun, 2002. **296**(4): p. 847-56.
237. Robertshaw, H.J. and F.M. Brennan, *Release of tumour necrosis factor alpha (TNFalpha) by TNFalpha cleaving enzyme (TACE) in response to septic stimuli in vitro.* Br J Anaesth, 2005. **94**(2): p. 222-8.
238. Avice, M.N., et al., *Lymphocyte activation gene-3, a MHC class II ligand expressed on activated T cells, stimulates TNF-alpha and IL-12 production by monocytes and dendritic cells.* J Immunol, 1999. **162**(5): p. 2748-53.
239. Jovanovic, D.V., et al., *IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages.* J Immunol, 1998. **160**(7): p. 3513-21.
240. Bliss, S.K., et al., *Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF-alpha, and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1 alpha and -1 beta in response to Toxoplasma gondii antigens.* J Immunol, 1999. **162**(12): p. 7369-75.
241. Corcione, A., et al., *Recombinant tumor necrosis factor enhances the locomotion of memory and naive B lymphocytes from human tonsils through the selective engagement of the type II receptor.* Blood, 1997. **90**(11): p. 4493-501.
242. Goldring, M.B., *The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models.* Connect Tissue Res, 1999. **40**(1): p. 1-11.
243. Polunovsky, V.A., et al., *Induction of endothelial cell apoptosis by TNF alpha: modulation by inhibitors of protein synthesis.* Exp Cell Res, 1994. **214**(2): p. 584-94.
244. Loetscher, H., et al., *Purification and partial amino acid sequence analysis of two distinct tumor necrosis factor receptors from HL60 cells.* J Biol Chem, 1990. **265**(33): p. 20131-8.
245. Lewis, M., et al., *Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(7): p. 2830-4.

246. Liu, Z.G. and J. Han, *Cellular responses to tumor necrosis factor*. Curr Issues Mol Biol, 2001. **3**(4): p. 79-90.
247. Engelmann, H., et al., *Antibodies to a soluble form of a tumor necrosis factor (TNF) receptor have TNF-like activity*. J Biol Chem, 1990. **265**(24): p. 14497-504.
248. Tartaglia, L.A., et al., *Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor*. J Immunol, 1993. **151**(9): p. 4637-41.
249. Wingfield, P., R.H. Pain, and S. Craig, *Tumour necrosis factor is a compact trimer*. FEBS Lett, 1987. **211**(2): p. 179-84.
250. Kriegler, M., et al., *A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF*. Cell, 1988. **53**(1): p. 45-53.
251. Decoster, E., et al., *Generation and biological characterization of membrane-bound, uncleavable murine tumor necrosis factor*. J Biol Chem, 1995. **270**(31): p. 18473-8.
252. Solomon, K.A., et al., *The fate of pro-TNF-alpha following inhibition of metalloprotease-dependent processing to soluble TNF-alpha in human monocytes*. J Immunol, 1997. **159**(9): p. 4524-31.
253. Black, R.A., et al., *A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells*. Nature, 1997. **385**(6618): p. 729-33.
254. Moss, M.L., et al., *Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha*. Nature, 1997. **385**(6618): p. 733-6.
255. Primakoff, P. and D.G. Myles, *The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity*. Trends Genet, 2000. **16**(2): p. 83-7.
256. Maskos, K., et al., *Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(7): p. 3408-12.
257. Mullberg, J., et al., *A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the IL-6 receptor and the p60 TNF receptor*. J Immunol, 1995. **155**(11): p. 5198-205.
258. Watanabe, N., K. Nakada, and Y. Kobayashi, *Processing and release of tumor necrosis factor alpha*. Eur J Biochem, 1998. **253**(3): p. 576-82.
259. Doedens, J.R. and R.A. Black, *Stimulation-induced down-regulation of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14598-607.
260. Losa Garcia, J.E., et al., *Effect of cyclosporin A on inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages*. Respir Med, 1998. **92**(5): p. 722-8.
261. Garcia, J.E., et al., *Effect of cyclosporin A on inflammatory cytokine production by U937 monocyte-like cells*. Mediators Inflamm, 2000. **9**(3-4): p. 169-74.
262. Sakuma, S., et al., *FK506 potently inhibits T cell activation induced TNF-alpha and IL-1beta production in vitro by human peripheral blood mononuclear cells*. Br J Pharmacol, 2000. **130**(7): p. 1655-63.
263. Eigler, A., J. Moeller, and S. Endres, *Exogenous and endogenous nitric oxide attenuates tumor necrosis factor synthesis in the murine macrophage cell line RAW 264.7*. J Immunol, 1995. **154**(8): p. 4048-54.

-
264. Furuke, K., et al., *Human NK cells express endothelial nitric oxide synthase, and nitric oxide protects them from activation-induced cell death by regulating expression of TNF-alpha*. J Immunol, 1999. **163**(3): p. 1473-80.
265. Lander, H.M., et al., *Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide-generating compounds*. J Immunol, 1993. **150**(4): p. 1509-16.
266. Volk, T., et al., *Monocyte stimulation by reactive oxygen species: role of superoxide and intracellular Ca²⁺*. Inflamm Res, 1999. **48**(10): p. 544-9.
267. Goossens, V., et al., *Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(18): p. 8115-9.
268. Suematsu, N., et al., *Oxidative stress mediates tumor necrosis factor-alpha-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes*. Circulation, 2003. **107**(10): p. 1418-23.
269. Renz, H., et al., *Release of tumor necrosis factor-alpha from macrophages. Enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E2 and cyclic nucleotides*. J Immunol, 1988. **141**(7): p. 2388-93.
270. Kunkel, S.L., et al., *Prostaglandin E2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression*. J Biol Chem, 1988. **263**(11): p. 5380-4.
271. Fujino, H. and J.W. Regan, *Prostaglandin F2alpha amplifies tumor necrosis factor-alpha promoter activity by the FPB prostanoid receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **317**(4): p. 1114-20.
272. Moller, H.J., et al., *Plasma level of the macrophage-derived soluble CD163 is increased and positively correlates with severity in Gaucher's disease*. Eur J Haematol, 2004. **72**(2): p. 135-9.
273. Schaer, D.J., et al., *Soluble hemoglobin-haptoglobin scavenger receptor CD163 as a lineage-specific marker in the reactive hemophagocytic syndrome*. Eur J Haematol, 2005. **74**(1): p. 6-10.
274. Aristoteli, L.P., et al., *The monocytic lineage specific soluble CD163 is a plasma marker of coronary atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2005.
275. Moller, H.J., et al., *Soluble CD163: a marker molecule for monocyte/macrophage activity in disease*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 2002. **237**: p. 29-33.
276. Ordonez, C.L., A.I. Kartashov, and M.E. Wohl, *Variability of markers of inflammation and infection in induced sputum in children with cystic fibrosis*. J Pediatr, 2004. **145**(5): p. 689-92.
277. Davis, P.B., M. Drumm, and M.W. Konstan, *Cystic fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **154**(5): p. 1229-56.
278. Sheppard, D.N. and M.J. Welsh, *Structure and function of the CFTR chloride channel*. Physiol Rev, 1999. **79**(1 Suppl): p. S23-45.
279. Ziegler, M.M., *Meconium ileus*. Curr Probl Surg, 1994. **31**(9): p. 731-77.
280. Lyczak, J.B., C.L. Cannon, and G.B. Pier, *Lung infections associated with cystic fibrosis*. Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(2): p. 194-222.

281. Greally, P., et al., *Sputum tumour necrosis factor-alpha and leukotriene concentrations in cystic fibrosis*. Arch Dis Child, 1993. **68**(3): p. 389-92.
282. Bonfield, T.L., et al., *Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs*. Am J Respir Crit Care Med, 1995. **152**(6 Pt 1): p. 2111-8.
283. Schuster, A., et al., *Cystic fibrosis sputum induces a secretory response from airway gland serous cells that can be prevented by neutrophil protease inhibitors*. Eur Respir J, 1995. **8**(1): p. 10-4.
284. Kirchner, K.K., et al., *Increased DNA levels in bronchoalveolar lavage fluid obtained from infants with cystic fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **154**(5): p. 1426-9.
285. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft (AWMF). *Mukoviszidose, Cystische Fibrose (CF)*. 1998 1998 [cited].
286. Shak, S., et al., *Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(23): p. 9188-92.
287. Fuchs, H.J., et al., *Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group*. N Engl J Med, 1994. **331**(10): p. 637-42.
288. Quan, J.M., et al., *A two-year randomized, placebo-controlled trial of dornase alfa in young patients with cystic fibrosis with mild lung function abnormalities*. J Pediatr, 2001. **139**(6): p. 813-20.
289. Ratjen, F., et al., *Matrix metalloproteases in BAL fluid of patients with cystic fibrosis and their modulation by treatment with dornase alpha*. Thorax, 2002. **57**(11): p. 930-4.
290. Ratjen, F., et al., *DNA concentrations in BAL fluid of cystic fibrosis patients with early lung disease: influence of treatment with dornase alpha*. Pediatr Pulmonol, 2005. **39**(1): p. 1-4.
291. Roche Pharma (Schweiz) AG. *Pulmozyme - Patienteninformation*. 2003 [cited].
292. Paul, K., et al., *Effect of treatment with dornase alpha on airway inflammation in patients with cystic fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2004. **169**(6): p. 719-25.
293. Ratjen, F., et al., *Fractional analysis of bronchoalveolar lavage fluid cytology in cystic fibrosis patients with normal lung function. Bronchoalveolar lavage for the evaluation of anti-inflammatory treatment (BEAT) study group*. Eur Respir J, 2000. **15**(1): p. 141-5.
294. Brown, R.K., et al., *Pulmonary dysfunction in cystic fibrosis is associated with oxidative stress*. Eur Respir J, 1996. **9**(2): p. 334-9.
295. McGrath, L.T., et al., *Oxidative stress during acute respiratory exacerbations in cystic fibrosis*. Thorax, 1999. **54**(6): p. 518-23.
296. Collins, C.E., et al., *Elevated plasma levels of F2 alpha isoprostane in cystic fibrosis*. Lipids, 1999. **34**(6): p. 551-6.
297. Wood, L.G., et al., *Oxidative stress in cystic fibrosis: dietary and metabolic factors*. J Am Coll Nutr, 2001. **20**(2 Suppl): p. 157-65.
298. Ciabattoni, G., et al., *In vivo lipid peroxidation and platelet activation in cystic fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **162**(4 Pt 1): p. 1195-201.

299. Montuschi, P., et al., *Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of oxidative stress in cystic fibrosis*. Thorax, 2000. **55**(3): p. 205-9.
300. Antczak, A., et al., *Increased exhaled cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostane in aspirin-induced asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **166**(3): p. 301-6.
301. Sorg, C., *Macrophages in acute and chronic inflammation*. Chest, 1991. **100**(3 Suppl): p. 173S-175S.
302. Hartl, D., et al., *Inhaled glutathione decreases PGE(2) and increases lymphocytes in cystic fibrosis lungs*. Free Radic Biol Med, 2005. **39**(4): p. 463-72.
303. Schebesch, C., et al., *Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4+ T cells in vitro*. Immunology, 1997. **92**(4): p. 478-86.
304. Lacraz, S., et al., *Direct contact between T lymphocytes and monocytes is a major pathway for induction of metalloproteinase expression*. J Biol Chem, 1994. **269**(35): p. 22027-33.
305. Hamann, W., et al., *Characterization of a novel anti-inflammatory factor produced by RM3/1 macrophages derived from glucocorticoid treated human monocytes*. Inflamm Res, 1995. **44**(12): p. 535-40.
306. Zwadlo-Klarwasser, G., et al., *New anti-inflammatory proteins secreted by human glucocorticoid-treated macrophages*. Int Arch Allergy Immunol, 1995. **107**(1-3): p. 430-1.
307. Högger, P., *Molekulare und klinische Aspekte der Glucocorticoidwirkung*, in *Habilitationsschrift*. 2000: Münster. p. 18-24.
308. Lehmann, L.E., et al., *Intracellular detection of macrophage migration inhibitory factor in peripheral blood leukocytes*. Free Radic Biol Med, 2005. **38**(9): p. 1170-9.
309. David, J.R., *Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1966. **56**(1): p. 72-7.
310. Leng, L., et al., *MIF signal transduction initiated by binding to CD74*. J Exp Med, 2003. **197**(11): p. 1467-76.
311. Davis, B.H. and P.V. Zarev, *Human monocyte CD163 expression inversely correlates with soluble CD163 plasma levels*. Cytometry B Clin Cytom, 2005. **63**(1): p. 16-22.
312. Rozsnyay, Z., et al., *Membrane-bound ezrin is involved in B-cell receptor-mediated signaling: potential role of an ITAM-like ezrin motif*. Immunol Lett, 1996. **54**(2-3): p. 163-9.
313. Song, J.C., et al., *PKC-epsilon regulates basolateral endocytosis in human T84 intestinal epithelia: role of F-actin and MARCKS*. Am J Physiol, 1999. **277**(6 Pt 1): p. C1239-49.
314. Gonzalez, M.I., P.G. Bannerman, and M.B. Robinson, *Phorbol myristate acetate-dependent interaction of protein kinase Calpha and the neuronal glutamate transporter EAAC1*. J Neurosci, 2003. **23**(13): p. 5589-93.
315. Thompson, R.F. and G.M. Langford, *Myosin superfamily evolutionary history*. Anat Rec, 2002. **268**(3): p. 276-89.

316. Sellers, J.R., *Myosins: a diverse superfamily*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1496**(1): p. 3-22.
317. Hodge, T.P., R. Cross, and J. Kendrick-Jones, *Role of the COOH-terminal nonhelical tailpiece in the assembly of a vertebrate nonmuscle myosin rod*. J Cell Biol, 1992. **118**(5): p. 1085-95.
318. Cope, M.J., et al., *Conservation within the myosin motor domain: implications for structure and function*. Structure, 1996. **4**(8): p. 969-87.
319. Mermall, V., P.L. Post, and M.S. Mooseker, *Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction*. Science, 1998. **279**(5350): p. 527-33.
320. von Kobbe, C., et al., *Colocalization, physical, and functional interaction between Werner and Bloom syndrome proteins*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 22035-44.
321. Bizario, J.C., et al., *Myosin-V colocalizes with MHC class II in blood mononuclear cells and is up-regulated by T-lymphocyte activation*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(2): p. 195-204.
322. Nebl, T., et al., *Proteomic analysis of a detergent-resistant membrane skeleton from neutrophil plasma membranes*. J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 43399-409.
323. Neco, P., et al., *The role of myosin in vesicle transport during bovine chromaffin cell secretion*. Biochem J, 2002. **368**(Pt 2): p. 405-13.
324. Rose, S.D., et al., *Myosins II and V in chromaffin cells: myosin V is a chromaffin vesicle molecular motor involved in secretion*. J Neurochem, 2003. **85**(2): p. 287-98.
325. von Haller, P.D., et al., *Mass spectrometric characterization of proteins extracted from Jurkat T cell detergent-resistant membrane domains*. Proteomics, 2001. **1**(8): p. 1010-21.
326. Rey, M., et al., *Cutting edge: association of the motor protein nonmuscle myosin heavy chain-IIA with the C terminus of the chemokine receptor CXCR4 in T lymphocytes*. J Immunol, 2002. **169**(10): p. 5410-4.
327. Ecay, T.W., T.D. Conner, and E.R. Decker, *Nonmuscle myosin IIA copurifies with chloride channel-enriched membranes from epithelia*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **231**(2): p. 369-72.
328. Dubinsky, W.P., et al., *Immunolocalization of chloride-transporting membrane vesicles in tracheal epithelial cells*. Am J Physiol, 1992. **263**(4 Pt 1): p. C888-95.
329. Bresnick, A.R., *Molecular mechanisms of nonmuscle myosin-II regulation*. Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(1): p. 26-33.
330. Kim, E.J. and D.M. Helfman, *Characterization of the metastasis-associated protein, S100A4. Roles of calcium binding and dimerization in cellular localization and interaction with myosin*. J Biol Chem, 2003. **278**(32): p. 30063-73.
331. Li, Z.H., et al., *Mts1 regulates the assembly of nonmuscle myosin-IIA*. Biochemistry, 2003. **42**(48): p. 14258-66.
332. Kalmes, A., et al., *A serine-kinase associated with the p127-l(2)gl tumour suppressor of Drosophila may regulate the binding of p127 to nonmuscle myosin II heavy chain and the attachment of p127 to the plasma membrane*. J Cell Sci, 1996. **109** (Pt 6): p. 1359-68.

333. Ding, L., et al., *IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression*. J Immunol, 1993. **151**(3): p. 1224-34.
334. Joyce, D.A., et al., *Two inhibitors of pro-inflammatory cytokine release, interleukin-10 and interleukin-4, have contrasting effects on release of soluble p75 tumor necrosis factor receptor by cultured monocytes*. Eur J Immunol, 1994. **24**(11): p. 2699-705.
335. Chang, C.H., M. Furue, and K. Tamaki, *B7-1 expression of Langerhans cells is up-regulated by proinflammatory cytokines, and is down-regulated by interferon-gamma or by interleukin-10*. Eur J Immunol, 1995. **25**(2): p. 394-8.
336. Loria, R.M., *Antiglucocorticoid function of androstenediol*. Psychoneuroendocrinology, 1997. **22 Suppl 1**: p. S103-8.
337. Baulieu, E.E., P. Robel, and M. Schumacher, *Neurosteroids: beginning of the story*. Int Rev Neurobiol, 2001. **46**: p. 1-32.
338. Allolio, B. and W. Arlt, *DHEA treatment: myth or reality?* Trends Endocrinol Metab, 2002. **13**(7): p. 288-94.
339. Padgett, D.A. and R.M. Loria, *Endocrine regulation of murine macrophage function: effects of dehydroepiandrosterone, androstenediol, and androstenediol*. J Neuroimmunol, 1998. **84**(1): p. 61-8.
340. Baulieu, E.E., et al., *Studies of the secretion and the metabolism of steroid conjugates: synthesis, analysis, and use of doubly labeled compounds*. Adv Tracer Methodol, 1966. **3**: p. 285-99.
341. Orentreich, N., et al., *Long-term longitudinal measurements of plasma dehydroepiandrosterone sulfate in normal men*. J Clin Endocrinol Metab, 1992. **75**(4): p. 1002-4.
342. Herrmann, M., J. Scholmerich, and R.H. Straub, *Influence of cytokines and growth factors on distinct steroidogenic enzymes in vitro: a short tabular data collection*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **966**: p. 166-86.
343. Salek, F.S., K.L. Bigos, and P.D. Kroboth, *The influence of hormones and pharmaceutical agents on DHEA and DHEA-S concentrations: a review of clinical studies*. J Clin Pharmacol, 2002. **42**(3): p. 247-66.
344. Labrie, F., et al., *DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology*. Front Neuroendocrinol, 2001. **22**(3): p. 185-212.
345. Widstrom, R.L. and J.S. Dillon, *Is there a receptor for dehydroepiandrosterone or dehydroepiandrosterone sulfate?* Semin Reprod Med, 2004. **22**(4): p. 289-98.
346. Yamada, J., et al., *Specific binding of dehydroepiandrosterone sulfate to rat liver cytosol: a possible association with peroxisomal enzyme induction*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1224**(1): p. 139-46.
347. Meikle, A.W., et al., *The presence of a dehydroepiandrosterone-specific receptor binding complex in murine T cells*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1992. **42**(3-4): p. 293-304.
348. Okabe, T., et al., *Up-regulation of high-affinity dehydroepiandrosterone binding activity by dehydroepiandrosterone in activated human T lymphocytes*. J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**(10): p. 2993-6.

349. McLachlan, J.A., C.D. Serkin, and O. Bakouche, *Dehydroepiandrosterone modulation of lipopolysaccharide-stimulated monocyte cytotoxicity*. J Immunol, 1996. **156**(1): p. 328-35.
350. Chen, F., et al., *Direct Agonist/Antagonist Functions of Dehydroepiandrosterone (DHEA)*. Endocrinology, 2005.
351. Beck, S.G. and R.J. Handa, *Dehydroepiandrosterone (DHEA): a misunderstood adrenal hormone and spine-tingling neurosteroid?* Endocrinology, 2004. **145**(3): p. 1039-41.
352. Orentreich, N., et al., *Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood*. J Clin Endocrinol Metab, 1984. **59**(3): p. 551-5.
353. Parker, C.R., Jr., et al., *Aging alters zonation in the adrenal cortex of men*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(11): p. 3898-901.
354. Thomas, L., *Labor und Diagnose*. Vol. 5. 1998, Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft.
355. Sambrook, P.N., et al., *Sex hormone status and osteoporosis in postmenopausal women with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1988. **31**(8): p. 973-8.
356. Deighton, C.M., M.J. Watson, and D.J. Walker, *Sex hormones in postmenopausal HLA-identical rheumatoid arthritis discordant sibling pairs*. J Rheumatol, 1992. **19**(11): p. 1663-7.
357. Lahita, R.G., et al., *Low plasma androgens in women with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1987. **30**(3): p. 241-8.
358. Straub, R.H., et al., *Dehydroepiandrosterone sulfate is positively correlated with soluble interleukin 2 receptor and soluble intercellular adhesion molecule in systemic lupus erythematosus*. J Rheumatol, 1996. **23**(5): p. 856-61.
359. Straub, R.H., et al., *High prolactin and low dehydroepiandrosterone sulphate serum levels in patients with severe systemic sclerosis*. Br J Rheumatol, 1997. **36**(4): p. 426-32.
360. Spencer, N.F., et al., *Constitutive activation of NF-kappa B in an animal model of aging*. Int Immunol, 1997. **9**(10): p. 1581-8.
361. Danenberg, H.D., et al., *Dehydroepiandrosterone protects mice from endotoxin toxicity and reduces tumor necrosis factor production*. Antimicrob Agents Chemother, 1992. **36**(10): p. 2275-9.
362. Daynes, R.A., et al., *Altered regulation of IL-6 production with normal aging. Possible linkage to the age-associated decline in dehydroepiandrosterone and its sulfated derivative*. J Immunol, 1993. **150**(12): p. 5219-30.
363. Di Santo, E., et al., *DHEAS inhibits TNF production in monocytes, astrocytes and microglial cells*. Neuroimmunomodulation, 1996. **3**(5): p. 285-8.
364. Straub, R.H., et al., *Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate are negatively correlated with serum interleukin-6 (IL-6), and DHEA inhibits IL-6 secretion from mononuclear cells in man in vitro: possible link between endocrinosenescence and immunosenescence*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(6): p. 2012-7.

365. Carr, D.J., *Increased levels of IFN-gamma in the trigeminal ganglion correlate with protection against HSV-1-induced encephalitis following subcutaneous administration with androstenediol.* J Neuroimmunol, 1998. **89**(1-2): p. 160-7.
366. Ralston, S.H., R.G. Russell, and M. Gowen, *Estrogen inhibits release of tumor necrosis factor from peripheral blood mononuclear cells in postmenopausal women.* J Bone Miner Res, 1990. **5**(9): p. 983-8.
367. Shanker, G., M. Sorci-Thomas, and M.R. Adams, *Estrogen modulates the expression of tumor necrosis factor alpha mRNA in phorbol ester-stimulated human monocytic THP-1 cells.* Lymphokine Cytokine Res, 1994. **13**(6): p. 377-82.
368. Deshpande, R., et al., *Estradiol down-regulates LPS-induced cytokine production and NFkB activation in murine macrophages.* Am J Reprod Immunol, 1997. **38**(1): p. 46-54.
369. Padgett, D.A., R.M. Loria, and J.F. Sheridan, *Endocrine regulation of the immune response to influenza virus infection with a metabolite of DHEA-androstenediol.* J Neuroimmunol, 1997. **78**(1-2): p. 203-11.
370. Neumeister, B., I. Besenthal, and H. Liebich, *Klinikleitfaden Labordiagnostik.* Vol. 2. 2000, München: Urban und Fischer. 818.
371. Loria, R.M., D.A. Padgett, and P.N. Huynh, *Regulation of the immune response by dehydroepiandrosterone and its metabolites.* J Endocrinol, 1996. **150** Suppl: p. S209-20.
372. Berliner, D.L., J.R. Pasqualini, and A.J. Gallegos, *The formation of water soluble steroids by human skin.* J Invest Dermatol, 1968. **50**(3): p. 220-4.
373. Faredin, I., et al., *Transformation in vitro of [4-14C]-dehydroepiandrosterone into 7-oxygenated derivatives by normal human male and female skin tissue.* J Invest Dermatol, 1969. **52**(4): p. 357-61.
374. Faredin, I. and I. Toth, *The metabolism of [4-14C]5-androstene-3 beta, 17 beta-diol by normal human skin in vitro.* Acta Med Acad Sci Hung, 1975. **32**(2): p. 139-52.
375. May, M., et al., *Protection from glucocorticoid induced thymic involution by dehydroepiandrosterone.* Life Sci, 1990. **46**(22): p. 1627-31.
376. Canning, M.O., et al., *Opposing effects of dehydroepiandrosterone and dexamethasone on the generation of monocyte-derived dendritic cells.* Eur J Endocrinol, 2000. **143**(5): p. 687-95.
377. Ashcroft, G.S., et al., *Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor.* J Clin Invest, 2003. **111**(9): p. 1309-18.
378. Hodgins, J.B. and N. Maeda, *Minireview: estrogen and mouse models of atherosclerosis.* Endocrinology, 2002. **143**(12): p. 4495-501.
379. Miyamoto, N., et al., *Estrogen protects against cellular infiltration by reducing the expressions of E-selectin and IL-6 in endotoxin-induced uveitis.* J Immunol, 1999. **163**(1): p. 374-9.
380. Vegeto, E., et al., *Estrogen blocks inducible nitric oxide synthase accumulation in LPS-activated microglia cells.* Exp Gerontol, 2000. **35**(9-10): p. 1309-16.

381. Salem, M.L., et al., *Beta-estradiol-induced decrease in IL-12 and TNF-alpha expression suppresses macrophage functions in the course of Listeria monocytogenes infection in mice*. Int J Immunopharmacol, 1999. **21**(8): p. 481-97.
382. Danel, L., et al., *Specific estrogen binding sites in human lymphoid cells and thymic cells*. J Steroid Biochem, 1983. **18**(5): p. 559-63.
383. Paidas, M.J., et al., *Soluble monocyte cluster domain 163, a new global marker of anti-inflammatory response, is elevated in the first trimester of pregnancy*. J Thromb Haemost, 2004. **2**(6): p. 1009-10.
384. Tulchinsky, D., et al., *Plasma estrone, estradiol, estriol, progesterone, and 17-hydroxyprogesterone in human pregnancy. I. Normal pregnancy*. Am J Obstet Gynecol, 1972. **112**(8): p. 1095-100.
385. Cranny, A., P. Crowley, and A. Whelan, *Effects of human placental lactogen on the expression of CD163 and CD14 on human monocytes in culture*. Clin Exp Immunol, 2002. **128**(2): p. 275-8.
386. Curtis, B.R., C. Reno, and R.H. Aster, *Neonatal alloimmune neutropenia attributed to maternal immunoglobulin G antibodies against the neutrophil alloantigen HNA-1c (SH): a report of five cases*. Transfusion, 2005. **45**(8): p. 1308-13.
387. Marin, L., et al., *Alloimmune neonatal neutropenia and thrombocytopenia associated with maternal anti HNA-1a, HPA-3b and HLA antibodies*. Pediatr Allergy Immunol, 2005. **16**(3): p. 279-82.
388. Wiener, E., et al., *Anti-HPA-1a-mediated platelet phagocytosis by monocytes in vitro and its inhibition by Fc gamma receptor (FcgammaR) reactive reagents*. Eur J Haematol, 2003. **70**(2): p. 67-74.
389. Matthiesen, L., et al., *Immunology of preeclampsia*. Chem Immunol Allergy, 2005. **89**: p. 49-61.
390. Stefano, G.B., et al., *Estradiol-stimulated nitric oxide release in human granulocytes is dependent on intracellular calcium transients: evidence of a cell surface estrogen receptor*. Blood, 2000. **95**(12): p. 3951-8.
391. Hishikawa, K., et al., *Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells*. FEBS Lett, 1995. **360**(3): p. 291-3.
392. Kanda, N., T. Tsuchida, and K. Tamaki, *Testosterone inhibits immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells*. Clin Exp Immunol, 1996. **106**(2): p. 410-5.
393. Yao, G., et al., *In vivo modulation of the circulating lymphocyte subsets and monocytes by androgen*. Int Immunopharmacol, 2003. **3**(13-14): p. 1853-60.
394. Burger, D. and J.M. Dayer, *Cytokines, acute-phase proteins, and hormones: IL-1 and TNF-alpha production in contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **966**: p. 464-73.
395. Tangirala, R.K., et al., *Regression of atherosclerosis induced by liver-directed gene transfer of apolipoprotein A-I in mice*. Circulation, 1999. **100**(17): p. 1816-22.
396. Paszty, C., et al., *Apolipoprotein AI transgene corrects apolipoprotein E deficiency-induced atherosclerosis in mice*. J Clin Invest, 1994. **94**(2): p. 899-903.

-
397. Hyka, N., et al., *Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes*. *Blood*, 2001. **97**(8): p. 2381-9.
398. Godsland, I.F., et al., *Sex, plasma lipoproteins, and atherosclerosis: prevailing assumptions and outstanding questions*. *Am Heart J*, 1987. **114**(6): p. 1467-503.
399. Sacks, F.M., M. Gerhard, and B.W. Walsh, *Sex hormones, lipoproteins, and vascular reactivity*. *Curr Opin Lipidol*, 1995. **6**(3): p. 161-6.
400. Hargrove, G.M., A. Junco, and N.C. Wong, *Hormonal regulation of apolipoprotein AI*. *J Mol Endocrinol*, 1999. **22**(2): p. 103-11.
401. Högger, P., *[What happens in the body with glucocorticoids? Pharmacokinetics and pharmacodynamics]*. *Pharm Unserer Zeit*, 2003. **32**(4): p. 296-301.
402. Muller, C., et al., *Dehydroepiandrosterone and its 7-hydroxylated metabolites do not interfere with the transactivation and cellular trafficking of the glucocorticoid receptor*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2004. **92**(5): p. 469-76.
403. Paul-Ehrlich-Institut, *Hintergrundinformation zur Leukozytendepletion*. Bundesamt für Sera und Impfstoffe.
404. Boyum, A., *Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction*. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 1968. **97**: p. 7.
405. Feige, U., B. Overwien, and C. Sorg, *Purification of human blood monocytes by hypotonic density gradient centrifugation in Percoll*. *J Immunol Methods*, 1982. **54**(3): p. 309-15.
406. Julius, M.H., E. Simpson, and L.A. Herzenberg, *A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes*. *Eur J Immunol*, 1973. **3**(10): p. 645-9.
407. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. *Anal Biochem*, 1985. **150**(1): p. 76-85.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Meike Timmermann
geb. am 09. August 1975
in Göttingen

Schulausbildung

1982 bis 1986 Grundschule Braunschweig Mascheroder-Holz
1986 bis 1995 Markgrafen-Gymnasium Karlsruhe

Hochschulausbildung

10/1995 Studium der Pharmazie an der
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br.

03/1998 1. Staatsexamen Pharmazie

03/2000 2. Staatsexamen Pharmazie

06/2001 3. Staatsexamen Pharmazie und Approbation als
Apothekerin

Praktika

05/2000 bis 10/2000 1. Halbjahr des Pharmaziepraktikums
Institut für Spitalpharmazie, Kantonsspital Basel, Schweiz

11/2000 bis 04/2001 2. Halbjahr des Pharmaziepraktikums
Epes Apotheke, Hamburg

Berufspraxis

09/1999 bis 11/1999 Wissenschaftliche Hilfskraft an der Universität
Freiburg i. Br. bei Frau Prof. Dr. T. Schirmeister

09/2001 bis 08/2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin
am Pharmazeutischen Institut der Universität Würzburg bei
Frau Prof. Dr. P. Högger

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation

**Zelluläre Regulation und klinische Aspekte
des monocyten-/macrophagenspezifischen
Proteins CD163**

selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den urkundlich vorgelegten und anerkannten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Meike Timmermann