

Lehrstuhl für Zellbiologie der Technischen Universität München  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan

# **PHAGOZYTOSE UND *OXIDATIVE BURST* ALS BIOMARKER FÜR IMMUNTOXIZITÄT**

Der Einfluss von simulierter Schwerelosigkeit  
auf die Makrophagenzelllinie NR8383

Kathrin Huber

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für  
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung  
des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Angelika Schnieke, Ph.D. (Univ. of Edinburgh/UK)

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Bertold Hock, em.  
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. h. c. J. Bauer

Die Dissertation wurde am 24.07.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung  
und Umwelt am 13.09.2007 angenommen.

# Inhalt

<b>Inhalt.....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungen .....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Phagozyten .....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Neutrophile Granulozyten (PMN).....	3
2.1.2 Makrophagen-Monozytensystem.....	4
2.1.3 Mikrogliazellen .....	6
<b>2.2 Phagozytose und oxidative burst .....</b>	<b>7</b>
<b>2.3 Bioassays zum Nachweis von Immuntoxizität.....</b>	<b>13</b>
<b>2.4 Der Einfluss der Schwerkraft auf Zellen: Schwerkraftsensoren.....</b>	<b>16</b>
<b>2.5 Die Auswirkung von Schwerelosigkeit auf das Immunsystem.....</b>	<b>20</b>
<b>2.6 Das TRIPLE-LUX-Projekt zur Beurteilung des Einflusses verschiedener         Beschleunigungen sowie der Weltraumstrahlung auf das Immunsystem .....</b>	<b>21</b>
<b>2.7 Zielsetzung .....</b>	<b>26</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Material.....</b>	<b>27</b>
3.1.1 Chemikalien .....	27
3.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	28
3.1.3 Geräte .....	29
3.1.4 Puffer und Lösungen.....	30
3.1.5 Testsubstanzen .....	33
<b>3.2 Phagozyten .....</b>	<b>34</b>
3.2.1 Gewinnung primärer Phagozyten.....	34
3.2.2 Zellkultur von permanenten Makrophagen und Mikrogliazellen .....	35
<b>3.3 Anpassung der Zellzahl vor dem Test.....</b>	<b>36</b>
<b>3.4 Phagozytose-Assay .....</b>	<b>36</b>
3.4.1 Mikroskopische Auswertung.....	37
3.4.2 Auswertung in Mikrotiterplatten.....	37
3.4.3 Auswertung mittels FACS .....	38

---

<b>3.5</b>	<b>Bioassays zum Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies</b> .....	<b>38</b>
3.5.1	Luminol-Assay .....	39
3.5.2	NBT-Assay .....	40
3.5.3	OxyBurst <sup>®</sup> .....	41
<b>3.6</b>	<b>Simulation von Schwerelosigkeit</b> .....	<b>42</b>
3.6.1	Schnelldrehender 2D-Küvettenklinostat .....	42
3.6.2	Magnetische Levitation .....	44
3.6.3	Parabelflug .....	48
<b>3.7</b>	<b>Statistik und Auswertung</b> .....	<b>51</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>52</b>
<b>4.1</b>	<b>Optimierung des TRIPLE-LUX Weltraumversuchs und Anpassung der Nachweissysteme</b> .....	<b>52</b>
4.1.1	Auswahl der Zellen .....	52
4.1.2	Kryokonservierung der Zellen .....	55
4.1.3	Opsonierung von Zymosan .....	56
4.1.4	Peroxidase .....	57
4.1.5	Temperaturtests .....	59
4.1.6	Verminderung der Sedimentation .....	59
<b>4.2</b>	<b>Immunsuppressive und immunstimulierende Einflüsse auf Phagozyten</b> .....	<b>61</b>
4.2.1	Neutrophile Granulozyten (PMN).....	61
4.2.1.1	Einfluss von Cadmium .....	61
4.2.1.2	Einfluss von Hydrocortison.....	64
4.2.2	Makrophagen.....	67
4.2.2.1	Einfluss von Cadmium .....	68
4.2.2.2	Einfluss von Hydrocortison.....	69
4.2.2.3	Einfluss von 17 $\beta$ -Östradiol.....	71
4.2.2.4	Einfluss von Cyclosporin A .....	73
4.2.2.5	Einfluss von Echinacea purpurea .....	74
4.2.2.6	Einfluss des Pflanzenextrakts QMH 5566 .....	85
4.2.3	Mikrogliazellen .....	87
4.2.3.1	Einfluss von Hydrocortison.....	87
4.2.3.2	Einfluss von 17 $\beta$ -Östradiol.....	88
4.2.3.3	Einfluss des Pflanzenextrakts QMH 5566 .....	89

---

<b>4.3</b>	<b>Der Einfluss von simulierter Schwerelosigkeit auf die Makrophagen-Zelllinie NR8383 .....</b>	<b>90</b>
4.3.1	Klinorotation .....	90
4.3.2	Magnetische Levitation .....	94
4.3.3	Parabelflug .....	95
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>97</b>
<b>5.1</b>	<b>Optimierung des TRIPLE-LUX Weltraumversuchs und Anpassung der Nachweissysteme .....</b>	<b>97</b>
5.1.1	Auswahl der Zellen .....	97
5.1.2	Kryokonservierung der Zellen .....	98
5.1.3	Optimierung der Einzelkomponenten .....	99
5.1.4	Der Einfluss von Temperatur .....	102
5.1.5	Vermeidung von Sedimentation.....	103
<b>5.2</b>	<b>Vergleich der Bioassays zum Nachweis immunmodulatorischer Einflüsse, ein Methoden- und Zelltypvergleich.....</b>	<b>104</b>
5.2.1	Das Schwermetall Cadmium.....	104
5.2.2	Die Steroide Hydrocortison und 17 $\beta$ -Östradiol .....	107
5.2.3	Cyclosporin A .....	112
5.2.4	Die Pflanzenextrakte von <i>Echinacea purpurea</i> und QMH 5566 .....	113
<b>5.3</b>	<b>Der Einfluss von simulierter Schwerelosigkeit auf die Makrophagen-Zelllinie NR8383 .....</b>	<b>117</b>
5.3.1	Einfluss auf die Phagozytose.....	117
5.3.2	Einfluss auf den <i>oxidative burst</i> .....	119
<b>5.4</b>	<b>Bewertung der verschiedenen Assays.....</b>	<b>124</b>
<b>6</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>129</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>145</b>
	<b>Eigene Veröffentlichungen und Posterbeiträge .....</b>	<b>169</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>170</b>
	<b>Curriculum vitae .....</b>	<b>171</b>

## Abkürzungen

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singulett-Sauerstoff
2D	zweidimensional
ADCC	<i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
AICC	<i>Antibody-independent cellular cytotoxicity</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AP I	Transkriptionsfaktor
APC	<i>Antigen presenting cell</i>
AUC	<i>Area under curve</i>
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CB	Cannabinoid Rezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CdCl <sub>2</sub>	Cadmiumchlorid
c-fos	Transkriptionsfaktor
CGD	<i>Chronic granulomatous disease</i>
c-jun	Transkriptionsfaktor
cm	Zentimeter
c-myc	Proto-Oncogen
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CR	<i>Complement receptor</i>
CsA	Cyclosporin A
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DLR	Deutsche Luft- und Raumfahrtagentur
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dsRNA	<i>Double stranded ribonucleic acid</i>
EADS	<i>European Aeronautic Defence and Space Company</i>

---

EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ESA	<i>European Space Agency</i>
EtOH	Ethanol
EVA	<i>Extra-vehicular Activity</i>
FA	Formaldehyd bzw. <i>focal adhesion</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
Fc $\gamma$ -R	Antikörper-Rezeptor
FITC	Fluorescein
F <sub>m</sub>	magnetische Kraft
fMLP	<i>Formyl-methionyl-leucylphenylalanine</i>
g	Erdbeschleunigung (9,80665 m·s <sup>-2</sup> )
GM-CSF	<i>Granulocyte/macrophage colony stimulating factor</i>
gp91	NADPH-Oxidase-Untereinheit
GRE	<i>Glucocorticoid response element</i>
Gy	Gray
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Ham's F12	Zellkulturmedium
HDL	<i>High-density lipoprotein</i>
HOCl	Hypochlorsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IP-3	Inositoltriphosphat
ISS	<i>International Space Station</i>
k	Boltzmann-Konstante
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kalilauge
KRG	Krebs-Ringer-Lösung
lag	“Verzögerung”

---

LD50	Mittlere letale Dosis; tödlich für 50 % der betrachteten Population
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LTS	Lipoteichonsäure
M	molar
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MBP	<i>Mannose binding protein</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony stimulating factor</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minuten
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
Mir	russische Raumstation
ml	Milliliter
MLC	<i>Mixed lymphocyte culture</i>
mM	millimolar
MPO	Myeloperoxidase
MRI	<i>Magnetic resonance imaging</i>
MW	Mittelwert
MZ	Methylzellulose
n	Anzahl der Wiederholungen
Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>	Natrium-Protonen (-Pumpe)
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NF-κB	<i>Nuclear factor κB</i>
NGF	<i>Nuclear growth factor</i>
NK	<i>Natural killer</i>
nM	Nanometer
NMDA-R	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NTP	<i>National Toxicology Program</i>
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidanion

---

OH <sup>·</sup>	Hydroxylradikal
ONOO <sup>·</sup>	Peroxynitrit
p22 <sup>phox</sup>	NADPH-Oxidase-Untereinheit
p40 <sup>phox</sup>	NADPH-Oxidase-Untereinheit
p47 <sup>phox</sup>	NADPH-Oxidase-Untereinheit
p67 <sup>phox</sup>	NADPH-Oxidase-Untereinheit
PAF	<i>Platelet activating factor</i>
PAK	polyzyklisch aromatische Kohlenwasserstoffe
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBB	polybromiertes Biphenylen
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBS-Glc	<i>Phosphate buffered saline</i> mit Glucose
PCB	polychloriertes Biphenylen
pH	Maß für Säuregrad
PI	Phagozytoseindex
PI-3	Phosphatidyl-inositol-3
PKC	Proteinkinase C
pM	Pikomolar
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PMT	<i>Photomultiplier tube</i>
PRR	<i>Pattern-recognition receptor</i>
PS	Phosphatidylserin
QMH 5566	Patentnummer
Rac	NADPH-Oxidase-Untereinheit, G-Protein
Ras	Proto-Oncogen, G-Protein
RFU	<i>Relative fluorescence unit</i>
RLU	<i>Relative luminescence unit</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPM	<i>Random positioning machine</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Zellkulturmedium (Roswell Park Memorial Institute)



---

SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
SOD	Superoxiddismutase
Src	Mitglied der Familie der proto-onkogenen Kinasen
T	Tesla bzw. <i>time</i>
TCDD	Dioxine
TDI	Toluendiisocyanat
TGF $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TLR	<i>TOLL-like receptor</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
ZNS	zentrales Nervensystem
$\alpha$	Signifikanzniveaux
$\Delta B$	magnetischer Gradient
$\chi_m$	magnetische Suszeptibilität

# 1 Zusammenfassung

Das Immunsystem verteidigt den Organismus kontinuierlich gegen eindringende Pathogene, Fremdstoffe und Toxine. Es verhindert die Entwicklung und Ausbreitung von Tumorzellen und hat eine wichtige Bedeutung für die Einleitung und Steuerung regenerierender Gewebereaktionen. Eine Schwächung dieses Abwehrsystems kann fatale Konsequenzen für den Organismus haben. Die Möglichkeit, toxische Wirkungen auf das Immunsystem zu erfassen, spielt jedoch nicht nur in der Medizin eine wichtige Rolle, sondern eröffnet auch im Bereich der Umweltwissenschaften neue Perspektiven.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Assay-Systeme auf ihre Brauchbarkeit getestet, um immuntoxische Einflüsse auf Phagozyten nachzuweisen. Sie zielten auf die Erfassung der Phagozytoseleistung mehrerer Zellsysteme sowie auf deren Fähigkeit zum Abbau der aufgenommenen Partikel durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) während des *oxidative burst*. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Erfassung der Phagozytoseleistung mithilfe eines Chemilumineszenzassays. Das auf der Oxidation von Luminol basierende Nachweissystem soll in einem Zellkultur-Experiment auf der internationalen Raumstation ISS Aufschluss über die Wirkung von Schwerelosigkeit und kosmischer Strahlung auf die Phagozytose geben. Der Luminolassay erwies sich im Rahmen dieser Arbeit als sehr sensitives und zuverlässiges Detektionssystem zur Erfassung immunsuppressiver bzw. immunstimulierender Einflüsse auf die überwiegend intrazelluläre Radikalproduktion beim Abbau phagozytierter Partikel. In Kombination mit dem OxyBURST®-Reagenz (Invitrogen) zum Nachweis extrazellulärer ROS-Produktion lassen sich damit grundlegende Aussagen über die Wirkung verschiedenster Substanzklassen auf eine wichtige Immuneffektorfunktion treffen. Gleichzeitig ist der Nachweis einfach zu handhaben und gut automatisierbar, weshalb er sowohl für den Einsatz im TRIPLE-LUX-Weltraumexperiment, als auch für eine Nutzung in der wirkungsbezogenen Umweltanalytik gut geeignet ist.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass simulierte Schwerelosigkeit in Kurzzeit-Experimenten die Phagozytoseleistung der Makrophagen-Zelllinie NR8383 hemmt und dass dabei gleichzeitig die ROS-Produktion vermindert wird. Im Gegensatz dazu reagieren ruhende Makrophagen mit einer übermäßigen ROS-Produktion auf simulierte Schwerelosigkeit, was darauf schließen lässt, dass die Zellen den Wegfall der Schwerkraft auf zellulärer Ebene als aktivierenden Stressor interpretieren.

Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit verschiedene Substanzen auf ihre immuntoxische bzw. immunstimulierende Wirkung auf Phagozyten getestet. Dabei konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Hydrocortison bei Makrophagen und polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) zu einer Stimulation des *oxidative burst* während der Phagozytose von Zymosan führt, wohingegen die Radikalproduktion in Mikrogliazellen durch das Steroidhormon gehemmt wird. Ähnlich verhielt es sich mit einem Pflanzenextrakt aus dem malayischen Regenwald. Presssäfte aus *Echinacea purpurea* zeigten einen dosisabhängigen Effekt auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383, der sich in einer Hemmung in sehr hohen Konzentrationen und der Stimulation durch geringe Dosen äußerte. Das Schwermetall Cadmium rief eine stark immunsuppressive Wirkung bei PMN hervor, bei Makrophagen zeigte sich neben der immunsuppressiven Wirkung hoher Konzentrationen ( $>10 \mu\text{M}$ ) eine Stimulation der ROS-Produktion bei geringeren Konzentrationen (100 nM). Ein vereinfachter und schematischer Überblick über alle getesteten Parameter und die dabei erhaltenen Ergebnisse findet sich in Tabelle 11 auf Seite 128.

## 2 Einleitung

### 2.1 Phagozyten

Bereits 1774 entdeckte Hunter Leukozyten in eitrigen Ausflüssen. Die ersten phagozytierenden Zellen wurden jedoch erst 1882 durch den Immunologen Metchnikoff beschrieben. Er berichtete von „wandernden Zellen“ bei Invertebraten, die Farbpartikel und Pilzsporen aufzunehmen vermögen. Nach seiner Theorie bestand das menschliche Immunsystem aus Mikrophagen (kleinen, mobilen Phagozyten im Blut: neutrophile Granulozyten) und Makrophagen (großen, sessilen Phagozyten im Gewebe) (Silverstein 1979).

Phagozyten zählen zu den Leukozyten des so genannten angeborenen Immunsystems. Sie interagieren jedoch auch intensiv mit Zellen und Faktoren der adaptiven Immunabwehr. Zu den wichtigsten Vertretern, die auch als professionelle Phagozyten bezeichnet werden, zählen die von Metchnikoff beschriebenen Makrophagen und polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN). Sie stellen nicht nur die wichtigste Abwehrbarriere gegen körperfremde Partikel und Organismen dar, sondern tragen auch entscheidend zur Beseitigung nekrotischer, apoptotischer und entarteter körpereigener Zellen bei. Weitere, in viel geringerer Zahl auftretende Zellen mit phagozytischen Funktionen sind beispielsweise Mikrogliazellen, im Gehirn vorkommende Makrophagen oder dendritische Zellen, deren phagozytierende Eigenschaft besonders wichtig für die anschließende Antigenpräsentation ist.

#### 2.1.1 Neutrophile Granulozyten (PMN)

Unter den drei Typen von Granulozyten (eosinophile, basophile, neutrophile Granulozyten) haben nur die neutrophilen Granulozyten phagozytierende Eigenschaften. Sie sind mit einem Durchmesser von 10 – 12  $\mu\text{m}$  (Dore *et al.* 1990) die kleinsten Phagozyten und zeichnen sich durch einen segmentierten Kern und viele intrazelluläre Vesikel (Granula) aus. Durch ihr Erscheinungsbild mit dem gelappten Zellkern wurde auch die Bezeichnung polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) geprägt. Unter dem Einfluss von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren entwickeln sie sich aus myeloischen Stammzellen des Knochenmarks und treten in den Blutkreislauf ein, wo sie 2 – 3 Tagen überleben. Sie stellen ca. 60 – 70 % der Gesamt-Leukozytenpopulation im peripheren Blut dar, täglich werden 1 – 2  $\times 10^9$  Zellen / kg Körpergewicht umgesetzt (Maianski *et al.* 2004).

Die neutrophilen Granulozyten gehören zu den Zellen der ersten Phase (Akutphase) der Immunantwort am Entzündungsort. In dieser Zeit machen sie etwa 70 % der Zellen am Infektionsort aus. Angelockt werden sie durch chemotaktische Reize wie aktivierte Komplementkomponenten (C3a, C4a, C5a), Leukotriene, den plättchenaktivierenden Faktor (PAF), das bakterielle Tripeptid fMLP, sowie einige Zytokine. Aufgabe der PMN am Entzündungsort ist das Eindämmen und Entfernen der mikrobiellen Infektion, um einen Heilungsprozess im Gewebe zu ermöglichen. Dies geschieht zum einen durch die Phagozytose der Pathogene und deren intrazellulären Abbau (siehe 2.2). Neutrophile Granulozyten sind jedoch auch imstande, durch die Exozytose ihrer mit Enzymen und reaktiven Sauerstoffmetaboliten gefüllten Granula extrazelluläre Erreger anzugreifen. Bei der Degranulation des zytotoxischen Arsenalts kann es zu einer Schädigung des umliegenden Gewebes kommen (Smith *et al.* 1994; Fujishima und Aikawa 1995). Deshalb müssen die zerstörerischen Effektorfunktionen der PMN genau reguliert sein. Die Abwehrreaktion durch PMN kann unter Beteiligung von Antikörpern ausgelöst werden (ADCC, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*), oder aber ohne Antikörper stattfinden (AICC, *antibody-independent cellular cytotoxicity*). Neben Pathogenen zerstören PMN auch infizierte und entartete körpereigene Zellen (Kipnis *et al.* 1981; Schneider *et al.* 1997). Somit leisten sie auch einen entscheidenden Beitrag gegen die Entstehung von Tumoren. Die Freisetzung von Zytokinen (IL-1, IL-2) durch aktivierte PMN am Entzündungsherd lockt wiederum weitere PMN und mononukleäre Leukozyten an. Neben der Sekretion von Arachidonsäurederivaten tragen PMN durch die Chemotaxis weiterer Immunzellen entscheidend zur Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion bei.

Ihre große Bedeutung für das menschliche Immunsystem, vor allem für die Abwehr von bakteriellen Infektionen, zeigt sich bei Patienten mit einer verringerten funktionellen Kapazität der PMN. Beim Krankheitsbild der humanen septischen Granulomatose (CGD, *chronic granulomatous disease*) ist die Bildung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten herabgesetzt. Holmes *et al.* beschrieben bereits 1967, dass die Patienten wiederkehrende entzündliche Erkrankungen erleiden und eine hohe Anfälligkeit für bakterielle und Pilzinfektionen haben (Holmes *et al.* 1967).

### 2.1.2 Makrophagen-Monozytensystem

Makrophagen sind durch ihre stark granulierten Form mit vielen Pseudopodien erkennbar. Sie sind deutlich größer als Lymphozyten oder Granulozyten und besitzen, je nach

Aktivierungsstatus, einen stark schwankenden Durchmesser um die 20  $\mu\text{m}$  (Hildebrandt *et al.* 1998). Ihren Ursprung finden sie in myeloischen Stammzellen des Knochenmarks, jedoch können sie auch in Lunge und Milz gebildet werden. Unter dem Einfluss hämatopoetischer Wachstumsfaktoren differenzieren sie, zirkulierend im Blut, über verschiedene Monozytenstadien (Monoblast, Promonozyt und Monozyt) zu Promakrophagen, dabei verbleiben die Monozyten für etwa 20 – 30 h im Blut, bevor sie in das Gewebe auswandern (Janeway *et al.* 2002). Dabei entwickeln sich die Promakrophagen zu gewebsspezifischen Makrophagen (oder Gewebsmakrophagen) mit zum Teil spezifischen Benennungen. Gewebsmakrophagen finden sich besonders häufig im Bindegewebe (Histozyt), in der Nähe von Blutgefäßen in Leber (Kupffer-Zellen), Lunge (Alveolarmakrophagen) und Milz sowie im Gastrointestinaltrakt (Janeway *et al.* 2002). Auch als knochenabbauende Zellen (Osteoclasten) sind Makrophagen bekannt. Durch das von T-Lymphozyten produzierte Interferon  $\gamma$  ( $\text{IFN}\gamma$ ) werden Makrophagen in einen rezeptiven Zustand versetzt (*priming*), und damit für ein zweites, auslösendes Signal empfänglicher gemacht (*trigger*). Den Anstoß zur Makrophagenaktivierung können verschiedene Faktoren geben, hierzu zählen beispielsweise der Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF), der Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (M-CSF), Interleukin-2 (IL-2) und der Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Die verschiedenen Monozyten- und Makrophagenstadien unterscheiden sich zum Teil in der Ausprägung ihrer Abwehrfunktionen.

Zu den wichtigsten Effektorfunktionen der Monozyten und Makrophagen gehören die Phagozytose sowie der intrazelluläre Abbau der aufgenommenen Partikel durch den *oxidative burst* (siehe 2.2). Eine der vorrangigsten Aufgaben besteht dabei in späten Phasen der Entzündungsreaktion in der Phagozytose apoptotischer PMN und deren Überresten am Entzündungsherd sowie noch nicht vollständig abgebauter Erreger. Dadurch tragen Makrophagen, im Gegensatz zu PMN, die in der Akutphase die Entzündung fördern, zur Beendigung einer Entzündungsreaktion bei (Savill *et al.* 1989; Cox *et al.* 1995). Wie PMN sezernieren auch Makrophagen Abbausubstanzen und Entzündungsmediatoren. Vor allem auf sehr großen extrazellulären Pathogenen oder Parasiten können Makrophagen durch die exozytotische Freisetzung der in ihren Lysosomen enthaltenen Faktoren zytotoxisch wirken. Dieser Vorgang läuft, wie bei PMN, sowohl unabhängig von Antikörpern (AICC) als auch in Verbindung mit Antikörpern ab (ADCC), die an der Oberfläche der Zielzelle binden und so die zu lysierende Zelle markieren. Bei Kontakt mit Bakterien sezernieren Makrophagen Komplementfaktoren (C3, C5) und zahlreiche Zytokine, meist proinflammatorische wie beispielsweise Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), *macrophage inflammatory protein* (MIP),

Interleukine (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12) und *transforming growth factor beta* (TGF $\beta$ ). Diese führen neben der Aktivierung bestimmter Lymphozytensubpopulationen auch zu systemischen Reaktionen wie Fieber (Akira und Kishimoto 1996; Janeway *et al.* 2002; Norimatsu *et al.* 2003). Ein Teil der von Makrophagen initiierten Entzündungsreaktionen besteht in der weiteren Anlockung von PMN. In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, dass die neutrophilen Granulozyten in Richtung von freigesetzten Zytokinen durch stimulierte Makrophagen wandern, z.B. zu IL-8 (Craven 1986; Venuprasad *et al.* 2002). Außerdem weisen PMN Rezeptoren auf, die von Makrophagen sezernierte Mediatoren binden und zu einer funktionellen Beeinflussung von PMN führen, was Ohmann *et al.* (1990) anhand des TNF- $\alpha$  zeigen konnten. Eine weitere wichtige Funktion von Makrophagen ist die Sezernierung von Faktoren, die für die Gewebeorganisation und Narbenbildung am Entzündungsort von Bedeutung sind, wie beispielsweise Elastase und Kollagenase (Unanue 1976).

Aufgrund der Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen zählen Makrophagen zu den professionell Antigen-präsentierenden Zellen (APC), die intensiv mit Zellen des adaptiven Immunsystems (v. A. T<sub>Helfer</sub>-Zellen) interagieren. Darüber hinaus nehmen Makrophagen durch die Aufnahme von *low density lipoproteins* (LDL) auch Einfluss auf den Lipidstoffwechsel.

### 2.1.3 Mikrogliazellen

Lange Zeit wurde angenommen, dass das Gehirn vom Immunsystem abgeschottet ist. Diese Vorstellung sollte erst durch das neue Konzept eines endogenen Immunsystems im zentralen Nervensystem (ZNS) ersetzt werden (Streit 2002). Neben den Neuronen gibt es im zentralen Nervensystem (ZNS) Zellen, die nicht an der Erregungsleitung beteiligt sind, sondern wichtige unterstützende Funktionen für die Neuronen haben, die Gliazellen. Im Wesentlichen unterscheidet man drei Typen: Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia. Im Gegensatz zu den ersten beiden, die ektodermalen Ursprungs sind, leitet sich die Mikrogliazelle vom Mesenchym ab. 5 – 15 % der Zellen im ZNS sind Mikrogliazellen (Ullrich *et al.* 2001). Vermutlich stammen diese Zellen von zirkulierenden Monozyten oder Vorläuferzellen der Monozyten-Makrophagen Linie ab und wandern während der Embryonal- oder Fetalentwicklung in das Gehirn ein, um sich dort zu verzweigten, ruhenden Mikrogliazellen zu differenzieren (Gehrmann *et al.* 1995; Gebicke-Haerter *et al.* 1998; Kim und de Vellis 2005). Ruhende Mikrogliazellen zeigen eine verzweigte Struktur mit langen Fortsätzen

(Nakajima und Kohsaka 2001). Nach Aktivierung, beispielsweise durch Lipopolysaccharid (LPS) oder Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), verwandeln sie sich in amöboide, proliferierende Zellen, die zu den infizierten Stellen im Gehirn wandern (Ullrich *et al.* 2001; Nakamura 2002).

Die wichtige Rolle der Mikroglia bei verschiedenen pathologischen Zuständen wurde erstmals von del Rio Hortega beschrieben, der auch ihren Namen prägte (Del Rio-Hortega 1932). Ihre Hauptfunktion besteht, als Bestandteil der angeborenen Immunantwort, in der Phagozytose apoptotischer und nekrotischer Zellen, vor allem von Neuronen und Zelldebris. Als Gliazellen haben sie ebenfalls die Aufgabe, die Neuronen zu schützen, stützen und zu versorgen. Darüber hinaus wurden viele weitere Funktionen beschrieben, wie beispielsweise die Steuerung der Gewebereparatur durch die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren (Kreutzberg 1996). Sie stehen in ständiger Kommunikation mit den Nervenzellen und kontrollieren damit die Gewährleistung einer normalen neuronalen Funktion. Bei pathologischen Abweichungen von der Norm oder mangelnder Kommunikation schlagen sie Alarm und werden aktiv (van Rossum und Hanisch 2004; Vilhardt 2005).

Aktivierete, amöboide Mikroglia mit zurückgezogenen Zellfortsätzen setzen zytoprotektive, zytotoxische und inflammatorische Mediatoren frei (Banati *et al.* 1993; Gehrman *et al.* 1995; Gebicke-Haerter *et al.* 1998; Nakajima und Kohsaka 2001).

Hierzu zählen unter anderem:

- Zytokine, z. B. IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, TGF- $\beta$ , NGF
- Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)
- Stickstoffmonoxid (NO)
- NMDA-Rezeptor Liganden, z. B. Glutamat, Quinolinsäure
- Entzündungsmediatoren, z. B. Prostaglandin E, Histamin
- Proteasen, z. B.  $\alpha$ 1-Chymotrypsin, Elastase, Plasminogen-Aktivator, Plasminogen

Phagozytische Mikrogliazellen sind durch Expression von MHC II zur Antigenpräsentation fähig und können mit Lymphozyten in Kontakt treten (Gebicke-Haerter *et al.* 1998).

## 2.2 Phagozytose und oxidative burst

Phagozyten erkennen zahlreiche Pathogene, sobald diese die Epithelbarriere überwunden haben. Dabei erkennen sie meist hoch konservierte, pathogen-assoziierte Strukturmerkmale (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) über spezifische Rezeptoren (*pattern-recognition receptors*, PRRs). Einige der erkannten Muster und deren Rezeptoren sind in Tabelle 1 aufgeführt. Neben der direkten Pathogenerkennung ist auch die indirekte Erkennung



mithilfe des humoralen Immunsystems von Bedeutung. Die Opsonierung von Pathogenen durch Komplementfaktoren und Antikörper bietet eine zusätzliche Markierung, die Phagozyten durch spezifische Rezeptoren erkennen. Die Bindung an das Pathogen wird in der Regel durch dessen Opsonierung erhöht. Meist ist sogar die gesamte Immunreaktion der Zelle durch eine Opsonierung verstärkt.

**Tabelle 1** Auswahl von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMP) und deren Rezeptoren (PRR). Komplement- und Antikörper-Rezeptoren erkennen keine PAMPs, sondern körpereigene Strukturen. Die beiden Gruppen wurden jedoch zur Vollständigkeit der Pathogenerkennungs-Mechanismen in die Liste aufgenommen.

PAMP	Beispiel	PRRs
Zellwandbestandteile	Peptidoglykane z. B. Murein Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien Lipoteichonsäuren (LTS) grampositiver Bakterien Mannane der Hefezellwand Phosphatidylserin (PS)	CD14, CR3 (CD11b), Mannoserezeptor, MBP, Scavengerrezeptoren, Toll-like-Rezeptoren (TLR)
Flagellenproteine	fMLP	fMLP-R: FPRL1
Pathogene DNA	unmethylierte DNA, CpG-Motive, dsRNA, U-reiche RNA	TLR
Pathogen-Opsonierung durch Komplementfaktoren	C3b, C4	CR1 (CD35), CR3 (CD11b)
Pathogen-Opsonierung durch Antikörper	Fc-Fragment	Fc-Rezeptoren: CD32, CD64, CD16

Die meisten dieser Rezeptoren werden für die Aufnahme der Pathogene benötigt (endozytierende Rezeptoren), andere lösen eine Signaltransduktionskaskade in den Zellen aus (signaltransferierende Rezeptoren), die wiederum dazu führt, dass beispielsweise Entzündungsmediatoren freigesetzt werden. Eine dritte Klasse an Rezeptoren wird sezerniert. (Medzhitov und Janeway 2000).

Sezernierte PRRs fungieren als Opsonine, indem sie an mikrobielle Zellwände binden und diese zur Erkennung durch Phagozyten oder das Komplementsystem kennzeichnen. Das Mannose-bindende Protein (MBP) gehört beispielsweise zur Gruppe der Akut-Phase Proteine. Es wird in der Leber synthetisiert und bindet innerhalb der ersten Minuten einer Infektion an ein breites Spektrum von Pathogenen. Bei Erkennung wird der Lektin-Weg der Komplementaktivierung in Gang gesetzt (Fraser *et al.* 1998).

Endozytierende PRRs sitzen an der Phagozyten-Oberfläche und binden das Pathogen. Bei der Erkennung bestimmter mikrobieller Strukturen wird die Phagozytose eingeleitet. Der

Mannose-Rezeptor erkennt zum Beispiel spezifisch Kohlenhydrate mit einem hohen Anteil an Mannose, wie sie typisch für Mikroorganismen sind (Fraser *et al.* 1998). CR3 (*complement receptor 3*) bindet unter anderem  $\beta$ -Glucan-Strukturen an Zymosan, ein Polysaccharid der Hefezellwand (Ross *et al.* 1985). Bakterielle Zellwandkomponenten wie Lipopolysaccharide (LPS) und Lipoteichonsäuren (LTS) können durch den Makrophagen-Scavenger-Rezeptor (CD14) erkannt werden (Husemann *et al.* 2002).

Signaltransferierende Rezeptoren lösen nach Bindung des Liganden eine Signaltransduktionskaskade aus, die die Information der Pathogenerkennung ins Innere der Zelle weiterleitet und verschiedene Abwehrreaktionen hervorruft, beispielsweise die Expression verschiedener, für inflammatorische Zytokine codierender Gene. Zu dieser Art zählen die Rezeptoren der sog. *Toll*-Familie. Ligand mancher *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) ist Phosphatidylserin (PS), welches nur an der Innenseite von Plasmamembranen vorkommt. Dadurch erkennen Phagozyten auch Zellfragmente oder apoptotische Zellen, bei denen PS an die Plasmamembran-Außenseite „geflippt“ wird. (Medzhitov und Janeway 2000; Dobrovolskaia und Vogel 2002; Pontarollo *et al.* 2002; Werling und Jungi 2003)

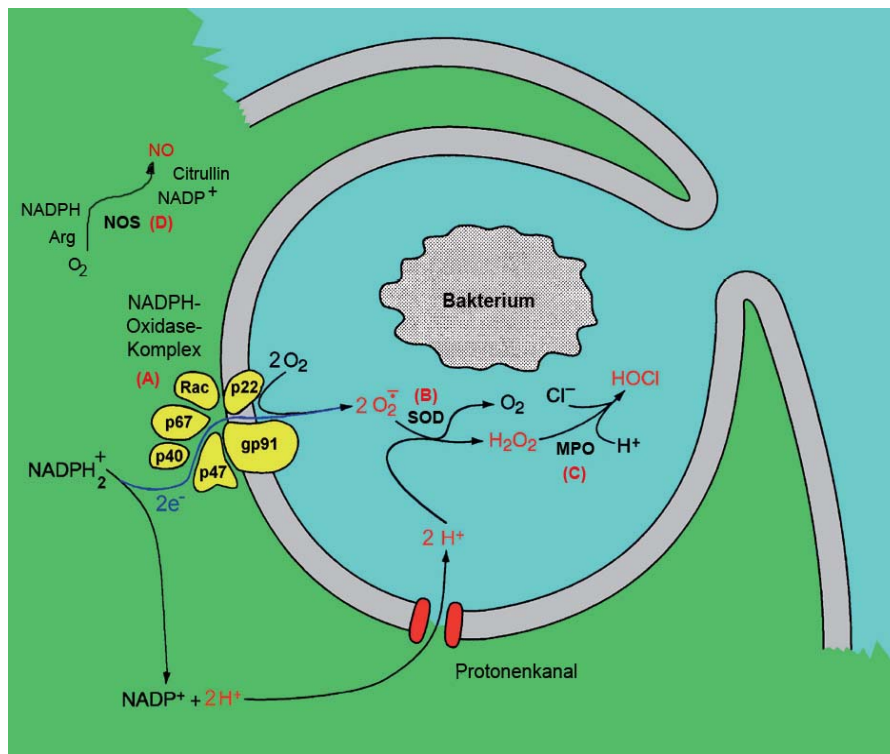
Nach der Anheftung an ein Pathogen mit einem oder mehreren Rezeptoren umfließt der Phagozyt dieses mit Pseudopodien und nimmt es in einem Vesikel auf, dem so genannten Phagosom. Im Zellinneren fusionieren die Phagosomen mit Lysosomen zu Phagolysosomen, wodurch der Abbau der aufgenommenen Partikel über zwei unterschiedliche Wege einleitet wird:

- **sauerstoffunabhängig:** über bakterizide Agenzien (z. B. Lysozym, Lactoferrin, Cathepsin, Defensine) oder pH-Wert Veränderungen
- **sauerstoffabhängig:** durch die Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoff-Verbindungen (*reactive oxygen species* ROS, *reactive nitrogen species* RNS), dem so genannten *oxidative burst*.

Diese sauerstoffabhängige Abwehrreaktion wird auch als *respiratory burst* bezeichnet, da der Sauerstoffverbrauch der Zellen vorübergehend zunimmt (Janeway *et al.* 2002). Verschiedene Enzyme sind an der Bildung unterschiedlicher Radikale beteiligt (Halliwell und Gutteridge 1999; Babior 2000). Die von ihnen katalysierten Reaktionen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Ein Schlüsselenzym, das das Ausgangsprodukt für weitere Reaktionen liefert, ist die NADPH-Oxidase (A). Bei Aktivierung setzt sie sich aus 6 Untereinheiten zusammen, von denen zwei membranassoziiert sind und die restlichen vier aus dem Zytoplasma rekrutiert

werden. Fertig assoziiert befindet sich das Enzym in der Plasmamembran und in den Membranen der Phagosomen. Es generiert Superoxidanionen aus NADPH und Sauerstoff, die in den Extrazellulärraum und vor allem ins Innere der Phagosomen abgegeben wird (Decoursey und Ligeti 2005). Abbildung 1 gibt eine Übersicht über den NADPH-Oxidase-Komplex. Babior (1999) erweiterte in seinem Review den Komplex noch um das membranassoziierte Rap1a-Protein.



**Abbildung 1** Bildung des Superoxidanions durch die Aktivierung des NADPH-Oxidase-Komplexes (nach Decoursey und Ligeti 2005)

Die Superoxiddismutase (SOD (B)) katalysiert die Reaktion von Superoxid zu Wasserstoffperoxid. Durch das Enzym läuft die Reaktion um das 10.000fache beschleunigt ab im Vergleich zum unkatalysierten Vorgang.

Die Myeloperoxidase (MPO (C)) katalysiert eine Oxidation von Halogeniden wie  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$  und  $\text{I}^-$ , mit Wasserstoffperoxid zu hypohalogenigen Säuren (Hampton *et al.* 1998). Aufgrund der hohen Präsenz von Chloridionen wird überwiegend die starke mikrobizid wirkende Hypochlorsäure (HOCl) generiert.

Stickstoffmonoxid, ein Vertreter der RNS, wird durch die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS (D)) produziert. Bei Säugetieren sind heute drei gut charakterisierte Isoformen der NO-Synthasen bekannt. Die neuronale NOS (nNOS bzw. NOS1), die induzierbare NOS (iNOS bzw. NOS2) und die endotheliale NOS (eNOS oder NOS3). Die Namen sagen etwas über ihre

Charakteristik beziehungsweise über das Gewebe aus, in welchem sie ursprünglich als erstes nachgewiesen wurden. Mittlerweile weiß man, dass die drei Isoformen in unterschiedlichsten Geweben und Zellen exprimiert werden (Stuehr 1999; Titheradge 1999; Kleinert *et al.* 2003). Von verschiedenen Spezies ist bekannt, dass reaktive Stickstoffprodukte zytotoxisch oder zumindest zytostatisch auf verschiedene Stadien von Bakterien, Viren, Pilzen, Parasiten, Protozoen und entarteten Zellen wirken (MacMicking *et al.* 1997). Somit ähnelt ihre Funktion den reaktiven Sauerstoffmetaboliten.

**Tabelle 2** Enzym-vermittelte Reaktionen des *oxidative burst*

	<b>Enzym</b>	<b>Katalysierte Reaktion</b>
(A)	NADPH-Oxidase	$2 \text{O}_2 + \text{NADPH} \rightarrow 2 \text{O}_2^{\cdot-} + \text{NADP}^+ + \text{H}^+$
(B)	SOD	$2 \text{O}_2^{\cdot-} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$
(C)	MPO	$\text{Cl}^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OCl}^- + \text{H}_2\text{O}$
(D)	NOS	$\text{Arginin} + \text{O}_2 + \text{NADPH} \rightarrow \text{NO} + \text{Citruillin} + \text{NADP}^+$

Über nicht-enzymatische Wege entstehen aus den bereits beschriebenen Oxidantien weitere Produkte, deren Bildungsreaktionen in Tabelle 3 dargestellt sind. So liefert die über ein Übergangsmetall katalysierte „Haber-Weiss-Reaktion“ (E) beispielsweise das hochreaktive Hydroxyl-Radikal  $\text{OH}^{\cdot}$ . Durch die Reaktion von Wasserstoffperoxid mit einem Hypohalogenit entsteht Singulett-Sauerstoff (F). Hypochlorige Säure bildet in Verbindung mit schwefelsäurehaltigen Aminen wie beispielsweise Taurin recht langlebige und selektiv bakterizid wirkende Chloraminsäuren (G). Das aus der NOS-katalysierten Reaktion hervorgegangene Stickstoffmonoxid reagiert mit Superoxid zum stark antibakteriellen Peroxynitrit (H).

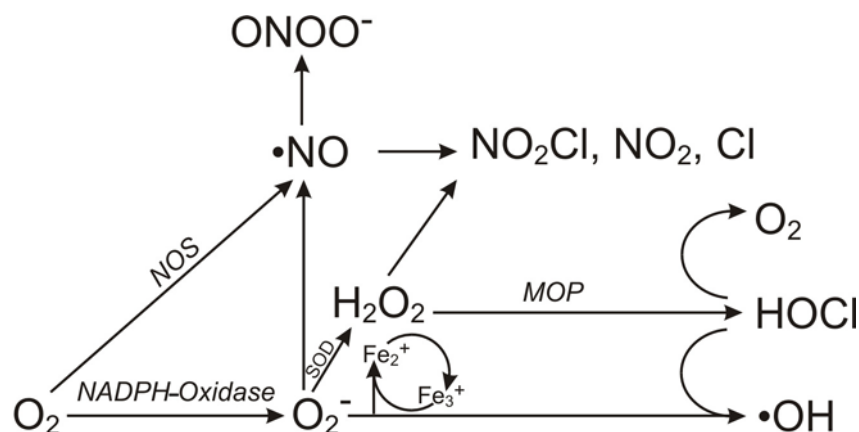
Die beim *oxidative burst* entstandenen ROS und RNS (Abb. 2) wie  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OCl}^-$ ,  $\text{OH}^{\cdot}$ ,  $^1\text{O}_2$ , Chloraminsäure, NO und  $\text{ONOO}^-$  dienen zur Abtötung eingedrungener Pathogene, sowie apoptotischer, nekrotischer und entarteter körpereigener Zellen. Schädigungen des umliegenden Gewebes sind jedoch nicht ausgeschlossen, daher können die Agentien auch Entzündung, Ödeme und Schmerzen hervorrufen (Elstner 1990). Eine unzureichende Kontrolle des *oxidative burst* oder die übermäßige Produktion von Radikalen werden in Zusammenhang mit Pathogenese verschiedener Krankheiten diskutiert (Halliwell und Gutteridge 1999; Babior 2000), zu denen rheumatoide Arthritis, Arteriosklerose, zystische

Fibrose, Reperfusionsschäden, akute respiratorische Insuffizienz oder auch die Karzinogenese zählen.

**Tabelle 3** Enzym-unabhängige Reaktionen des *oxidative burst*

(E)	„Haber-Weiss-Reaktion“ $\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$ $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\cdot + \text{OH}^-$ <hr/> $\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{OH}^\cdot + \text{OH}^-$	(Halliwell und Gutteridge 1999)
(F)	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{OCl}^- \rightarrow {}^1\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{Cl}^-$	(Steinbeck <i>et al.</i> 1992)
(G)	$\text{HOCl} + \text{Taurin} \rightarrow \text{Taurin-Chloraminsäure}$	(Elstner 1990)
(H)	$\text{NO} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{ONOO}^-$	(Pryor und Squadrito 1995)

Die verschiedenen antioxidativen Enzyme der Zelle regulieren die ROS-Konzentration sehr genau und sorgen für eine zeitliche Begrenzung des *oxidative burst*. Das Abklingen einer Entzündungsreaktion geht einher mit dem programmierten Zelltod der PMN. Dabei werden die Einleitung und der Verlauf der Apoptose durch die im Gewebe vorliegende Zytokinverteilung beeinflusst (Haslett *et al.* 1991; Haslett *et al.* 1994; Maianski *et al.* 2004). Makrophagen erkennen und phagozytieren die apoptotischen Zellen und sorgen für ein Abklingen der Entzündungsreaktion.



**Abbildung 2** Produktion reaktiver Moleküle in antimikrobiell wirksamen Zellen MPO: Myeloperoxidase, SOD: Superoxiddismutase, NOS: Stickstoffoxidsynthase (nach Babior 2000; Bogdan *et al.* 2000)

Neben dem vielfach beschriebenen Abbau intra- und extrazellulärer Erreger und defekter Zellen als Funktion der ROS, wird auch eine Signalfunktion diskutiert (Suzuki *et al.* 1997; Finkel 1998). Durch die Interaktion mit Thiolen kann insbesondere  $\text{H}_2\text{O}_2$

Enzymaktivitäten beeinflussen (Forman und Torres 2002). Auf diesen Weg könnten ROS eine entscheidende Rolle für die intrazelluläre Signalgebung spielen.

## 2.3 Bioassays zum Nachweis von Immuntoxizität

Stoffe, die eine für den Organismus negative Immunantwort auslösen oder gar das Immunsystem schädigen, werden als immuntoxische Substanzen bezeichnet. Seit langem ist bekannt, dass diese Stoffe das Immunsystem beeinflussen, indem sie Allergien verursachen oder Entzündungsreaktionen hervorrufen. Diese Beeinträchtigung der Struktur oder Funktion des Immunsystems durch die Einwirkung von Fremdstoffen wird als Immuntoxizität bezeichnet (Burchiel 1999). Mit dem Schwerpunkt Public Health reichen die Anfänge der Immuntoxikologie in die frühen achtziger Jahre des 20. Jahrhunderts zurück (Zbinden 1987). Die Wirkung immuntoxischer Stoffe kann in zwei grobe Kategorien eingeteilt werden (Pallardy *et al.* 1998):

- **Immunsuppression**, welche eine erhöhte Anfälligkeit für Tumore oder Infekte zur Folge haben kann
- **Dysregulierung**, die zu Hypersensitivität, Allergien oder Autoimmunitätsreaktionen führen kann

Diese Mechanismen treten in den verschiedensten Ausprägungen auf und führen zu unterschiedlichen Krankheitsbildern. Eine Immunsuppression kann zum vermehrten Vorkommen oder zur Verschlimmerung ansteckender Krankheiten oder Krebs führen, indem die Fähigkeit des Immunsystems, angemessen auf Einwirkungen von Fremdstoffen zu reagieren, unterdrückt wird (FDA 1999; Descotes 2000).

Stoffe, die als immuntoxisch betrachtet werden, finden sich in fast allen Substanzklassen. Eine wichtige Gruppe bilden hierbei die Schwermetalle. Diese werden in großer Zahl in der Industrie eingesetzt und sind in der Biosphäre sehr präsent. Der Kontakt mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs), wie zum Beispiel polybromierten Biphenylen (PBBs), polychlorierten Biphenylen (PCBs), und Dioxinen (TCDD), kann ebenfalls neben den bekannten Toxizitätserscheinungen zu Immunsuppression führen (Burchiel 1999). Als Umweltschadstoffe sind Pestizide und Insektizide in das öffentliche Interesse gerückt. So konnte für das Pestizid Atrazin eine Veränderung

verschiedener Immunparameter bereits bei einer Dosis unterhalb der LD50 von 850 mg/kg festgestellt werden (NTP 1994).

Auch allergene Mischungen stehen im Verdacht, immuntoxisch zu sein, da sie das Immunsystem anregen und hypersensitive Reaktionen oder Allergien verursachen können. Viele Chemikalien lösen allergische Reaktionen aus, die sich in verschiedenen klinischen Symptomen wie zum Beispiel Asthma, Rhinitis und Anaphylaxe äußern. Die Industriechemikalie Toluendiisocyanat (TDI) und Metalle wie zum Beispiel Nickel und Beryllium sind wichtige Beispiele für solche allergene Agenzien (Pease 1991). Doch nicht nur Chemikalien, sondern auch ultraviolettes Licht oder Elektrosmog können Veränderungen des Immunsystems auszulösen. So konnte in Tierversuchen festgestellt werden, dass UVB-Strahlung die systemische und lokale Immunantwort auf verschiedene Antigene und Mikroorganismen unterdrückt. Die Anfälligkeit des Organismus für virale, mykotische und bakterielle Infektionen wie auch für parasitäre Erkrankungen und antigene Tumore war erhöht. Dies resultiert unter anderem aus der Unterdrückung der Fähigkeit von Makrophagen und Granulozyten, reaktive Sauerstoffspezies zu produzieren und der Verringerung der natürlichen Zytotoxizität (Jokinen *et al.* 2000; Krutmann 2001).

Die Identifizierung von Immuntoxikanten ist schwierig, da Chemikalien eine Vielfalt komplizierter Wirkungen in der Immunfunktion verursachen können. Diese Chemikalien wirken in der Regel nicht in Reinform auf den Organismus ein, sondern sind in den meisten Fällen als Stoffgemische vorzufinden sind, in denen Synergieeffekte auftreten können. Daher ist es wichtig, sich nicht nur auf die klassischen Analysemethoden zu stützen, sondern – insbesondere, wenn es um die Detektion schädlicher Wirkungen von Substanzgemischen geht – neue, wirkungsbezogene Testsysteme zu entwickeln.

Immuntoxizität spielt bisher bei der Bewertung von Chemikalien und Medikamenten eine untergeordnete Rolle. Allerdings wurde bei medizinischen Anwendungen schon vor langer Zeit erkannt, dass immuntoxische Wirkungen von Substanzen eine verheerende Auswirkung auf die behandelten Patienten haben können, vor allem dann, wenn es sich um Personen mit einer Immunschwäche oder um Transplantationspatienten handelt, deren Immunsystem künstlich unterdrückt wurde. Daher sind die bisher vorhandenen Testsysteme hauptsächlich für Produkte aus der Medizin entwickelt worden und messen in erster Linie für Menschen relevante Endpunkte. Die eindeutige Definition eines nachteiligen Effektes ist dabei schwierig und kann nur mit Hilfe von Ergebnissen aus mehreren Parametern ermittelt werden.

Eine Übersicht über zurzeit verwendete Testsysteme und die gemessenen Parameter ist in Tabelle 4 aufgeführt. Diese Tabelle beinhaltet nur eine kleine Auswahl relevanter Tests. Da es bisher keine offiziellen Regelungen zur Untersuchung von Immuntoxizität gibt, existieren auch keine einheitlichen, genormten Testverfahren, und jedes Labor bevorzugt eigene Methoden. Die meisten in der Liste aufgeführten Testsysteme basieren auf Tierexperimenten, welche im Allgemeinen in der biologisch-medizinischen Grundlagenforschung sowie zur Prüfung und Charakterisierung der Verträglichkeit und Unbedenklichkeit vieler Substanzen eingesetzt werden. Diese Testverfahren sind meist teuer, aufwendig und langwierig. Auch angesichts der Tierversuchsproblematik gewinnen *in vitro* Testsysteme zunehmend an Bedeutung. Eine allgemeine Zielsetzung besteht dabei in einer Einschränkung der Zahl der Versuchstiere oder im Verzicht auf ihren Einsatz.

**Tabelle 4** Immuntoxizitätstests; Quellen: Luster *et al.* (1995), United States Congress (1991)

Kategorie	Test
Pathologie	Organgewichte
	Hematologie (Hematocrit, Haemoglobin Konzentration)
	Histologie (Thymus, Milz, Lymphknoten, Leber, Lunge, Niere)
Humorale Immunantwort	Plaque Forming Assay
	LPS-Mitogen Antwort (B-Zellen)
	Immunglobulinkonzentrationen im Serum
Zellvermittelte Immunität	T-Zell-Mitogen-Reaktion
	Mixed Lymphocyte Culture Assay (MLC)
	Lymphoproliferation auf bestimmte Antigene (Listeria)
	Zytotoxischer T-Zell-Test
Unspezifische Immunität	Makrophagen (Anzahl, Phagozytose)
	NK-Zell-Aktivität
Hypersensitivität	Draize Test
	Local Lymph Node Assay
	Moure ear swelling test

Für *in vitro* Tests eignen sich besonders auf zellvermittelter Immunität basierende Systeme. Für Phagozyten wurde bereits eine Vielzahl an Assays entwickelt, um deren verschiedene Eigenschaften zu charakterisieren. Man unterscheidet dabei prinzipiell zwischen Online- oder Kinetikmessungen und Endpunktmessungen. Die am besten zu untersuchenden Zellfunktionen von Phagozyten sind

- Migration



- Zytokinsekretion
- Phagozytose opsonierter und nicht opsonierter Partikel
- *oxidative burst*

Für die schnelle Erfassung immunotoxischer Einflüsse ist eine einfache Durchführung mit schnellem Ergebnis von großem Vorteil und Kosten sparend. Genexpressionsanalysen oder Analysen auf Proteinebene sind wesentlich aufwändiger und kostenintensiver als Funktionalitätstests auf Zellebene.

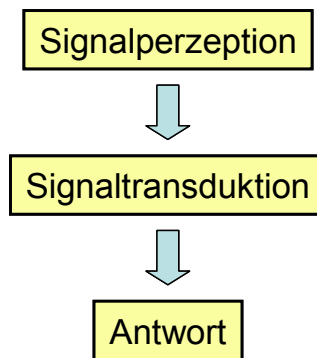
Neben der Kosten- und Aufwandsminimierung bieten *in vitro* Funktionalitätstests auf Zellebene den Vorteil, dass bestimmte Einflüsse gezielter untersucht werden können, da die äußeren Parameter genauer gesteuert werden können. So ist es möglich, redundante oder auch verstärkende Effekte im gesamten Organismus, die meist mit sehr großen Schwankungen in den einzelnen Versuchstieren einhergehen, zu umgehen. Eine veränderte Phagozytoseleistung kann beispielsweise auf einer Funktionsstörung der neutrophilen Granulozyten und Monozyten oder auf einer Beeinträchtigung der Opsonierung der Fremdorganismen mit Immunglobulin bzw. Komplement beruhen. *In vitro* können die Funktionsstörungen der eingesetzten Zellen genau beurteilt werden, da die Opsonierung der phagozytierten Partikel künstlich erfolgt. Deshalb werden *in vitro* Assays dazu benutzt, Wirkungen von Substanzen und äußeren Einflüssen auf die Phagozytoseleistung zu untersuchen. Dabei können sowohl die zu phagozytierenden Partikel als auch die eingesetzten Chemikalien von Interesse sein.

Neben der Zugabe verschiedener Substanzen können auch sonstige Umweltfaktoren verändert und deren Wirkung auf die Zellfunktion bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde unter anderem der Einfluss von simulierter Schwerelosigkeit auf die Makrophagenfunktionen untersucht.

## **2.4 Der Einfluss der Schwerkraft auf Zellen: Schwerkraftsensoren**

Das Leben auf der Erde entwickelte sich unter permanentem Einfluss einer Schwerkraft von  $9,80665 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$  oder 1 g. Für manche Organismen ist die Schwerkraft entscheidend für ihr Überleben, wie beispielsweise für höhere Pflanzen, deren Wurzeln zum Schwerfeld hin (positiv gravitrop) und deren Sprosse in der Gegenrichtung (negativ gravitrop) wachsen. Manche Zooplanktonarten, wie beispielsweise Daphnien, schwimmen nur nachts an die oberen Gewässerschichten, wo sie in einzelligen Algen ihre Nahrung finden. Tagsüber hingegen, wenn sie von Räubern gesehen werden können, begeben sie sich aktiv in tiefere,

dunklere Gewässerschichten. Alle Organismen standen bei ihrer Entwicklung unter dem Einfluss der Schwerkraft. Dabei haben sich unterschiedliche Mechanismen entwickelt, um diesen Umweltfaktor zu detektieren. An die Wahrnehmung dieses Reizes, also die Graviperzeption, schließt sich dabei stets eine Signaltransduktion an, um schließlich eine Antwort in der Zelle oder dem Organismus auszulösen (Abb. 3)



**Abbildung 3** Signalverarbeitung eines Umweltreizes

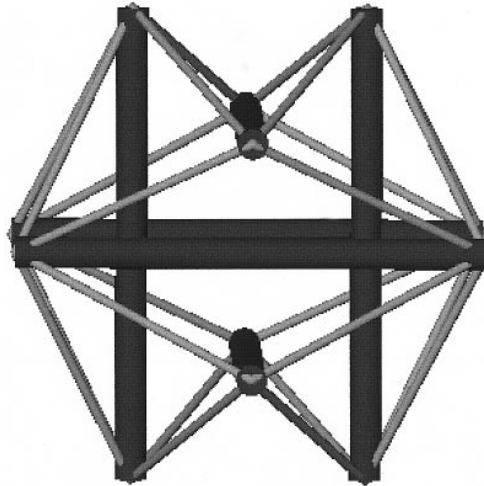
Einige Grundprinzipien gelten für alle Schwerkraftrezeptoren (Björkmann 1992).

- Gravitation übt Kraft auf eine Masse aus.
- Damit ein Rezeptor durch ein Signal verändert wird, muss Arbeit aufgewandt werden.
- Um Arbeit zu verrichten, muss Masse bewegt werden.
- Das stimulierende Signal muss vom Hintergrund unterscheidbar sein.

Einen aktuellen Überblick über verschiedene Gravisensoren geben Gerzer *et al.* (2006). Viele Organismen benutzen zur Graviperzeption Statozyten, also flüssigkeitsgefüllte Zysten mit einer dichten Masse und einem oder mehreren Statolithen (oder Otholithen im Falle des Innenohrs), die beim Absinken auf einen Mechanosensor mit Cilien ein Signal auslösen. Richtungsänderungen verändern die Auslenkrichtung der Cilien und modifizieren damit das erzeugte Signal. Pflanzen benutzen ebenfalls Statolithen für die Graviperzeption. Diese bestehen teilweise aus dem schweren Bariumsulfat, wie beispielsweise bei der multizellulären Grünalge *Chara* (aber auch in manchen tierischen Systemen). Oft fungieren jedoch Amyloplasten als Statolithen, die durch ihren hohen Stärkegehalt eine große Masse besitzen. Welche membranständigen Rezeptoren bei Pflanzen das Statolithensignal aufnehmen und verarbeiten, konnte noch nicht geklärt werden. Braun *et al.* (2002) haben bewiesen, dass das Aktin-Myosin-System in maßgeblicher Weise beteiligt ist. Für höhere Pflanzen, die das Signal aus den Statozyten der Wurzelhaube und aus endodermalen Zellen im Spross an die reagierenden Zellen weiterleiten müssen, ist eine Zell-Zell-Kommunikation vonnöten.

Modulationen von Ionenkanälen werden für diesen Zweck diskutiert, ebenfalls konnte eine Beteiligung des Phytohormons Auxin nachgewiesen werden. Zur Graviperzeption sind jedoch nicht unbedingt spezialisierte Statolithen erforderlich. Auch Zellorganellen oder der Nucleus können als Statolithen fungieren. Dieses Prinzip wurde in Pilzen nachgewiesen. In den Zonen der Graviperzeption bei Basidiomyceten, aber auch bei Schleimpilzen tritt eine Anhäufung von Nuclei in den entsprechenden Zellen auf, die vermutlich über das Aktin-Zytoskelett Informationen über die Reizrichtung weitergeben. Dabei muss die Dichte der Organellen nur geringfügig höher sein als das Zytoplasma (Hock und Häder 2006). Bei einzelligen Systemen kann die gesamte Zellmasse selbst als Statolith wirken und durch verschiedene Zug- und Druckkräfte, die auf die Plasmamembran wirken, eine Information über die Richtung des Schwerevektors vermitteln. Ciliaten der Art *Paramecium* besitzen bipolar angeordnete Ionenkanäle in der Plasmamembran. Mechanische Stimulationen entweder der Natrium- oder der Calciumkanäle, je nach Ausrichtung des Einzellers, führen zu unterschiedlichen Ionenverteilungen und damit auch zu unterschiedlichen Membranpotentialen (Hyper-/Depolarisation) und letztendlich zu einer Anpassung des Cilienschlages, um sich in die gewünschte Richtung fortzubewegen.

Die Schwerkraftwahrnehmung in Säugetieren ist über das Gleichgewichtsorgan im Ohr gewährleistet. Jedoch verfügen auch Lymphozyten, ausgehend von den oben genannten Grundvoraussetzungen zur Graviperzeption, über alle Merkmale, um potentiell Veränderungen der Schwerkraft wahrnehmen zu können. Tatsächlich wurde dies bereits mehrfach bewiesen, über die genauen Mechanismen ist jedoch wenig bekannt. Das anschaulichste Modell zur Erklärung der Schwerkraftwahrnehmung bei Lymphozyten ist das so genannte „*tensegrity model*“, das sich auf die über Druck und Spannung stabilisierte Bauweise in der Architektur bezieht (Abb. 4). Grundlage der Signalwahrnehmung bei Zellen ist demzufolge das flexibel und elastisch aufgebaute Zytoskelett. Ingber (1999) fasste dieses Prinzip anschaulich zusammen. Demnach dienen transmembrane Adhensionskomplexe wie Integin-Cluster (*focal adhesions*) oder Cadherine und Selektine als Mechanorezeptoren. Sie verbinden das (Aktin-) Zytoskelett mit der extrazellulären Matrix und nehmen so die Dehnung und Spannung im Zytoskelett auf. Gleichzeitig können die über Adhensionskomplexe aufgenommenen Signale bezüglich Druck und Spannung im Zytoskelett in diversen Signaltransduktionskaskaden abgeleitet und in multiple Reaktionen der Zellen umgewandelt werden.



**Abbildung 4** Computergeneriertes Diagramm eines “tensegrity models” mit 6 Pfeilern und 24 Schnüren im Zustand des Kräfteausgleichs. Die Pfeiler haben keinen Kontakt zueinander, die Struktur stabilisiert sich durch die kontinuierliche Spannung der Schnüre (aus Ingber 1999)

Verschiedene weitere Modelle beschreiben die möglichen Auslöser einer veränderten Reizantwort in Schwerelosigkeit. So geht das Bifurkations-Modell beispielsweise davon aus, dass für die Zelle der Symmetrieverlust im Zytoskelettsystem die entscheidende Information liefert (Kondepudi 1989; Kondepudi 1991; Mesland 1992; Tabony und Job 1992). Das „*gravity-buoyancy model*“ beschreibt, dass die Lage zweier Zentren, dem Zentrum für Gravitation und dem Zentrum für Auftrieb, bedeutend ist für die Lage im Schwerfeld und veränderte Informationen über die Lage dieser Zentren zu einem veränderten Verhalten der Zellen führen (Häder *et al.* 2005). Entscheidend ist in jedem Fall die Lage der schweren Organellen (z. B. Zellkern, Mitochondrien) in der Zelle, die als „Statolithen“ fungieren könnten und dadurch bei 1g Erdbeschleunigung standardmäßig eine Spannung im Zytoskelett verursachen. Das „*extracellular-transport model*“ geht davon aus, dass die meisten beobachteten Effekte in Schwerelosigkeit auf die fehlende Diffusion im umliegenden Medium zurückzuführen sind (Todd und Klaus 1996) und nicht durch die fehlende Schwerkraft verursacht werden. Demnach werden die Zellen nicht mehr ausreichend mit Nährstoffen, vor allem Glucose, versorgt. Gleichzeitig sammeln sich Ausscheidungsprodukte an der Plasmamembran der Zellen an.

Das nächste Kapitel fasst einige Erkenntnisse über beobachtete Veränderungen bei Lymphozyten zusammen.

## 2.5 Die Auswirkung von Schwerelosigkeit auf das Immunsystem

Mangelndes Training der Muskeln und Knochen bei Astronauten geht einher mit gravierenden physiologischen Veränderungen des Körpers. Dieser Zusammengang ist weithin bekannt, und die Einzelprozesse werden intensiv erforscht. Weniger bekannt ist die Tatsache, dass Weltraummissionen in der Regel auch eine Suppression des Immunsystems der Astronauten nach sich ziehen. In erster Linie macht man den psychologischen und physiologischen Stress einer Mission für diesen Effekt verantwortlich. Stark veränderte Hormonwerte, wie eine erhöhte Konzentration der Stresshormone Catecholamin und Cortisol in den Blutproben von Astronauten, bestätigen neben vielen weiteren veränderten Stressparametern den Verdacht, dass der Organismus insbesondere durch Start und Landung enorm beansprucht ist (Leach Huntoon *et al.* 1994; Mills *et al.* 2001). So lässt sich vermutlich die stark erhöhte Anzahl mancher Leukozyten-Subpopulationen auf den gesteigerten Catecholamin-Spiegel zurückführen. *In vitro* Untersuchungen an isolierten Leukozyten in Schwerelosigkeit konnten jedoch mehrfach bestätigen, dass auch auf Zellebene eine Wahrnehmung der veränderten Schwerkraft stattfindet und die Zellen mit unterschiedlichsten Anomalien darauf reagieren.

In einem Experiment bei der Spacelab 1 Mission 1983 konnten Cogoli *et al.* (1984) zeigen, dass die Mitogen-Aktivierung von T-Lymphozyten unter Mikrogravitations-Bedingungen ( $\mu g$ ) fast vollkommen inhibiert ist. In späteren Missionen untersuchte Lymphozyten wiesen generell eine bedeutend höhere Schädigung auf als an Bord bei 1 *g* zentrifugierten Kontrollzellen, die reguläre Mitose und Blastogenese aufwiesen (Cogoli *et al.* in Longdon und David 1988). Biochemische und mikroskopische Studien erwiesen später, dass die Apoptoserate bei  $\mu g$  erhöht ist (Lewis *et al.* 1998; Cubano und Lewis 2000). 1999 konnte nachgewiesen werden, dass das Zytoskelett, das u. a. eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion spielt, bereits nach wenigen Sekunden in Mikrogravitation mit einer Strukturveränderung reagiert (Sciola *et al.* 1999). In einem *sounding rocket*-Experiment wurde gezeigt, dass Mikrotubuli nach mehreren Minuten  $\mu g$  praktisch keine Selbstorganisation mehr aufweisen (Papaseit *et al.* 2000). Dies beweist, dass grundlegende Strukturelemente durch Schwerelosigkeit gestört werden. Zahlreiche Untersuchungen belegen Veränderungen der Signaltransduktionswege in Lymphozyten. Limouse *et al.* (1991) und de Groot *et al.* (1990) berichteten bereits sehr früh von einer Hemmung und einer veränderten intrazellulären Verteilung der Proteinkinase C (PKC) bei  $\mu g$ . Ebenso wird die Expression der frühen Onkogene *c-fos*, *c-myc* und *c-jun* unterdrückt. Eine verminderte Kapazität von T-

Zellen zur Produktion von Zytokinen ist ein weiterer beschriebener Effekt von  $\mu g$  auf Leukozyten. (Reviews siehe Cogoli 1993; Cogoli 1997; Cogoli und Cogoli-Greuter 1997; Reviews siehe Bräucker *et al.* 2002; Lewis 2002; Cogoli-Greuter *et al.* 2004)

Experimente mit Phagozyten in Mikrogravitation sind nur vereinzelt durchgeführt worden. Untersuchungen an neutrophilen Granulozyten bei einem Parabellflugexperiment zeigten eine Erhöhung der Produktion des Superoxidanions um das Vierfache (Fleming *et al.* 1991). Kaur *et al.* (2005) untersuchten aus dem Blut von Astronauten isolierte Monozyten vor und nach einer Mission auf deren Effektorfunktionen und verglichen sie mit Kontrollgruppen. Dabei wurde eine deutliche Reduktion der Phagozytoserate (bei Phagozytose von *E. coli*) sowie eine verminderte Kapazität zum *oxidative burst* und zur Degranulation deutlich. Die gehemmte Phagozytoserate war vermutlich durch die verminderte Expression des Oberflächenmarkers CD32, einem Fc $\gamma$ -Rezeptor, bedingt. Meloni *et al.* (2006) zeigten vor kurzem, dass simulierte Schwerelosigkeit auch massive Veränderungen des Zytoskeletts von Monozyten hervorruft, was zu einer Beeinflussung der Motilität der Zellen führt. Doch auch die Phagozytose geht einher mit starken Umstrukturierungen des Zytoskeletts. Prinzipiell sind für die Phagozytose ähnliche Mechanismen und dieselben Zytoskelettstrukturen erforderlich wie für die Fortbewegung der Zellen, so dass auch bei Phagozyten mit einer Störung der normalen Immunfunktion zu rechnen ist.

## **2.6 Das TRIPLE-LUX-Projekt zur Beurteilung des Einflusses verschiedener Beschleunigungen sowie der Weltraumstrahlung auf das Immunsystem**

Die vorliegende Dissertationsarbeit ist eingebunden in das vom Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt finanzierten Projekt TRIPLE LUX. Drei Kooperationspartner sind daran beteiligt, eine auf Chemilumineszenz basierende Biosensor-Testbatterie zu entwickeln, mit der schädliche Einflüsse auf das Immunsystem sowie auf das Erbgut detektiert und charakterisiert werden können. Neben den Modellsystemen Bakterien (Dr. P. Rettberg, Institut für Luft- und Raumfahrtmedizin, DLR Köln) und Invertebraten-Phagozyten (Prof. Dr. P.-D. Hansen, Institut für Ökotoxikologie, TU Berlin) bearbeitet unsere Arbeitsgruppe Säuger-Phagozyten. An den verschiedenen Modellsystemen soll der Einfluss von Schwerelosigkeit und kosmischer Strahlung auf der Internationalen Raumstation (ISS, Abb. 5) untersucht werden (Rabbow *et al.* 2003; Rabbow *et al.* 2006). Der mögliche immuntoxische Einfluss von Schwerelosigkeit wurde bereits im vorherigen Kapitel erläutert.

Einen vielleicht noch stärkeren Einfluss auf das Immunsystem hat die Exposition mit kosmischer Strahlung im Inneren einer Raumstation bzw. bei einem Weltraumspaziergang, einer so genannten EVA (*extra vehicular activity*). Deme *et al.* (2006) bestimmten mittels Dosimeter auf der MIR sowie auf der ISS mittlere Strahlungswerte zwischen 4 und 8  $\mu\text{Gy/h}$ . Demnach ist die Strahlenexposition dort 50 – 100-mal höher als auf der Erde. Untersuchungen mit dem zurzeit an der Außenseite der ISS befindlichen Phantom Matroshka, einem mit vielen Dosimetern ausgestattetem nachgebildeten menschlichen Oberkörper, ergaben, dass die Strahlendosis bei einer EVA nochmals um das Dreifache im Vergleich zum Inneren der Raumstation gesteigert ist (Reitz und Berger 2006). Obe *et al.* (1997) untersuchten die Lymphozyten von sieben Astronauten, die mehrere Monate auf der MIR verbracht haben. Sie entdeckten, dass die Anzahl an dizentrischen Chromosomen um das 3,5-fache angestiegen war. Neben Chromosomenaberrationen und Minisatelliten-Mutationen kann kosmische Strahlung eine Vielzahl an Störungen und Veränderungen hervorrufen (Gerzer *et al.* 2006), unter anderem eine erhöhte Apoptoserate oder metabolische Veränderungen in Serum, Plasma und Urin (z.B. Serumlipide, Lipoproteine, HDL/LDL, Cholesterin, Lipoproteinlipase-Aktivität, Lipidperoxide, Melatonin oder Antikörper). Kombinierte Effekte von Schwerelosigkeit und kosmischer Strahlung sind bisher nur wenig erforscht. Canova *et al.* (2005) konnten bei lymphoblastoiden TK6 Zellen eine Beeinflussung der Reaktion auf  $\gamma$ -Strahlung durch simulierte Schwerelosigkeit feststellen. So erhöhte sich in Mikrogravitation beispielsweise der Anteil geschädigter, aber überlebender Zellen. Neben einer verminderten Apoptoserate war hier auch eine Störung des Zellzyklus auffällig. Bei einem Experiment mit T-Zellen in einem Ballon, der in der Stratosphäre 22 h lang kosmischer Strahlung ausgesetzt war, entdeckten Meloni *et al.* (2002) verschiedene Gene, die nach Aktivierung der Zellen im Vergleich zur abgeschirmten Kontrolle unterschiedlich reguliert waren, darunter auch die für die Abwehr von oxidativem Stress sehr bedeutsame Glutathion-Peroxidase 1 (Aoyama *et al.* 2006). Bei einem BIORACK-Experiment 1994 wurde die Fähigkeit humaner Fibroblasten untersucht, nach einer Bestrahlung mit 5 Gy bzw. 10 Gy die entstandenen DNA-Einzel- und –Doppelstrangbrüche in Mikrogravitation zu reparieren. Dabei stellte sich heraus, dass die DNA-Reparatursysteme bei 0g Bedingungen unverändert stattfinden. Es konnte kein Unterschied zu Kontrollzellen in einer 1g-Referenzzentrigung festgestellt werden (Horneck *et al.* 1996; Horneck *et al.* 1997). Wie sich der kombinierte Effekt aus Mikrogravitation und Strahlung auf Immuneffektorfunktionen auswirkt, wurde bisher nicht untersucht. Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag bei der Untersuchung

von Mikrogravitationseffekten. In weiterführenden Experimenten sollen die Fragestellungen um das Thema Strahlung erweitert werden.

Mit dem für Dezember 2007 geplanten Start des Space Shuttles, das das europäische Labormodul Columbus (Abb. 6) auf die ISS bringen wird, erschließt sich für internationale Forschergruppen die Möglichkeit, im neuen BIOLAB-Modul biologischen Fragestellungen unter realen Weltraumbedingungen auf den Grund zu gehen. Abbildung 7 zeigt das BIOLAB-Modul, in dem das TRIPLE-LUX-Experiment als einer der ersten Vertreter für automatisierte biologische Experimente durchgeführt wird (Brinckmann und Schiller 2002; Brinckmann 2003; Rabbow *et al.* 2003; Brinckmann 2004; Rabbow *et al.* 2006).



**Abbildung 5** Die Internationale Raumstation ISS, Foto ESA



**Abbildung 6** Das europäische Labormodul Columbus, schematische Darstellung (li) und Außenansicht des Modells von ESA/ESTEC in Noordwijk, NL; Fotos ESA





**Abbildung 7** Das BIOLAB-Modul für biologische Experimente im europäischen Weltraumlabor Columbus, Foto ESA

Mit dem auf Luminol basierenden Chemilumineszenztest zur Detektion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wird der *oxidative burst* der Makrophagen-Zelllinie NR8383 aus *Rattus norvegicus* untersucht. In einer Kinetikmessung kann die Produktion von Radikalen quantifiziert und mögliche immuntoxische Einflüsse durch die Schwerelosigkeit oder die kosmische Strahlung an Bord der ISS detektiert werden. Es handelt sich um einen Langzeitversuch, der sofort nach Ankunft auf der ISS, nach 5 Wochen sowie nach 10 Wochen durchgeführt werden soll. Die Zellen werden kryokonserviert transportiert und gelagert und mehrere Stunden vor Beginn der Messung reaktiviert. Anschließend folgt die Injektion von Zymosan in die Messbehälter, um die Phagozytose und die damit verbundene Radikalproduktion zu starten. Über einen Zeitraum von ca. 1,5 h wird das Lumineszenzsignal aufgezeichnet und dann zusammen mit Daten über die Zellvitalität zur Erde gesandt, wo die Daten sofort analysiert werden können.

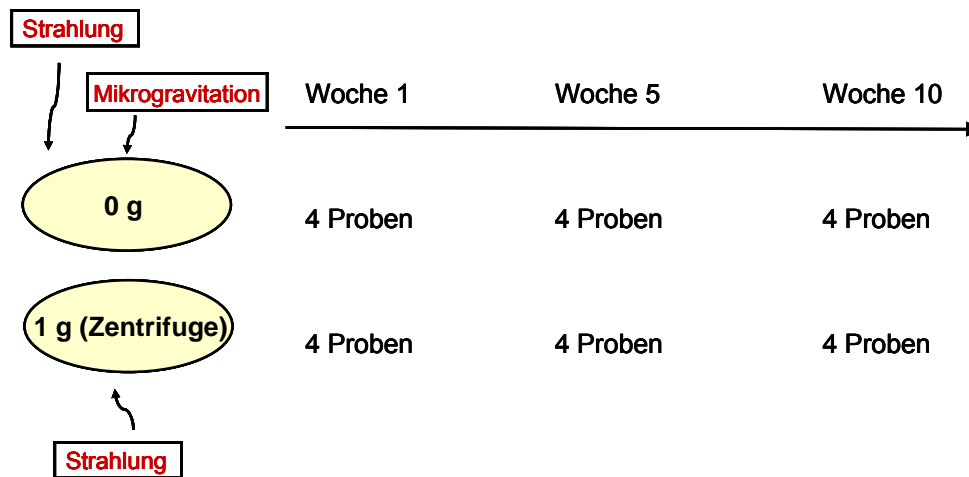


Abbildung 8 Schematische Darstellung des Versuchsablaufs im BIOLAB der ISS

Im BIOLAB befindet sich eine 1 g Referenz-Zentrifuge, die normale Erdbeschleunigung simuliert. Indem parallel das gleiche Experiment bei Schwerelosigkeit und unter normaler Schwerkraft durchgeführt wird, können die Wirkungen von Mikrogravitation und kosmische Strahlung differenziert werden (Abb. 8). Dabei verhindert ein langsamer Rührmechanismus die Sedimentation der Zellen in 1g und gewährleistet gleichzeitig die kontinuierliche Versorgung der Zellen durch leichte Strömungen im Medium. Zusätzlich werden *ground-based* Kontrollversuche mit denselben Zell- und Reagenzien-Chargen auf der Erde durchgeführt. Ein Teil der Zellen wird nach dem Test wieder kryokonserviert und kann nach dem Rücktransport zur Erde weiter untersucht werden. Für einen möglichst autonomen und störungsfreien Ablauf ist eine Automatisierung des Experiments erforderlich. Die hierfür von EADS Astrium GmbH (Friedrichshafen) entwickelte *hardware* muss von einem Astronauten nur noch aus 3 Komponenten zusammengefügt werden, und der Test kann vollautomatisch ablaufen. Die Anforderungen an das Testsystem für eine Realisierbarkeit auf der ISS – gute Automatisierbarkeit, gute Reproduzierbarkeit, wenige und einfache Arbeitsschritte – machen das Testprinzip auch sehr interessant für eine Anwendung in der Umweltanalytik oder in der Pharmaindustrie.

## 2.7 Zielsetzung

Astronauten leiden nach einem Aufenthalt im Weltraum unter einem geschwächten Immunsystem. Selbst nach Kurzzeitmissionen von mehreren Tagen lassen sich bei Leukozyten eine deutliche Reduzierung der Zahl sowie eine Verminderung der Aktivierbarkeit, Proliferationsrate und Effektorfunktionen nachweisen. Bisher ist nur wenig darüber bekannt, ob die Veränderungen der Immunzellen auf den psychologischen und physiologischen Stress der Astronauten bei Weltraummissionen zurückgehen oder ob auch direkte Effekte durch die fehlende Schwerkraft und die kosmische Strahlung ausgelöst werden. Verschiedene Experimente an Immunzellen konnten bereits einen direkten Einfluss fehlender Schwerkraft nachweisen.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung, Optimierung und Vorbereitung eines automatisierbaren Bioassays auf der Basis von Chemilumineszenz, um den Einfluss von Stressbedingungen auf den *oxidative burst* von Phagozyten zu detektieren. Im Rahmen des ESA-Projekts TRIPLE-LUX wird dieser Assay im BIOLAB Modul auf der internationalen Raumstation (ISS) eingesetzt, um den Einfluss von Schwerelosigkeit und kosmischer Strahlung auf Säuger-Phagozyten zu untersuchen.

In diesem Zusammenhang wurden weitere Assay-Systeme etabliert, um in *ground-based* Simulationen vorab die Wirkung von simulierter Schwerelosigkeit auf die Radikalbildung der für den Weltraumversuch ausgewählten Zelllinie zu erforschen.

Des Weiteren wurden verschiedene Substanzen auf ihr Potential untersucht, die Phagozytose und den *oxidative burst* zu beeinflussen. Dazu gehören das Schwermetall Cadmium, die Steroidhormone Hydrocortison und 17 $\beta$ -Östradiol, Cyclosporin A sowie verschiedene Pflanzenextrakte.

Damit sollte gezeigt werden, dass sich die Assay-Systeme auch für einen Einsatz in der Umweltanalytik oder in der Pharmaindustrie eignen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien

17 $\beta$ Östradiol	Sigma E8875
2-Mercaptoethanol	Gibco 31350
3-Aminophthalhydrazid (Luminol)	Sigma A4685
4-6-Diamidino-2-phenylindol-d-hydrochlorid (DAPI)	Sigma D9542
Antibiotic Antimycotic Solution (100X) stabilized	Sigma A5955
Borsäure (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	Merck 1.00165
Cadmiumchlorid (CdCl <sub>2</sub> )	Sigma C-3141
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck 2388
Cyclosporin A	Fluka 30024
Dextran 60	Serva 18680
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma D-8779
di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *12H <sub>2</sub> O)	Merck 1.06579
di-Natriumtetraborat-Decahydrat (Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> x 10 H <sub>2</sub> O)	Merck 1.06308
DMEM	Biochrom FG0435
Donor Horse Serum	Biochrom S9135
<i>Echinacea purpurea</i> Extrakte	Berghof-Kräuter GmbH
Ethanol	Zefa Z 98005
Ethanol absolut	Merck 1.00983
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma E5134
OxyBURST® Green H2HFF BSA	Invitrogen O-13291
FITC-Zymosan	Invitrogen Z2841
Fluorescein (FITC)	Fluka 46950
Formaldehyd	Merck 1.04002
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom S0115
Glutamin	Cell concept R-L1000-H
HAMS F12	Biochrom FG0815
Histopaque® -1077	Sigma 10771
Hydrocortison (mit Cyclodextrin-Hülle)	Sigma H0396

Isopropanol	Zefa Z 03075.100
Kaliumchlorid (KCl)	Merck 1.04936
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck 4873
Klarlack Base Coat	Manhattan
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Fluka 63136
Meerrettichperoxidase	Merck 1.16216
Methanol	Fluka 65541
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck 6392
Natriumchlorid (NaCl)	Merck 6404
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O)	Merck 1.06346
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck 1.06329
Nitrotetrazolium Blue Chloride (NBT)	Fluka 74032
Percoll	Sigma P-4937
Pflanzenextrakt QMH 5566	Prof. Dr. Dr. Ullrich
Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA)	Sigma P8139
Propidiumjodid	Fluka 81845
RPMI-1640	Gibco 42401-018
Trypanblau-Lösung 0,4 %	Sigma T-8154
Vectashield Mounting Medium for Fluorescence	Vector Laboratories
Zelllinie NR3838	Dr. Diabaté
Zelllinie BV-2	Prof. Dr. Dr. Ullrich
Zymosan A	Sigma Z4250
Zymosan A Bio Particles opsonizing reagent	Invitrogen Z2850

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	AL 9.161.01
Kanülen	Rose 0603
Kryoröhrchen	Greiner bio-one 2010-01
Mikrotiterplatten transparent	Greiner bio-one 655061
Mikrotiterplatten weiß	Greiner bio-one 655075
Objektträger	Roth 2109
Parafilm	Brand 291-1213
Pasteurpipette	Brand 747715

PD-Tips 0,5 ml	Brand 702370
PD-Tips 2,5 ml	Brand 702374
PD-Tips 5 ml	Brand 702376
Pipettenspitzen 0,5 – 20 µl	Eppendorf 003.0000.854
Pipettenspitzen 1000 – 5000 µl	Eppendorf 003.0000.978
Pipettenspitzen 2 – 200 µl	Eppendorf 003.0000.870
Pipettenspitzen 50 – 1000 µl	Eppendorf 003.0000.919
Pipettenspitzen 500 – 250 µl	Eppendorf 003.0000.951
Reaktionsgefäße, Safe-Lock 0,5 ml	Eppendorf 0030 121.708
Reaktionsgefäße, Safe-Lock 1,5 ml	Eppendorf 0030 121.708
Reaktionsgefäße, Safe-Lock 2,0 ml	Eppendorf 0030 121.708
Serologische Pipetten steril, Plastik 1 ml	Greiner bio-one 604181
Serologische Pipetten steril, Plastik 10 ml	VWR 612-1279
Serologische Pipetten steril, Plastik 25 ml	Sarstedt 86.1685.001
Serologische Pipetten steril, Plastik 5 ml	VWR 612-1276
Serologische Pipetten steril, Plastik 50 ml	neolab 7-4036
Spritzen	Braun 4606108V
Sterilfilter Millex	Millipore SLGP033RB
Zellkulturflasche 175 cm <sup>2</sup>	Sarstedt 83.1812.302
Zellkulturflasche 75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt 83.1813.302
Zellschaber	Sarstedt 85450
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Greiner 188261
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Greiner 2272612

### 3.1.3 Geräte

Autoklav	Tuttnauer 3870 ELV
Brutschrank	Heraeus
Einfrierbox	Nalgene
Beckton Dickinson FACSCalibur flow cytometer	BD Biosciences, San Jose, USA
Fluoreszenzphotometer/Luminometer	SpectraFluorPlus Tecan
Gefrierschrank -70°C	Heraeus
Gefrierschrank -80°C	Heraeus

Inverses Mikroskop	Wilovert, Will
Kryotank	Minnesota Valley Engeneering
pH Meter	Knick Portamess
Mikroskop	Zeiss Axioplan
Parabelflug-Module	K.E.K., Bad Schmiedeberg
Pipetten	Eppendorf Reference
Pipettierhilfe Accu Jet	Brandt
Pipettierhilfe Handy Step	Brandt
Plattenzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5403
Schnelldrehender 2D Küvettenklinostat	Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt
Sterilbank Lamin Air	Holten
Sunrise ELISA Mikrotiterplattenreader	Tecan
Supraleitfähiger Magnet	Oxford Instruments
Thermoelement HI 92704C	Hanna Instruments Inc., Ann. Arbor, MI, USA
Ultrazentrifuge	Beckman
Umkehrmikroskop m. Kamera	Olympus
Wasserbad	Grant
Zählkammer (Neubauer)	Brand
Zellkontainer	K.E.K., Bad Schmiedeberg
Zentrifuge	Desaga Sarstedt
Zentrifuge	Heraeus Minifuge RF
Zentrifuge	Sorvall® RC-5B DuPont

### 3.1.4 Puffer und Lösungen

Im nachfolgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen aufgeführt.

Zellkulturmedium für Makrophagen-Zelllinie NR8383

Hams F12

10 % FCS

1 % Antibiotic-Antimycotic Solution

0,1 % 2-Mercaptoethanol

Zellkulturmedium für Mikroglia-Zelllinie BV-2

DMEM

16 % FCS

200 mM Glutamin

1 % Antibiotic-Antimycotic Solution

Einfriermedium

70 mL RPMI-1640 ohne Hepes

20 mL FCS

12 mL DMSO

100 µl 2-Mercaptoethanol

PBS

80 mM, pH 7,6

1,38 g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

12,46 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

8,50 g/l NaCl

PBS-Glc, pH 7,3

8g NaCl

0,2 g KCl

0,62 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

1,14 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

in 800 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  lösen

10 ml 10% D-Glucose-Lösung (w/v)

ad 1 l  $\text{dH}_2\text{O}$

Krebs-Ringer-Glukose (KRG), pH 7,35

145 mM NaCl

5,7 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$

4,86 mM KCl

0,54 mM  $\text{CaCl}_2$

1,22 mM  $\text{MgSO}_2$



Isotones Percoll: 0,45 g NaCl in 50 ml Percoll (4°C)

55 %iges Percoll: 16,3 ml PBS

20,0 ml isotones Percoll

74 %iges Percoll: 10,5 ml PBS

30,0 ml isotones Percoll

Boratpuffer, pH 9

1,24 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

7,63 g Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> x 10 H<sub>2</sub>O

ad 1 l dH<sub>2</sub>O

Luminollösung

Stammlösung 100 mM Luminol in DMSO, Lagerung bei -20°C

Verdünnung 1 : 10 in Boratpuffer, pH 9 vor Testansatz

Opsoniertes Zymosan A

Nach Allen (1986 S. 458)

- Zymosan A aus *Saccharomyces cerevisiae* in physiologischer Kochsalzlösung (0,85 % w/v) 250 mg/dl, in kochendem Wasserbad 20 min erhitzen
- Abkühlung auf 22° C
- 10 min bei 300 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen, Rückstand in 200 ml Donor Horse Serum resuspendieren
- 20 min bei 22° C leicht bewegen, erneut zentrifugieren
- letzte zwei Schritte wiederholen, Überstand verwerfen
- zweimaliges Waschen des Rückstands in je 500 ml Kochsalzlösung (zur vollständigen Entfernung von Proteasen)
- auf die Originalkonzentration einstellen (250 mg/dl), zu je 2 ml aliquotieren, lagerbar bei -20° C
- Die Suspension enthält 600 ± 200 Zymosanpartikel pro µl.

FITC-Zymosan

Frisches opsoniertes Zymosan (siehe oben) mit 0,4 % (w/v) FITC für 30 min bei 37°C dunkel inkubieren, 6 x mit PBS waschen, aliquotieren, Lagerung bei -20°C

Alternativ:

Zymosan A Bioparticles opsonizing reagent sowie FITC-Zymosan (Bioparticles) je in 500  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O resuspendieren, mischen, 1h dunkel bei 37°C inkubieren, 3 ml PBS zugeben, bei 3000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugieren, zweimal in 3 ml PBS waschen, in 1 ml ddH<sub>2</sub>O resuspendieren, Partikelzahl in Neubauer-Zählkammer bestimmen, aliquotieren, Lagerung bei -20°C

Für Phagozytoseassay 5 – 20 Partikel pro Zelle einsetzen

#### NBT-Zymosan

Opsoniertes Zymosan (siehe oben) mit 0,2 % (w/v) NBT für 2 h bei 37°C inkubieren, frisch verwenden

Kontrolllösung: 0,2 % NBT (w/v) in PBS

#### Meerrettichperoxidase (HRP)

500 U/ml in PBS, Lagerung bei -20°C

#### Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA)

5 mM in DMSO, Lagerung bei -20°C

### 3.1.5 Testsubstanzen

#### *Echinacea purpurea* (Berghof-Kräuter GmbH, Heilsbronn)

Oberirdisches Kraut in vergorener bzw. ethanolischer Lösung:

(A) 9,6 % (w/v) Trockenrückstand in vergorener Lösung

(B) 6,5 % (w/v) Trockenrückstand in ethanolischer Lösung (ca. 20 % EtOH)

Lagerung bei 4°C.

Lösung A wurde ebenfalls auf 6,5 % (w/v) Trockenrückstand verdünnt, bevor beide Lösungen jeweils in den Verdünnungsstufen  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  und  $10^{-9}$  getestet wurden. Die höchste Ethanolkonzentration betrug somit  $2 \times 10^{-1}$  ‰ (v/v).

#### Hydrocortison

Stammlösung 10 mM in PBS (durch Dextranhülle in wässrigem Milieu löslich), Lagerung bei 4°C; eingesetzt wurden Konzentrationen zwischen 100  $\mu$ M und 1 nM in Zehnerpotenzen.

### Cyclosporin A

Stammlösung 100 mg/ml in EtOH, Lagerung bei 4°C. Die eingesetzten Konzentrationen waren 1 µg/ml (entspricht  $10^{-2}$  ‰ (v/v) Restalkohol), 500 ng/ml (entspricht  $5 \times 10^{-3}$  ‰ (v/v) Restalkohol), 250 ng/ml (entspricht  $2,5 \times 10^{-3}$  ‰ (v/v) Restalkohol) und 100 ng/ml (entspricht  $10^{-4}$  ‰ (v/v) Restalkohol).

### 17 β-Östradiol

Stammlösung 10 mg/ml in EtOH, Lagerung bei 4°C. Die getesteten Konzentrationen waren 10 ng/ml, 5 ng/ml, 1 ng/ml (sowie 0,5 ng/ml). Die maximale Ethanolkonzentration lag damit bei  $10^{-3}$  ‰ (v/v).

### Cadmiumchlorid

Stammlösung in dH<sub>2</sub>O, Lagerung bei 4°C. Getestet wurden die Konzentrationen 100 µM, 10 µM, 1 µM und 100 nM.

Pflanzenextrakt (Patentnummer QMH 5566) in Ethanol, 1:100 Sammlösung (entspricht 3,3 mg Feuchtgewicht/ml)

In den Assay wurde der Pflanzenextrakt in den Verdünnungsstufen  $10^{-4}$  (33 µg/ml, entspricht 1 ‰ (v/v) Restalkohol);  $10^{-5}$  (3,3 µg/ml, entspricht  $10^{-1}$  ‰ (v/v) Restalkohol) und  $10^{-6}$  (330 ng/ml, entspricht  $10^{-2}$  ‰ (v/v) Restalkohol) in PBS eingesetzt

## **3.2 Phagozyten**

### 3.2.1 Gewinnung primärer Phagozyten

Das Blut wurde aus der Halsvene (*V. jugularis externa*) eines Schafes (Lehrstuhl für Tierernährung, TUM) entnommen. Alternativ konnten nach der Schlachtung eines Schafes mehrere Liter Blut durch Ausbluten des Tieres gewonnen werden, indem man es in Behältern auffing, die EDTA (2% (w/v)) und Dextran (1% (w/v)) enthielten. Zur Gewinnung von Phagozyten wurden verschiedene Reinigungsverfahren getestet.

Die Isolation von neutrophilen Granulozyten aus Vollblut erfolgte nach Carlson und Kaneko (1973). Dafür wurde das Blut bei 1000 g zentrifugiert, Plasma und *buffy coat* entfernt und die in der untersten Fraktion enthaltenen neutrophilen Granulozyten von Erythrozyten durch hypotone Lyse mit ddH<sub>2</sub>O getrennt. Nach 30 s wurde das Wasser mit 3,6 % (w/v)

Natriumchloridlösung wieder auf eine isotone Lösung eingestellt und die Zellen zweimal in PBS-Glc gewaschen. Die so erhaltenen Zellen konnten in Einfriermedium über mehrere Monate bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

Für die Dichtegradientenzentrifugation über einen Percoll-Gradienten wurde zunächst der Gradient mit kaltem Percoll in 50 ml Zentrifugenröhrchen hergestellt. Dazu legte man 20 ml 74 %iges Percoll vor und überschichtete es mit 15 ml 55 %igem Percoll, indem man es am oberen Rand leicht ineinander laufen ließ. Danach erwärmte man den Gradienten auf Raumtemperatur, überschichtete ihn mit 15 ml Blut und zentrifugierte sofort für 20 min bei 600 g. Die Interphase konnte nun abgesaugt und zweimal in PBS-Glc gewaschen werden. Bei einer Verunreinigung mit Erythrozyten erfolgte bei Bedarf eine hypotone Lyse mit 3,6 % (w/v) NaCl (siehe oben). Die Zellen wurden ebenfalls in Einfriermedium kryokonserviert.

Die Isolation von Monozyten fand durch die Zentrifugation über Histopaque statt. Hierzu wurde vorverdünntes Blut in Zentrifugenröhrchen auf Histopaque geschichtet und für 30 min bei 400 g zentrifugiert. Mononukleare Zellen bildeten eine scharf abgegrenzte Schicht in der Histopaque-Phase. Nach zweimaligem Waschen in PBS-Glc konnten auch diese kryokonserviert werden.

### 3.2.2 Zellkultur von permanenten Makrophagen und Mikrogliazellen

#### Makrophagen-Zelllinie NR8383

Die Zellen wurden in supplementiertem Ham's F12 Medium bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  Atmosphäre bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert und vor dem Test durch Abschaben geerntet. Sie konnten aber auch direkt nach dem Auftauen aus vorher abgezählten und aliquotierten Stammlösungen verwendet werden. Dazu sollten sie zunächst für 10 min in kaltem Medium auftauen und anschließend nach einem Mediumwechsel einige Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  regenerieren.

#### Mikroglia-Zelllinie BV-2

Die Zellen wurden in supplementiertem DMEM Medium bei  $27^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  Atmosphäre bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert und vor dem Test durch Abschaben geerntet.

Die Kryokonservierung aller Zellen erfolgte in DMSO-haltigem Einfriermedium. Dafür wurde der Zellrückstand nach einem Zentrifugationsschritt für 8 min bei 1000 rpm in Einfriermedium resuspendiert und sofort in Kryoröhrchen transferiert. Der Kühlvorgang

erfolgte in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox in definierter Geschwindigkeit (ca. 1°C pro min) zunächst bei -70°C. Nach ein bis zwei Tagen wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff auf -196°C überführt. In einzelnen Lagerungstests wurden die Zellen auch bei -20°C, -70°C und -80°C konserviert. Das Auftauen erfolgte in kaltem Medium für 10 min. Anschließend wurden die Zellen nach einem Zentrifugationsschritt in frisches, 37°C warmes Medium überführt.

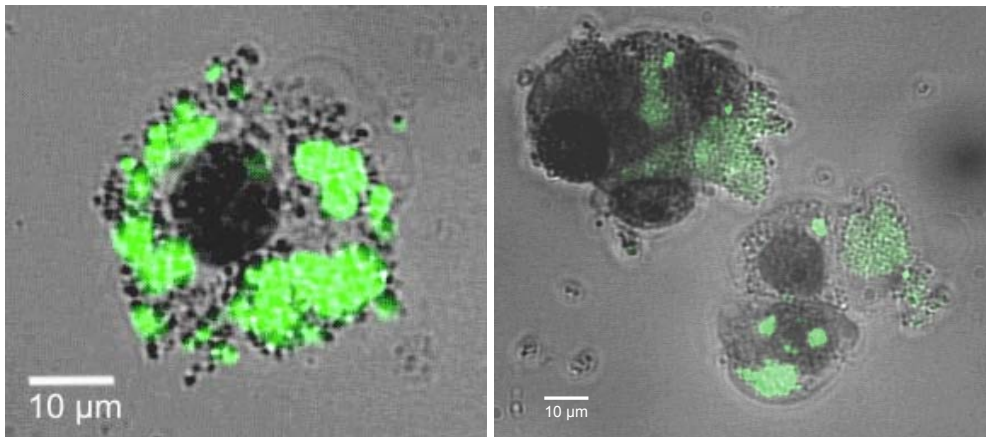
### **3.3 Anpassung der Zellzahl vor dem Test**

Zur Verwendung einer definierten Zellzahl in jedem Assay musste vor dem Test die Lebendzellzahl bestimmt werden. Dies geschah mithilfe einer Neubauer-Zählkammer. Die Zellsuspension wurde dazu mit Trypanblaulösung verdünnt (je nach Ausgangskonzentration, meist 1:10 – 1:100). Trypanblau dringt nur in tote Zellen ein und färbt diese blau, lebende Zellen bleiben ungefärbt. Im Mikroskop konnte nun sowohl die Gesamtzellzahl, als auch die Lebendzellzahl bestimmt werden. Es wurden 4 Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Das Volumen eines Großquadrats beträgt  $1 \times 10^{-4}$  ml. Die Konzentration (Anzahl der Zellen / ml) errechnet sich folgendermaßen:

$$\text{Anzahl Zellen/ml} = \text{Mittelwert gezählter Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

### **3.4 Phagozytose-Assay**

Der Phagozytose-Assay erfolgte mittels FITC-markierten Zymosanpartikeln. Durch die Aufnahme fluoreszierender Partikel konnte der Phagozytoseindex der Zellen bestimmt werden. Ein Teil der Versuche wurde mit opsonierten FITC-Zymosan Bioparticles® der Firma invitrogen durchgeführt und mikroskopisch ausgewertet. Für umfangreiche Versuche wurde das opsonierte FITC-Zymosan selbst hergestellt. Die eingesetzten Zellkonzentrationen betragen ca.  $1 \times 10^6$  pro ml. Von den FITC-Zymosan Bioparticles wurden ca. 5 – 20 Partikel pro Zelle zugegeben. Bei Versuchen mit selbst hergestellten Partikeln bestand der Reaktionsansatz zu 40 – 50 % aus FITC-Zymosan-Lösung.



**Abbildung 9** Zelllinie NR8383 mit phagozytierten FITC-Zymosan-Partikeln bei unterschiedlicher Vergrößerung

Die Auswertung erfolgte mit drei verschiedenen Methoden:

### 3.4.1 Mikroskopische Auswertung (Abb. 9)

Dazu wurden die Zellen nach einer Inkubation bei 37°C in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit FITC-Zymosan zentrifugiert (2 min, 2000 rpm), der Überstand verworfen und der Rückstand in 500 µl 4 %igem Formaldehyd für 30 min bei 37°C fixiert. Beim ersten Waschschrift in PBS wurde das Fluorochrom DAPI in einer Konzentration von ca. 1 µg/ml hinzugeführt, um die Kerne anzufärben. Zwei weitere Waschschrift jeweils nach 2 min Inkubationszeit entfernten das überschüssige DAPI sowie Reste des Fixans. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand bis auf ca. 20 µl entfernt, der Rückstand im verbleibenden PBS gelöst und auf einen Objektträger überführt. Zusammen mit einem Tropfen Vectashield Mounting Medium wurde ein Deckglas auf die Zellen gegeben, dann wurden die Zellen mit Klarlack versiegelt. Die Präparate waren bei 4°C mehrere Monate haltbar.

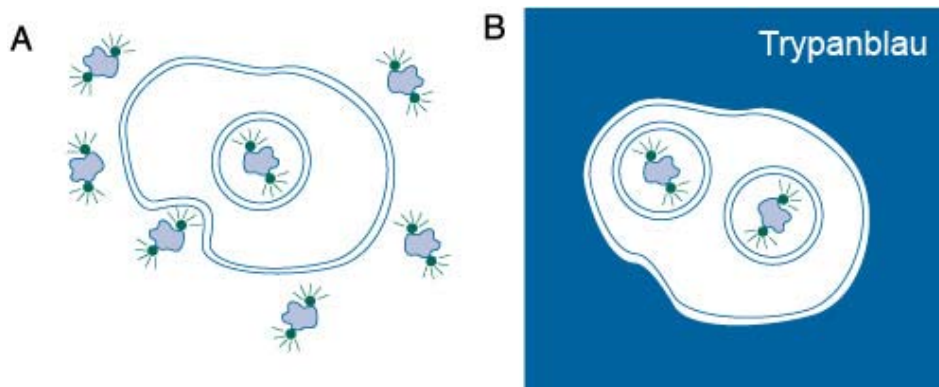
Ausgewertet wurde mithilfe des Fluoreszenzmikroskops, wobei mindestens 300 Zellen pro Objektträger ausgezählt wurden. Dabei wurde der prozentuale Anteil an phagozytierenden Zellen und die Anzahl der phagozytierten FITC-Zymosan Partikel pro Zelle ermittelt.

### 3.4.2 Auswertung in Mikrotiterplatten

Pro Kavität einer transparenten Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten wurden  $2,5 \times 10^5$  Zellen in 125 µl Medium pipettiert (mindestens  $1 \times 10^5$  Zellen für Proportionalität zur Signalstärke). Hinzu kamen 25 µl der zu testenden Substanz und 100 µl selbst hergestelltes opsoniertes FITC-Zymosan. Die Platte war bei 37°C für 30 min zu inkubieren. Anschließend stellte man die Platte zum Stoppen der Phagozytose auf Eis und gab 80 µl einer 0,4 %igen

Trypanblaulösung zum *Quenchen* der extrazellulären Fluoreszenz hinzu (Abb.10). Ein Zentrifugationsschritt der Platte bei 4°C für 2 min bei 2000 rpm führte dazu, dass alle Zellen am Boden jeder Kavität gesammelt waren, so konnte die Fluoreszenz bei einer Anregung von 485 nm und 535 nm Emission im Tecan Spectra Fluor Plus Reader gemessen werden. Die relative Fluoreszenzintensität (RFU) nach ca. 15 min *quenching* entsprach der Menge phagozytierter Partikel. Alternativ wurden auch fixierte Zellen aus Reaktionsgefäßen in die Kavitäten überführt und nach Trypanblauzugabe und Zentrifugation vermessen.

Als Referenz diente eine Kavität mit gleicher Menge an FITC-Zymosan-Lösung, jedoch ohne Zellen. Der Fluoreszenzwert der „gequenchten“ FITC-Zymosan-Lösung diente als Maß für die Hintergrundfluoreszenz und wurde von allen Ergebnissen subtrahiert.



**Abbildung 10** Quenching der extrazellulären Fluoreszenz mittels Trypanblau (Bild von Invitrogen)

### 3.4.3 Auswertung mittels FACS

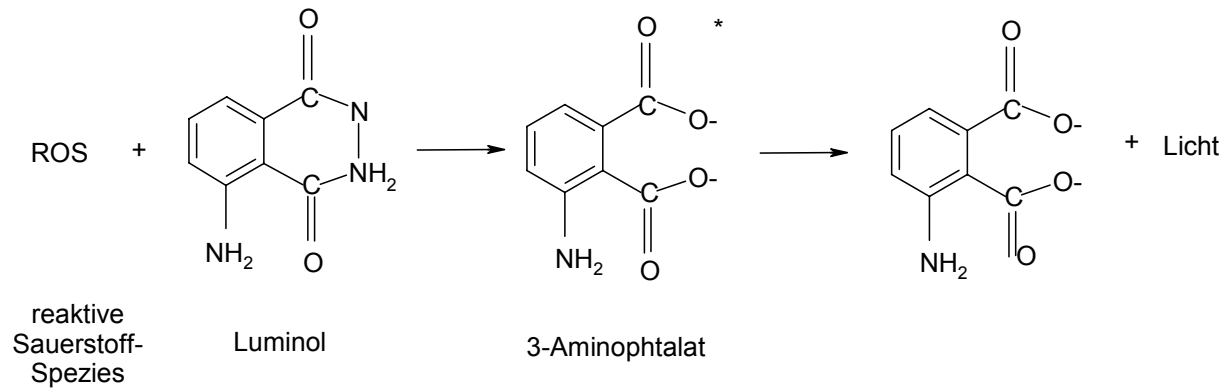
Die Formaldehyd-fixierten Zellen aus dem Parabelflug-Experiment wurden zusätzlich am Lehrstuhl für Biofunktionalität der Lebensmittel am WZW einer FACS-Analyse unterzogen. Hierzu wusch man die Zellen mit PBS und quenchte mit 0,1 % (w/v) Trypanblau. Es erfolgen zwei weitere Waschschrte. Für eine DNA-Färbung diente Propidiumjodid (PI). Nach 10 min Inkubation mit PI-Lösung startete die FACS-Messung. Dazu wurde der Live-Gate auf Zellen mit diploidem DNA-Gehalt gesetzt und 10.000 bis 15.000 Zellen vermessen.

## 3.5 Bioassays zum Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies

Zum Nachweis unterschiedlicher Sauerstoffradikale eignen sich unterschiedliche Detektionssysteme. In dieser Arbeit kamen drei unterschiedliche Assays zur Anwendung.

### 3.5.1 Luminol-Assay

Luminol wird von verschiedenen Radikalen oxidiert (Abb.11). Da es membranpermeabel ist können damit intra- sowie extrazellulär vorkommende Radikale detektiert werden.



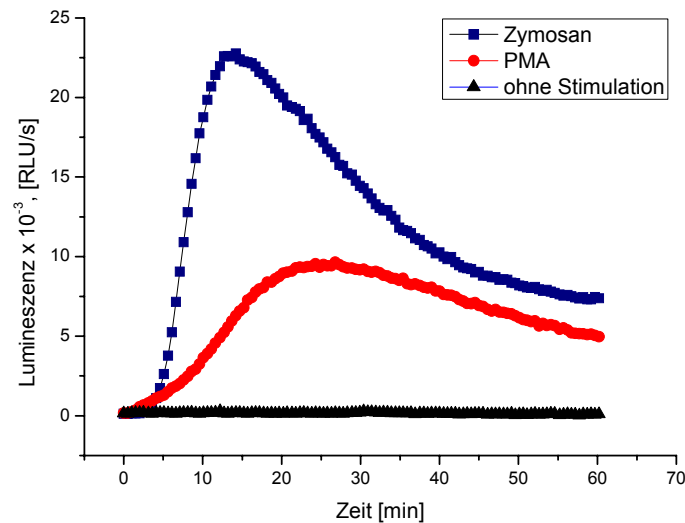
**Abbildung 11** Luminolreaktion

Der Luminolassay wurde nach Allen (1986) leicht modifiziert.

Die kryokonservierten Zellen können nach raschem Auftauen direkt in vorgelegten PBS-Glc-Puffer in die einzelnen Kavitäten einer weißen 96er Lumineszenzplatte überführt werden. Es sollten ca.  $5 \times 10^5$  neutrophile Granulozyten eingesetzt werden. Alternativ werden die Zellen frisch aus der Zellkultur entnommen und im Medium in die Platte gegeben. Von der Makrophagen-Zelllinie NR8383 wurden ca.  $7 \times 10^4$  eingesetzt. Hinzu gab man 1mM Luminollösung, 1 : 10 verdünnt in Boratpuffer (pH 9) und kurz vor der Messung Serumopsonisiertes Zymosan. Alternativ konnte der *oxidative burst* auch unabhängig von der Phagozytose ausgelöst werden, indem man direkt mittels Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) die Aktivierung der NADPH-Oxidase stimulierte. Hiermit ermittelte man die Kapazität der Zellen zum *oxidative burst*. Die Lumineszenzmessung in den Mikrotiterplatten erfolgte in einem SpectraFluor Plus Reader von Tecan in ca. 1 min Abständen über einen Zeitraum von 1 bis 2 h bei 37°C.

Es wurden jeweils Vierfachbestimmungen durchgeführt. Ein Reaktionsansatz bestand aus 300 µl Gesamtvolumen, zusammengesetzt aus den Zellen in Zellkulturmedium oder alternativ in PBS-Glc, 10 µl HRP (16 U/ml), 30 µl der zu testenden Substanz und 50 µl Luminol. Die Zymosan- bzw. PMA-Zugabe (70 bzw. 50 µl) erfolgte kurz vor dem Start der Messung. Abbildung 12 zeigt ein Beispiel einer typischen Luminol-Kinetik der Zelllinie NR8383.





**Abbildung 12** Luminolreaktion der Zelllinie NR8383 nach Stimulation mit Zymosan bzw. PMA; pro Messpunkt ist der Mittelwert aus vier Wiederholungen aufgetragen (SD<10%)

Für die Auswertung der Kinetiken mit Origin 7.5 wurde jede Einzelkurve angepasst (*curve-fitting* an eine „pulse“- bzw. „log-normal“-Funktionsgleichung) und mithilfe der erhaltenen Funktion verschiedene Parameter zur Charakterisierung und Quantifizierung des *oxidative burst* bestimmt:

- Die Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC) durch Integration der Funktionsgleichung, diese entspricht der Totalproduktion an reaktiven Sauerstoffspezies.
- Die maximale *peak*-Höhe (in relativen Lumineszenzeinheiten RLU), sie zeigt die maximal vorhandene Radikalkonzentration an.
- Die Zeit bis zum Peak (in min) gibt Auskunft darüber, in welcher Zeit die maximale Konzentration nach Stimulation der Zellen erreicht ist.
- Die maximale Steigung der Kurve (in RLU/min) gibt einen relativen Wert zum Anstieg der Radikalkonzentration. Sie errechnet sich durch Differenzieren der Funktionsgleichung.
- Die *lag-time* beschreibt die Reaktionszeit der Zellen. Als *lag-time* wurde die Dauer ermittelt von der Zugabe des Stimulans (PMA bzw. Zymosan, d.h. vom Start der Messung) bis zu einer Steigung von 100 RLU/min.

### 3.5.2 NBT-Assay

Diese Variante wurde an semiadherente Zellen nach Sierra *et al.* (2005) adaptiert.

NBT dient in erster Linie zum Nachweis von Superoxid. Da es direkt an Zymosan gekoppelt von der Zelle aufgenommen wird, kann damit der Anteil an intrazellulär produziertem Superoxid gemessen werden. Doch auch in Lösung kann es oxidiert werden, und fällt dann in der Zelle als Formazan aus.

Zu 150 µl NBT-Zymosan bzw. NBT-PBS wurden 100 µl Medium mit  $2,5 \times 10^5$  Zellen gegeben, vorsichtig gemischt und in der Regel für 60 min bei 37° C inkubiert. Bei Wirkungstests kamen 25 µl Testsubstanz und 125 µl Zellen zum Einsatz.

Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 2000 rpm für 2 min. Der Rückstand wurde in 500 µl 70 %igem Methanol fixiert und erneut zentrifugiert. Der Zellrückstand mit dem entstandenen blauen Formazan, das durch die Produktion von intrazellulären  $O_2^-$  herrührt, wurde zunächst vorsichtig in 120 µl 2 M KOH lysiert und schließlich mit 140 µl DMSO ein Farbumschlag nach blau hervorgerufen. Nach Überführen des Ansatzes in eine Mikrotiterplatte erfolgte die Absorptionsmessung bei 630 nm im ELISA-Reader Tecan Sunrise. Als Leerwert diente eine Mischung aus 120 µl 2 M KOH und 140 µl DMSO. Dieser Wert wurde von allen Ergebnissen abgezogen. Zur Überprüfung der „Grundstimulation“ der Zellen dienten nicht phagozytierende Zellen. Hierzu wurde anstelle von NBT-Zymosan NBT-PBS zugegeben.

### 3.5.3 OxyBurst®

OxyBURST® kann nicht von den Zellen aufgenommen werden und dient ausschließlich zum Nachweis von extrazellulär produzierten Radikalen.

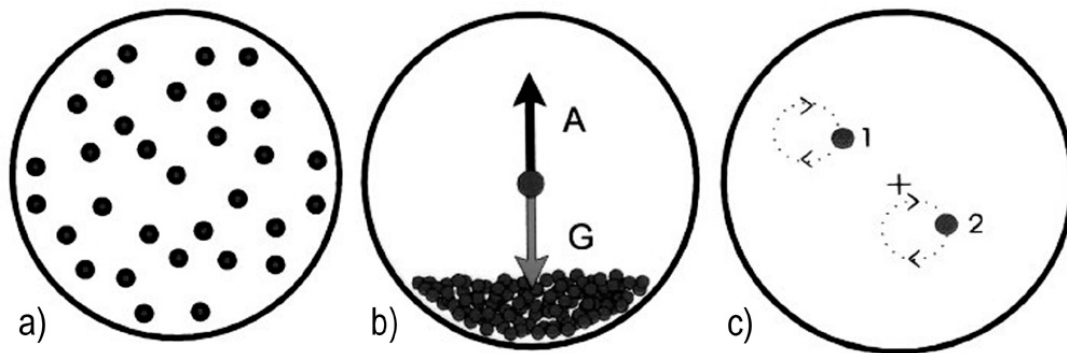
OxyBURST® ist in der Konzentration 1 mg/ml gelöst in PBS ca. 2 Wochen bei 4°C haltbar. Je 200 µl KRG-Lösung oder Zellkulturmedium mit  $2 - 5,0 \times 10^5$  Zellen wurden in durchsichtige 96 well Mikrotiterplatten pipettiert. Hinzu kamen 3 µl OxyBURST® Assay Reagents und 30 µl der zu testenden Substanz. 70 µl opsoniertes Zymosan starteten die Reaktion. Danach maß man umgehend die Fluoreszenz in 100 Zyklen bei einer Temperatur von 37° C im Spectra Fluor Plus. Die Anregungswellenlänge betrug 485 nm und die Emissionswellenlänge 535 nm. Da das Fluoreszenzsignal über die Zeit akkumuliert, wurde als Messwert die relative Fluoreszenzintensität (RFU) nach einem definierten Zeitraum der Phagozytose ermittelt (in der Regel 1h).

## 3.6 Simulation von Schwerelosigkeit

Auf der Erde herrscht konstant ein Gravitations-Stimulus von  $1g$ , dies entspricht  $9,81 \text{ m x s}^{-2}$ . Es gibt verschiedene experimentelle Ansätze zur Modifizierung der Erdbeschleunigung, um deren Einfluss auf biologische Systeme zu untersuchen. Drei unterschiedliche wurden in dieser Arbeit verwendet.

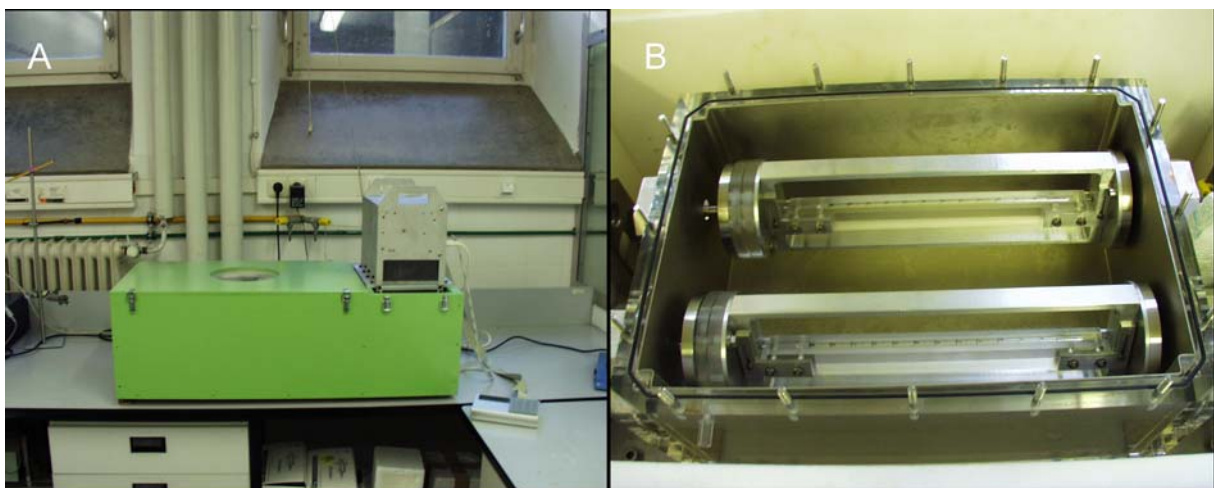
### 3.6.1 Schnelldrehender 2D-Küvettenklinostat

Ein Gerät zur Rotation z. B. einer Probenkammer senkrecht zum Schwerevektor mit konstantem Neigungswinkel nennt man Klinostat. Klassische Klinostaten rotieren mit  $1 - 2 \text{ rpm}$ . Zur Untersuchung des Gravitropismus z. B. bei Pflanzen ist diese Geschwindigkeit ausreichend, da Pflanzen relativ langsam auf Änderungen des Schwerevektors reagieren (Pfeffer 1897; Davenport 1908). Für schneller reagierende Systeme wurden schnell drehende Klinostaten entwickelt ( $40 - 100 \text{ rpm}$ ), da sie bessere Mikrogravitationsbedingungen simulieren können. Das Prinzip ist in Abbildung 13 dargestellt. Fehlende Schwerkraft führt zu einer homogenen Verteilung von Partikeln in Suspension, da keine Sedimentation stattfindet (Abb. 13a). Unter  $1g$  Bedingungen (Abb. 13b) sedimentieren Partikel mit einer höheren Dichte als ihr umgebendes Medium. Ihre räumliche Position ergibt sich aus ihrem Gewicht ( $G$ ) und dem Auftrieb ( $A$ ). Eine homogene Verteilung der Partikel kann auch durch Rotation des Probengefäßes erzielt werden (Abb. 13c). Die Partikel folgen dabei einer zirkulären Bahn, dessen Radius umso kleiner ist, desto schneller die Rotation erfolgt und schließlich gegen Null geht. Gleichzeitig wird eine Zentrifugalkraft auf die Partikel induziert, die abhängig ist von der Geschwindigkeit der Rotation und dem Abstand der Partikel zur Rotationsachse. Dadurch kann die Rotationsgeschwindigkeit nicht unbegrenzt erhöht werden. Durch eine optimale Abstimmung der Rotationsgeschwindigkeit und dem Durchmesser des Probengefäßes kann die Bewegung der Partikel bis auf die Brownsche Molekularbewegung reduziert werden (Klaus *et al.* 1997). Die auf die rotierenden Partikel wirkende Corioliskraft erreicht dabei nur einen Wert von ca.  $2 \times 10^{-23}g$  und kann deshalb vernachlässigt werden (Häder *et al.* 2005).



**Abbildung 13** Schematische Darstellung des Klinostat-Funktionsprinzips a) homogene Verteilung in Mikrogravitation; b) höhere Dichte der Zellen (G) führt trotz Auftrieb (A) zur Sedimentation bei 1g; c) durch Rotation der Zellen wird Mikrogravitation simuliert. (Hemmersbach *et al.* 2006)

Der in dieser Arbeit verwendete Küvettenklinostat besitzt zwei rotierende Achsen zur Anbringung von Pipetten als Probenbehältnisse. Es wurden sterile 1 ml Pipetten mit einem Durchmesser von 3 mm verwendet. Bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 60 rpm konnte somit eine Beschleunigung von  $1,2073 \times 10^{-2} g$  erzielt werden (berechnet D. Seibt, DLR nach Briegleb *et al.* 1971; Briegleb *et al.* 1973; Schatz *et al.* 1973; Briegleb 1983; Briegleb 1992). Abb. 14 zeigt den temperierbaren 2D-Küvettenklinostat, der uns freundlicherweise vom Biomedizinischen Wissenschafts-Unterstützungszentrum des DLR (PD Dr. Ruth Hemmersbach) zur Verfügung gestellt wurde.



**Abbildung 14** 2D-Küvettenklinostat, DLR A: Außenansicht mit temperierbarem Gehäuse; B: zwei Drehachsen in Mu-Metall-arniertem Gehäuse (um den Einfluss von Magnetfeldern zu vermeiden)

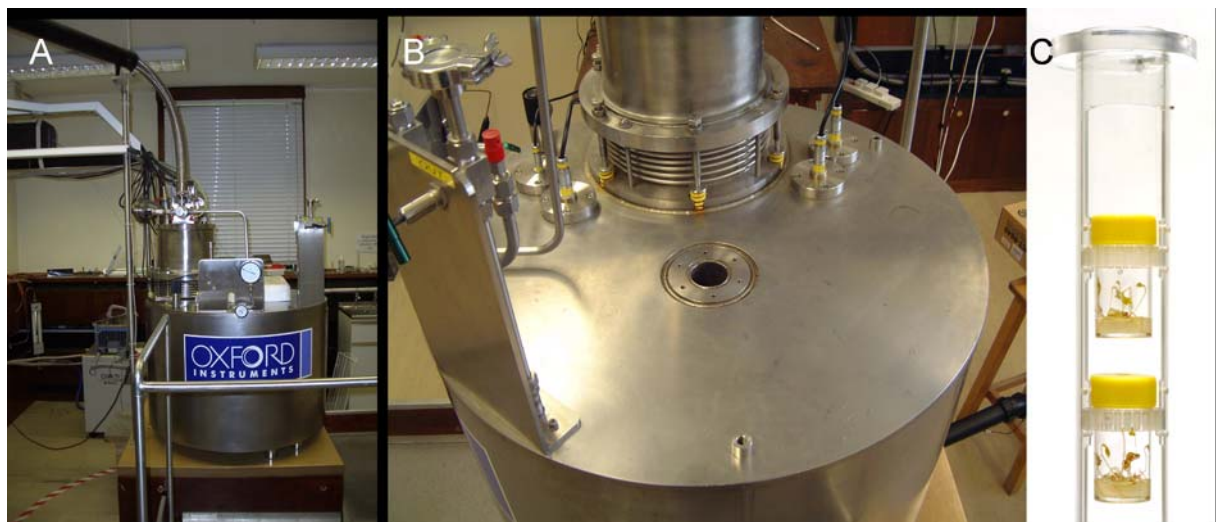
Die Pipetten waren mit 500  $\mu$ l befüllt und enthielten  $5 \times 10^5$  frisch geerntete Zellen. Jeweils 250  $\mu$ l davon wurde an NBT-Zymosan, NBT-PBS Lösung bzw. FITC-Zymosan (selbst hergestellt) zugegeben und die Zellen bei 37°C für 30, 60 und 90 min klinorotiert. Nach Ende der Inkubation und Stoppen der Rotation wurden sofort 10  $\mu$ l zur Bestimmung der Zellzahl

entnommen und die Zellen wie oben beschrieben weiter prozessiert. Die Bestimmung der Phagozytoserate erfolgte durch Auswertung in Mikrotiterplatten. Um keine Verfälschung der Ergebnisse durch variierende Zellzahlen zu erhalten (beispielsweise aufgrund von einigen adherierenden Zellen in den 1g-Kontrollen, die nicht aus den Pipetten entfernt werden konnten), wurden die erhaltenen Signale aus allen Experimenten mit den nach der Inkubation erhaltenen Zellkonzentrationen verrechnet und die Fluoreszenz (RFU) bzw. die Absorption pro  $1 \times 10^5$  Zellen bestimmt.

Die gleichen Experimente wurden auch in Zellkulturmedium durchgeführt, das mit 0,3 % Methylzellulose versetzt war, um die Sedimentation der Zellen unter dem Einfluss von Gravitation zu verhindern bzw. zu verlangsamen.

### 3.6.2 Magnetische Levitation

An der Nottingham University konnten vom 25. – 28. April 2006 in Kooperation mit Dr. Mike Davey (Plant Sciences Division, Nottingham) Versuche im supraleitfähigen Magneten durchgeführt werden. Abbildung 15 zeigt den Magneten der Firma Oxford Instruments, in dessen Mitte sich eine Bohrung befindet. Dort werden die biologischen Proben in einer speziell angefertigten Perspex Röhre an genau definierten Stellen im magnetischen Gradienten in Plastikbehältern positioniert. Es gibt drei Positionen für 0g, 1g und 2g.



**Abbildung 15** Der supraleitfähige Magnet von Oxford Instruments an der University of Nottingham (A); B: Bohrung in die die Probenbehälter in einer Perspex-Röhre (C) positioniert werden

Diamagnetische Stoffe wie alle organischen Proben lassen sich leicht magnetisieren, das heißt, sie haben die Eigenschaft, aus einem extern angelegten magnetischen Feld heraus zu wandern. Ihre magnetische Suszeptibilität  $\chi_m$ , also die Fähigkeit zur Magnetisierung in einem

externen Magnetfeld, ist  $< 0$  (negative Werte der magnetischen Suszeptibilität bedeuten eine Magnetisierung entgegen dem äußeren Magnetfeld).

Die aufwärts gerichtete magnetische Kraft ( $f_B$ ) auf ein Objekt im Magneten ist proportional

- zu deren Masse  $m$
- zur magnetischen Suszeptibilität des Objekts ( $\chi_p$ , also der Fähigkeit zur Magnetisierung in einem externen Magnetfeld)
- dem Gradienten des Magnetfelds ( $\Delta B$ , also der Änderung des Magnetfelds entlang der z-Achse)

$$f_B = m\chi_p B \frac{dB}{dz}$$

Für die Gravitationskraft gilt:

$$f_g = -mg$$

Demnach ist die in einem magnetischen Feld auf ein Objekt wirkende Kraft:

$$f_{total} = f_g + f_B = -m \left( g - \chi_p B \frac{dB}{dz} \right)$$

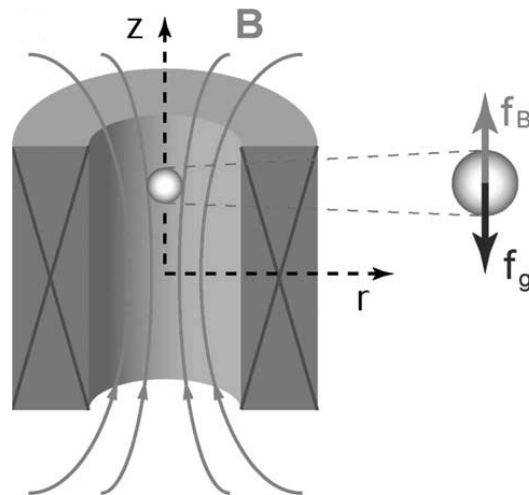
Das Prinzip der magnetischen Levitation geht davon aus, dass sich reines Material, wie beispielsweise ein Wassertropfen sich verhält, als wäre es einem veränderten Richtungsvektor ausgesetzt (Abb. 16) mit dem Betrag:

$$g_{mag} = g - \chi_p B \frac{dB}{dz}$$

Ist das magnetische Feld so eingerichtet, dass gilt:

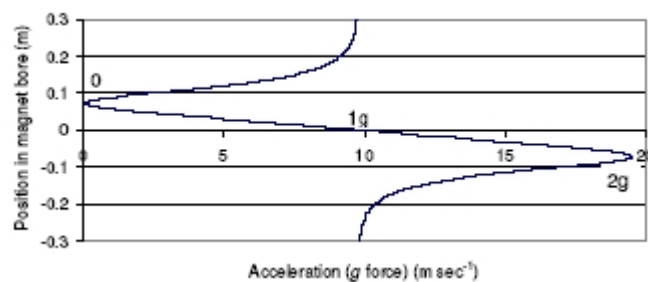
$$g_{mag} = 0 \quad \text{also} \quad B \frac{dB}{dz} = -g\chi_p = 1360 \frac{T^2}{m}$$

dann schwebt der Tropfen (Beaugnon und Tournier 1991; Valles *et al.* 2005)



**Abbildung 16** Schematische Darstellung eines Querschnitts durch eine Magnetbohrung mit den Magnetfeldlinien. Der Vektor der magnetischen Kraft hebt an einem bestimmten Punkt die Gravitationskraft auf. (aus Valles *et al.* 2005)

Durch das Anlegen eines magnetischen Gradienten (Abb. 17) können nun verschiedene Gravitationsbedingungen entlang der z-Achse innerhalb der Bohrung erzielt werden.

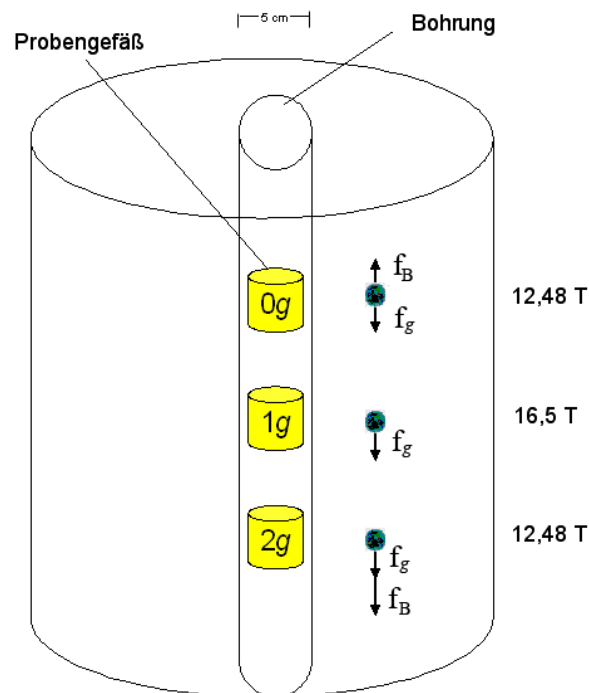


**Abbildung 17** Magnetischer Gradient entlang der z-Achse (aus Anthony *et al.* 2005)

An der 1g Position herrscht zwar ein starkes magnetisches Feld (16,5 T), jedoch kein magnetischer Gradient ( $\Delta B = 0$ ), und dadurch auch keine magnetische Kraft, die der Gravitationskraft entgegen wirkt. An dieser Position kann der Einfluss der Magnetfeldstärke auf die Probe überprüft werden.

An der 0g Position ist  $f_m$  gerade so groß, um die Gravitationskraft (1g) aufzuheben. Die Richtung der magnetischen Kraft kehrt sich an der 2g Position im Vergleich zur 0g Position um, so dass an dieser Stelle hyper-g Bedingungen herrschen. Die Magnetpositionen wurden auf die Suszeptibilität von Wasser abgestimmt, die der Suszeptibilität der Moleküle in Zellen sehr ähnlich ist. Valles *et al.* (1997) konnten zeigen, dass die verschiedenen Komponenten organischen Materials, in ihrem Fall die verschiedenen Fraktionen zentrifugierter Froschembryonen, in ihrer magnetischen Suszeptibilität nur wenig schwanken. Leichte Abweichungen in der Suszeptibilität der unterschiedlichen Moleküle, und der daraus

resultierenden magnetischen Kraft auf diese Moleküle werden durch thermische Zytoplasmakonvektionen in der Zelle relativiert. Abbildung 18 zeigt schematisch die Zusammensetzung der auf die Zellen wirkenden Kräfte an den verschiedenen Magnetpositionen.



**Abbildung 18** Schematische Darstellung der Magnetpositionen

Die Probengefäße im Magnet können temperiert werden. Hierzu strömt warme Luft durch die Bohrung über ein Polypropylenrohr, das mit einer Kupferspule in einem Wasserbad verbunden ist (Abb. 19). Die Temperatur in der Bohrung wird durch ein Thermoelement überwacht (HI 92704C, Hanna Instruments Inc., Ann Arbor, MI, USA), welches die Temperatursteuerung des Wasserbades und damit des Luftstroms durch die Bohrung reguliert. Die Temperatur an den einzelnen Probengefäßen wird ständig überwacht (Labwise software, Grant Instruments (Cambridge) Ltd., Royston, UK).

Die Versuche wurden mit der Zelllinie NR8383 durchgeführt. Da in Nottingham keine Zellkultur möglich war, wurden die Zellen in Weihenstephan kultiviert. Eine definierte Zellzahl in 1 ml Einfriermedium wurde für jedes einzelne Experiment (jede Wiederholung) kryokonserviert und vor Ort regeneriert. Hierzu tauten die Zellen in 30 ml Medium und für 10 min bei Raumtemperatur auf. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 1000 rpm wurden die Zellen in 37°C warmen, frischen Medium aufgenommen und nochmals für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Aufteilung der Zellen erfolgte auf vier 2ml-Reaktionsgefäße (0g, 1g, 2g Position sowie 1 g Kontrolle außerhalb des Magnetfeldes). Nach Zugabe von FITC-Zymosan Bioparticles® bzw. NBT-Zymosan erfolgte eine Inkubation für 1,5 h. Die Weiterverarbeitung



der Zellen wurde je nach Assay standardmäßig wie weiter oben beschrieben durchgeführt. Ausgewertet wurden die Phagozytosepräparate mikroskopisch.

Um die Sedimentation der Zellen unter dem Einfluss von Gravitation zu verhindern bzw. zu verlangsamen, wurden die gleichen Experimente auch in Zellkulturmedium durchgeführt, das mit 0,3 % Methylzellulose versetzt war.



**Abbildung 19** Temperierung des Magneten über Wasserbad

### 3.6.3 Parabelflug

Kurzzeitige Phasen von Mikrogravitation können während eines Parabelflugs erzielt werden. Die Firma Novespace, mit Sitz in Bordeaux, veranstaltet im Auftrag der Raumfahrtagenturen mehrmals pro Jahr eine Parabelflugkampagne mit ihrem eigens dafür umgebauten Airbus A300 (Abb. 20). In mehreren aufeinander folgenden Flugmanövern (in der Regel 31 pro Flugtag an insgesamt 3 Flugtagen) werden für jeweils 20 – 22 s reduzierte Schwerkraftbedingungen im Bereich von  $10^{-2} \times g$  erreicht. Die verschiedenen Phasen eines Parabelmanövers sind in Abb. 21 dargestellt. Aus dem normalen horizontalen Flug beginnt ein Steigflug bis zu einem Neigungswinkel von  $47^\circ$ , bei dem die 1,8fache Erdbeschleunigung auf das Flugzeug und die darin befindlichen Personen und Testobjekte wirkt. An diesem Punkt wird der Schub gedrosselt, und das Flugzeug folgt einer Wurfparabel. Währenddessen herrscht an Bord für 20 – 22 s Mikrogravitation. Bei einem erneuten Winkel von  $45^\circ$  im Sturzflug setzen die Turbinen ihre Leistung wieder ein und der Sturz wird abgefangen. Auch

während dieser so genannten *pull-out* Phase herrscht eine erhöhte Schwerkraft mit ca. 1,5 g. Zwei Parabelmanöver sind durch eine Pause von meist 2 min getrennt, in denen das Flugzeug in horizontaler Position fliegt. In Abbildung 21 sind die Phasen einer Parabel schematisch dargestellt.



Abbildung 20 Der A300 ZERO-G der Firma Novespace. Foto Novespace

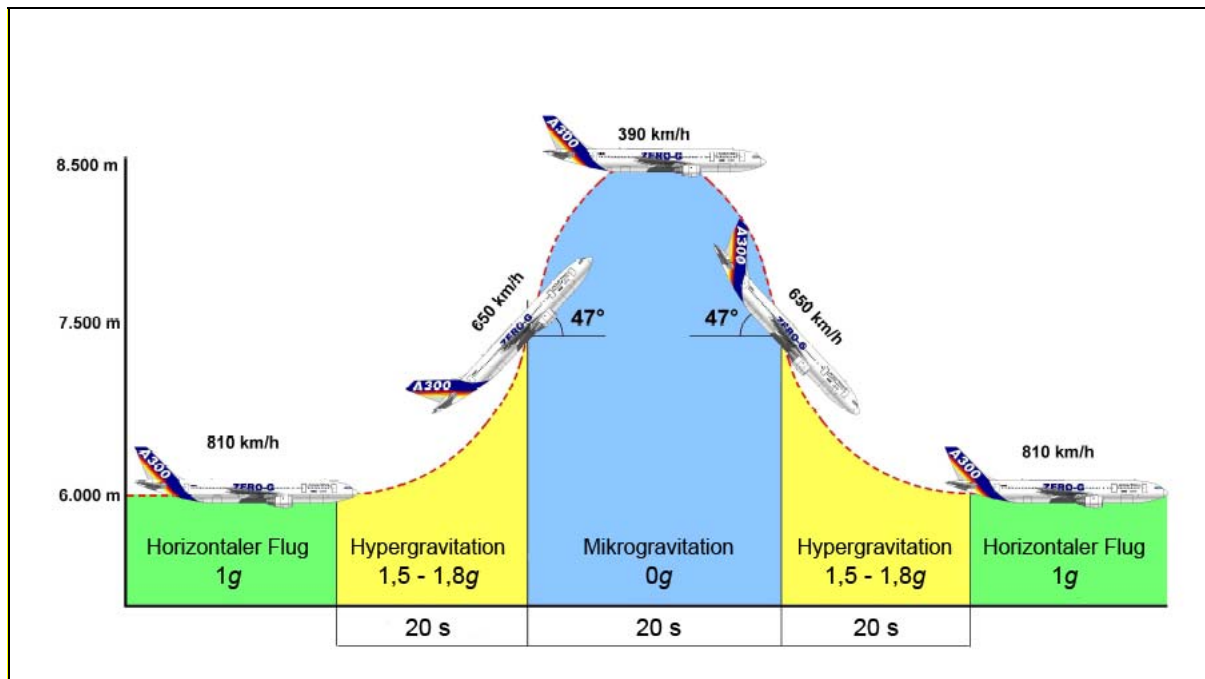
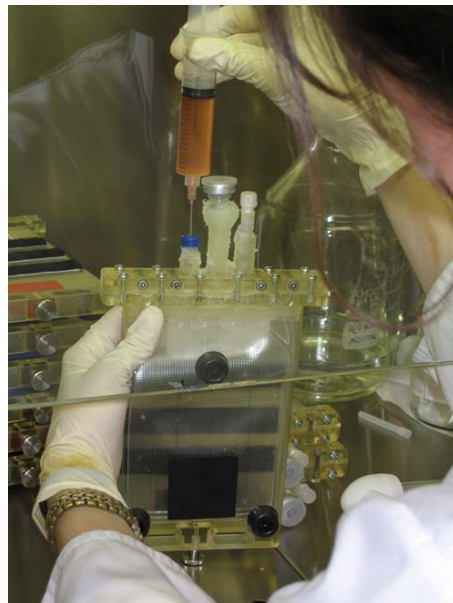


Abbildung 21 Ablauf eines Parabelflugmanövers. Bild ESA

Während der 9. DLR Parabelflugkampagne in Bordeaux wurde im Rahmen des PROCASIS Projekts mit Prof. Ullrich (Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg) ein Phagozytose-Experiment durchgeführt, bei dem NR8383-Zellen für 43 min über 15 Parabelmanöver hinweg mit selbst hergestelltem FITC-Zymosan stimuliert wurden. Die kurzen Expositionszeiten von 22 s sind zu kurz, um ausschließlich den 0g Effekt auf die Phagozytose zu untersuchen. Stattdessen sollte der Einfluss von alternierenden Gravitationsbedingungen auf die Phagozytose der Makrophagen im Vergleich zu 1g Bodenproben bestimmt werden. Dafür mussten die Zellen in Infusionsbeutel gefüllt werden ( $5 \times 10^6$  Zellen in 15 ml Medium), die in ein dichtes Plastikgehäuse eingefasst waren (Abb. 22), um ein Austreten von Flüssigkeiten während des Fluges zu verhindern. Vor Beginn der ersten Parabel wurden mit einer Nadel 5 ml FITC-Zymosan in die Beutel eingespritzt und nach der 15. Parabel die Zellen durch Einspritzen von 5 ml 18,5 % Formaldehyd fixiert. Dieser Vorgang wiederholte sich mit 3 Beuteln. Nach Abschluss der Flugmanöver und Ankunft in Bordeaux wurde in drei weiteren Zellkontainern dieselbe Prozedur mit exakt derselben Inkubationszeit von 43 min unter 1 g Bedingungen wiederholt. Ein sofortiger gekühlter Transport der Zellen nach München ermöglichte die Aufarbeitung der Proben am nächsten Morgen. Dafür wurden die Zellen zunächst mit PBS aus den Beuteln gespült. Die 6 Proben (3 Wiederholungen der Flug- und Bodenproben) wurden mikroskopisch, in Mikrotiterplatten sowie per FACS analysiert.



**Abbildung 22** Zellkontainer für Parabelflugexperimente

### 3.7 Statistik und Auswertung

Die Versuche erfolgten in mindestens drei Parallelen und in wenigstens zwei unabhängigen Wiederholungen. Im Ergebnisteil dieser Arbeit ist jeweils ein typisches Versuchsergebnis, stellvertretend für alle unabhängigen Versuche, dargestellt. Negativkontrollen ohne Stimulation der Zellen sind im Ergebnisteil in der Regel nicht gesondert aufgeführt, wenn sie kein außergewöhnliches Signal lieferten. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch die Bildung des arithmetischen Mittelwertes aus den Parallelen mit zugehörigem Standardfehler ( $\pm SE$ ;  $SE=SD/\sqrt{n}$ ), wobei SE dem Standardfehler, SD der Standardabweichung und n der Anzahl der Wiederholungen entspricht. Die Durchführung aller statistischen Analysen erfolgte mithilfe der Software Origin 7.5. Tests auf Normalverteilung wurden nach Shapiro-Wilk durchgeführt. Ausreißer wurden in Ausnahmefällen nach Grubbs ermittelt (Sachs 2004).

Die Mittelwerte aller Rohdaten mit zugehörigem Standardfehler finden sich zu allen Experimenten in Tabellenform. Zum Vergleich verschiedener Behandlungen gab eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) Auskunft über signifikante Unterschiede der Rohdaten. Anschließend wurde ein Mittelwertsvergleich nach Tukey durchgeführt. Bei Vergleichen von zwei Gruppen wie bei den Klinostatenversuchen wurde mit einem ungepaarten Student t-Test geprüft. Signifikanzniveaus sind:  $\alpha < 0,05$  (\*),  $\alpha < 0,01$  (\*\*) und  $\alpha < 0,001$  (\*\*\*). Dies bedeutet für die berechneten Unterschiede, dass sie mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 %, 99 % oder 99,9 % signifikant sind.

Für eine anschauliche graphische Darstellung wurden alle Datensätze normalisiert, wobei die Mittelwerte der nicht exponierten Kontrollen stets dem Wert 1 entsprachen. Sämtliche Einzeldaten wurden anschließend zu den Mittelwerten der Kontrollen ins Verhältnis gesetzt. Während der Klinostaten- und Magnetversuche konnten jeweils nur 2 Wiederholungen bei einem Einzelexperiment durchgeführt werden. Um Niveauverschiebungen der Wiederholungen zwischen den einzelnen Experimenten auszugleichen, wurden vor einem statistischen Vergleich jeweils die Einzelexperimente normalisiert. Der Mittelwert der 1g Kontrollen von je zwei Wiederholungen war dafür stets gleich 1.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Optimierung des TRIPLE-LUX Weltraumversuchs und Anpassung der Nachweissysteme

Im Rahmen des TRIPLE-LUX Experiments auf der internationalen Raumstation ISS soll der Einfluss von Schwerelosigkeit und kosmischer Strahlung auf Phagozyten untersucht werden. Dies geschieht mithilfe des auf der Oxidation von Luminol basierten Chemilumineszenzassays zum Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies. Für die Vorbereitung und Automatisierung des Weltraumversuchs und eine Standardisierung der Nachweissysteme mussten zunächst alle Einzelparameter angepasst werden.

#### 4.1.1 Auswahl der Zellen

##### – Primäre Zellen

Verschiedene Aufreinigungsverfahren zur Gewinnung primärer Phagozyten aus Schafblut wurden getestet. Die Aufreinigung über Histopaque lieferte eine Ausbeute von primären Monozyten im Bereich von  $1,25 \times 10^8$  Zellen/l. Mit der Dichtegradientenzentrifugation über Percoll war eine Ausbeute von rund  $7 \times 10^8$  Zellen/l zu erreichen (PMN). Die besten Ergebnisse lieferte die Isolation von PMN aus Vollblut nach Carlsson und Kaneko (1973). Die durchschnittlich gewonnene Anzahl an primären neutrophilen Granulozyten lag damit bei  $1,1 \times 10^9$  Zellen/l Blut.

Auffällig war, dass die Primärzellen in ihrem Verhalten sehr starke Schwankungen zeigten, wenn sie aus unterschiedlichen Individuen isoliert oder auch zu verschiedenen Zeitpunkten von ein und demselben Tier gewonnen wurden. Teilweise konnte keine ROS-Produktion ausgelöst werden, in anderen Fällen war sie zu schwach, um Unterschiede verschiedener Behandlungen im Luminoltest detektieren zu können. Häufig konnte der *oxidative burst* nur direkt mit PMA ausgelöst werden, nicht jedoch durch die Phagozytose von Zymosan.

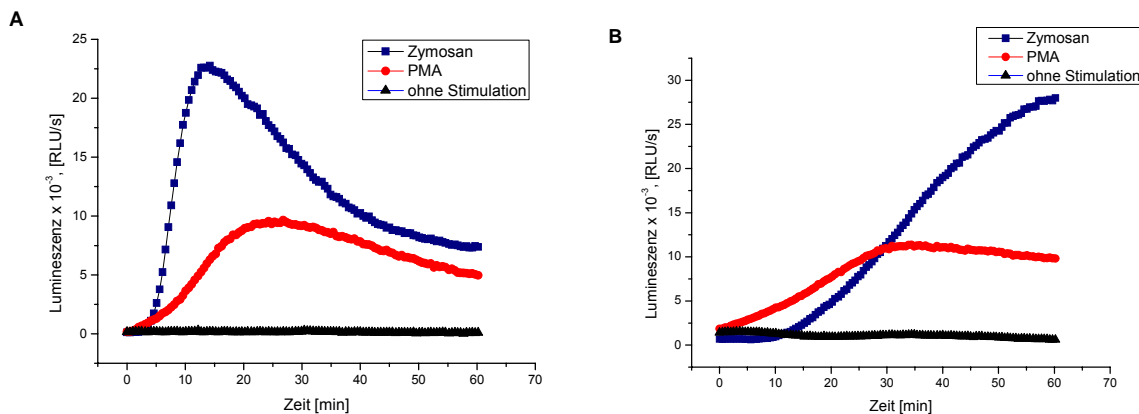
##### – Makrophagen-Zelllinien

Verschiedene murine und humane Makrophagen-Zelllinien wurden auf ihre Fähigkeit zum *oxidative burst* und dessen Nachweis im Luminoltest untersucht. Darunter waren zum Beispiel J774, P388, THP1 oder U937.

Als geeignete Zelllinie hat sich die Makrophagen-Zelllinie NR8383 aus *Rattus norvegicus* erwiesen. Sie entwickelte als einzige Zelllinie im Luminoltest ein ausreichend starkes Signal.

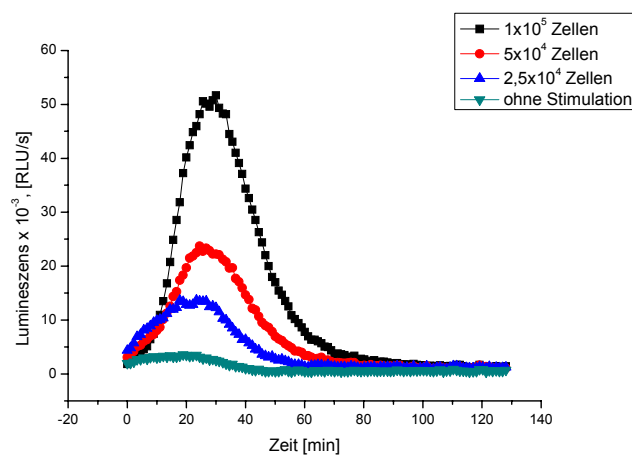
Die Mikroglia-Zelllinie BV-2 zeigte eine im NBT-Test nachweisbare ROS-Produktion.

Die semiadherente Zelllinie NR8383 produzierte unterschiedliche Luminolsignale, wenn sie auf unterschiedliche Weise aus der Zellkulturflasche geerntet wurde. Abbildung 23 zeigt den unterschiedlichen Verlauf der Radikalproduktion bei der Ernte durch Abschaben bzw. durch Trypsinierung. Durch die Trypsinierung kam es zu einer starken Verzögerung der Radikalproduktion bei der Phagozytose von Zymosan, weshalb auf diese Art der Zellgewinnung zukünftig verzichtet wurde.

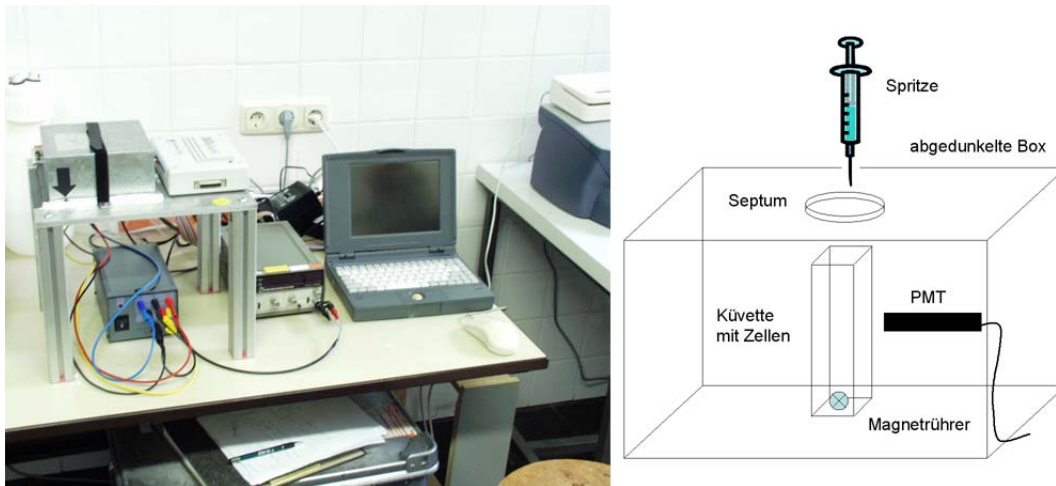


**Abbildung 23** Luminolreaktion der Zelllinie NR8383 nach Abschaben (A) bzw. nach Trypsinierung (B)

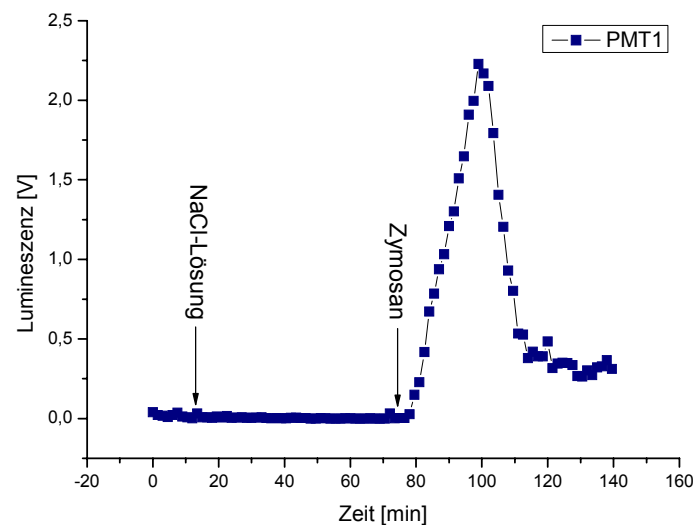
Ein weiterer wichtiger Punkt war die einzusetzende Zellzahl. Es stellte sich heraus, dass sich das Luminolsignal proportional zur eingesetzten Zellkonzentration verändert (Abb. 24, Tab. 12 im Anhang). Dies macht einen Vergleich normalisierter Ergebnisse zwischen unterschiedlichen Tests mit verschiedener Zellkonzentration möglich.



**Abbildung 24** Luminolreaktion der Zelllinie NR8383 bei Einsatz unterschiedlicher Zellkonzentrationen.



**Abbildung 25** Das „TRIPLE-LUX-breadboard“ (EADS Astrium GmbH) mit schematischer Darstellung der Messkammer. Im Inneren der abgedunkelten Box befindet sich die Messküvette, in der die Zellen mit einem Magnetprüfer bewegt werden. Ein *photomultiplier tube* (PMT) misst die erzeugte Lumineszenz nach Injektion der Lösungen über ein Septum.



**Abbildung 26** Lumineszenzmessung im "TRIPLE-LUX-breadboard" zum Test auf mechanischen Stress der Zellen. Das verwendete *photomultiplier tube* (PMT) liefert Lumineszenzwerte in Volt.

Um zu überprüfen, ob auch mechanischer Stress auf die Zellen eine ROS-Produktion auslösen kann, war ein Experiment im „TRIPLE-LUX-breadboard“ (Abb. 25) erforderlich. Mit dieser Testapparatur der Firma EADS Astrium GmbH erfolgten die Vorbereitungen für den Weltraumversuch und die Anpassungen der Einzelparameter. Während der Messung in einer Küvette wurden die Zellen mithilfe eines Magnetprüfers ständig leicht bewegt. Zusätzlich war es möglich, während der Messung mit einer Spritze die Testsubstanzen zu injizieren. So

konnte gezeigt werden, dass nur die Injektion von Zymosan nach wenigen Minuten einen *oxidative burst* auslöst, nicht jedoch der mechanische Stress durch das ständige Bewegen der Zellen oder die Verwirbelung beim Injizieren einer Kontrolllösung (physiologische NaCl-Lösung, Abb. 26).

#### 4.1.2 Kryokonservierung der Zellen

Für den Transport der Zellen zur und die Lagerung auf der ISS ist kein flüssiger Stickstoff vorhanden. Es sollte getestet werden, bei welcher Temperatur die Phagozyten mindestens 6 Monate überleben und ob während des Transports auch für einige Tage  $-20^{\circ}\text{C}$  ausreichend sind.

Die Kryokonservierung frisch gereinigter primärer PMN bei  $-70^{\circ}\text{C}$  war über mehrere Monate unproblematisch. Der Verlust an Zellen stieg mit zunehmender Lagerungszeit, lag aber mit einer Mortalitätsrate von ca. 40 % nach 6 Monaten im erträglichen Rahmen. Bei einer Lagertemperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  waren jedoch nach wenigen Tagen alle Zellen gestorben.

NR8383 Zellen wurden ebenfalls bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Während nach 6 Wochen noch genügend Zellen vital waren, um ein ausreichendes Luminolsignal zu erzeugen, lag die Mortalitätsrate nach 3 Monaten bereits bei über 80 %. Bei  $-80^{\circ}\text{C}$  hingegen war eine Lagerung für 6 Monate möglich. Die Vitalität der Zellen bei durchgehender  $-80^{\circ}\text{C}$ -Lagerung lag direkt nach dem Auftauen bei 66,7 % und war nach 3 h Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  mit 42 % immer noch in einem akzeptablen Bereich. Bei genügend hoher Zellkonzentration überlebten somit auch nach 6 Monaten Lagerung genügend viele Zellen für das TRIPLE-LUX-Experiment.

Die zwischenzeitliche Lagerung der Zellen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  zur Simulation des Transports führte jedoch bereits nach 6 Tagen zum Tod aller Zellen. Direkt nach dem Auftauen lag die Vitalität hier lediglich noch bei 5 %, nach 3 h waren alle Zellen gestorben.

Auch das Auftauen und Verdünnen der Zellen im BIOLAB soll automatisch vonstatten gehen. Hierfür wurden bei verschiedenen Temperaturen die Auftauzeiten sowie die Vitalitäten bestimmt, um den Auftauvorgang optimal zu programmieren und möglichst wenige Zellen durch das DMSO im Einfriermedium zu verlieren (Tab. 5). Das Auftauen bei Raumtemperatur erwies sich als am besten geeignet, da dabei die besten Vitalitätsraten erzielt werden konnten. Nach dem Auftauen blieb ein Zeitfenster von 2 – 3 min, in dem die Zellen abgesaugt und in einen Kulturbeutel mit der zehnfachen Menge an Medium überführt werden konnten.

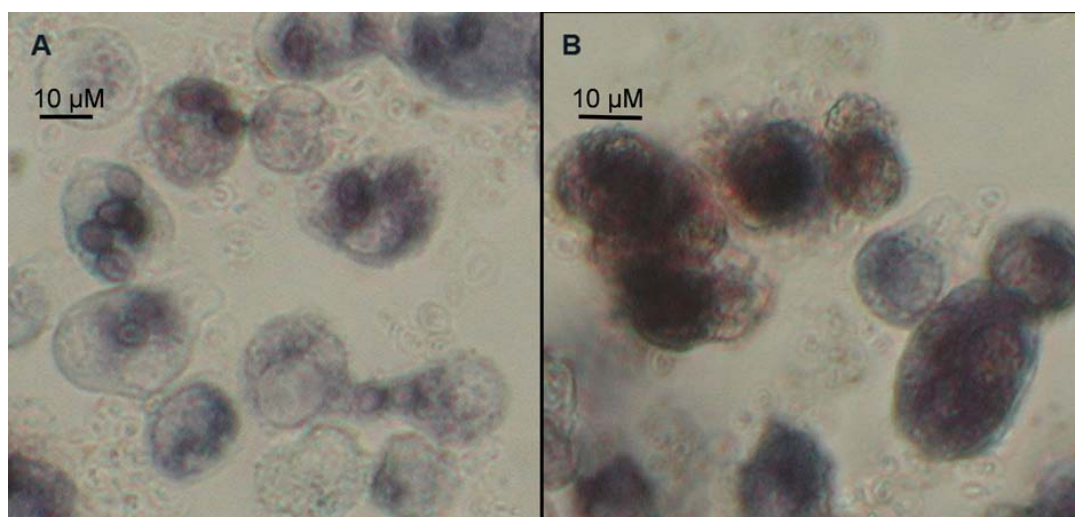


**Tabelle 5** Auftauzeiten und Vitalitäten kryokonservierter Zellen bei unterschiedlichen Temperaturen

12°C		22°C		37°C	
Zeit [min]	Mortalität [%]	Zeit [min]	Mortalität [%]	Zeit [min]	Mortalität [%]
23 (aufgetaut)	45	14 (aufgetaut)	0	1 (aufgetaut)	37,5
26	61,7	16	6	3	58
28	81,8	18	17,5	5	60
30	80,2	20	60,5	8	82,7
		22	56,8		

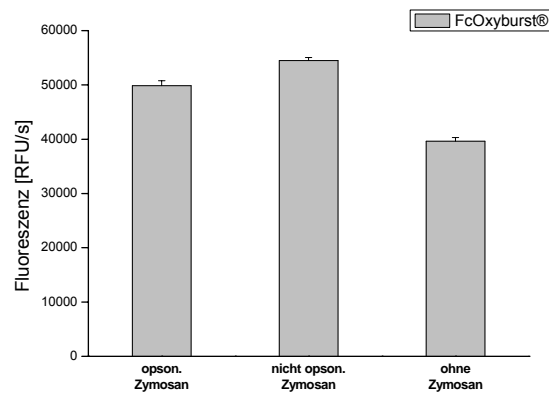
#### 4.1.3 Opsonierung von Zymosan

Ein Vergleich von Phagozytose und ROS-Produktion bei Stimulation mit Zymosan bzw. vorab mit Serum opsoniertem Zymosan zeigte einige Unterschiede auf. Bei PMN konnte nur mit opsoniertem Zymosan ein Luminolsignal ausgelöst werden. Die Makrophagen-Zelllinie NR8383 wies hingegen mit beiden Zusätzen ein gleich starkes Luminolsignal auf. Bei der Phagozytose von NBT-markiertem Zymosan zeigt sich in den Makrophagen bei mikroskopischer Betrachtung allerdings ein deutlicher Unterschied in der intrazellulären Radikalproduktion (Abb. 27). Die dunkle Färbung der Zymosanpartikel, die von der Oxidation des NBT zu dunkelblauem Formazan herrührt, ist nach vorheriger Opsonierung wesentlich stärker ausgeprägt.



**Abbildung 27** Makrophagen-Zelllinie NR8383 nach der Phagozytose von NBT-markiertem Zymosan. A: Nicht-opsoniertes Zymosan B: Serum-opsoniertes Zymosan

Betrachtet man die Produktion extrazellulärer ROS mit dem OxyBURST®-Reagenz (Abb. 28), ist diese jedoch stärker bei Kontakt mit nicht opsoniertem Zymosan. Da für die Untersuchungen dieser Arbeit die Phagozytose-vermittelte, intrazelluläre Radikalproduktion im Vordergrund stand, wurde bei allen Experimenten mit opsoniertem Zymosan gearbeitet.



**Abbildung 28** Extrazelluläre ROS-Produktion der Zelllinie NR8383 bei der Phagozytose von opsoniertem bzw. nicht opsoniertem Zymosan.

#### 4.1.4 Peroxidase

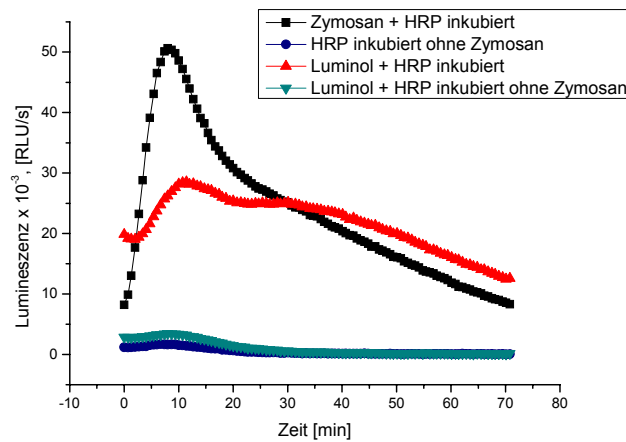
Die Luminolreaktion erfordert eine Hämkatalse, daher war der Zusatz von Meerrettichperoxidase (HRP) im Luminoltest unbedingt erforderlich. Da für den Weltraumversuch kein eigenes Behältnis zur Lagerung zur Verfügung steht, musste getestet werden, mit welchen Lösungen HRP bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden kann. Nach dem Auftauen der Lösung sieht der Ablauf vor, dass alle Reagenzien für 3 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert werden. Dies ergibt sich aus der Regenerationszeit der Zellen nach dem Auftauen, in der sie sich an die Schwerelosigkeit bzw. 1g auf der Referenzzentrifuge anpassen können. Nachdem ein Anhalten der Zentrifuge zum nachträglichen Zuführen von Reagenzien die Zellen wieder der Schwerelosigkeit aussetzen würde, müssen alle Lösungen für diesen Zeitraum von 3 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  ohne Funktionsverlust stabil bleiben.

Es gibt drei Möglichkeiten zur Lagerung von HRP:

- gemeinsam mit Zymosan
- gemeinsam mit Luminol
- gemeinsam mit den Zellen im „*measurement bag*“

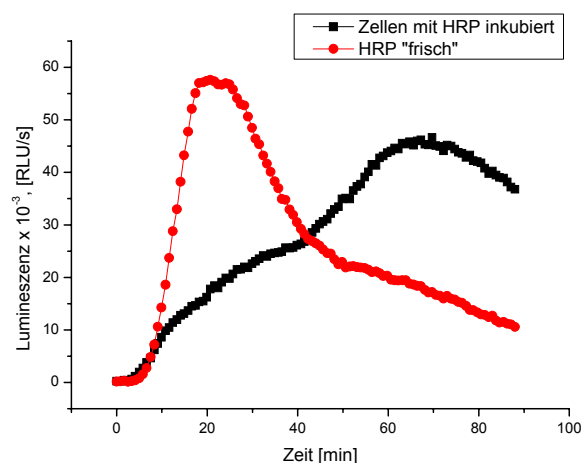
Nach einer gemeinsamen Lagerungszeit von 6 Monaten bei  $-20^{\circ}\text{C}$  wurden die ersten beiden Varianten getestet, indem die Lösungen nach dem Auftauen für 3 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert wurden, bevor unter Zugabe von Zellen die Phagozytose gestartet wurde. Für alle Tests war HRP zehnfach konzentriert eingesetzt im Vergleich zu Versuchen, bei denen das Enzym frisch verabreicht wurde. Während sich bei der Lagerung von HRP in Zymosan ein normales

Signal entwickelte, blieb das Signal des mit HRP gelagerten Luminols wesentlich schwächer (Abb. 29).



**Abbildung 29** HRP-Lagerungstest für 6 Monate

Das Behältnis (*measurement bag*), in dem die Zellen für 3 h inkubiert werden sollen, bevor die Messung durch die automatische Injektion von Luminol und Zyosan gestartet wird, enthält bereits 1 ml Medium, in dem HRP alternativ bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden könnte. In diesem Fall ist das Enzym in Kontakt mit den Zellen und wird erst nach 3 h aktiviert. Abbildung 30 zeigt, dass es bei gemeinsamer Inkubation der Zellen mit HRP zu einer Verzögerung der Luminolsignals kommt. Aus diesen Gründen wurde für das Weltraumexperiment die gemeinsame Lagerung mit Zyosan gewählt.



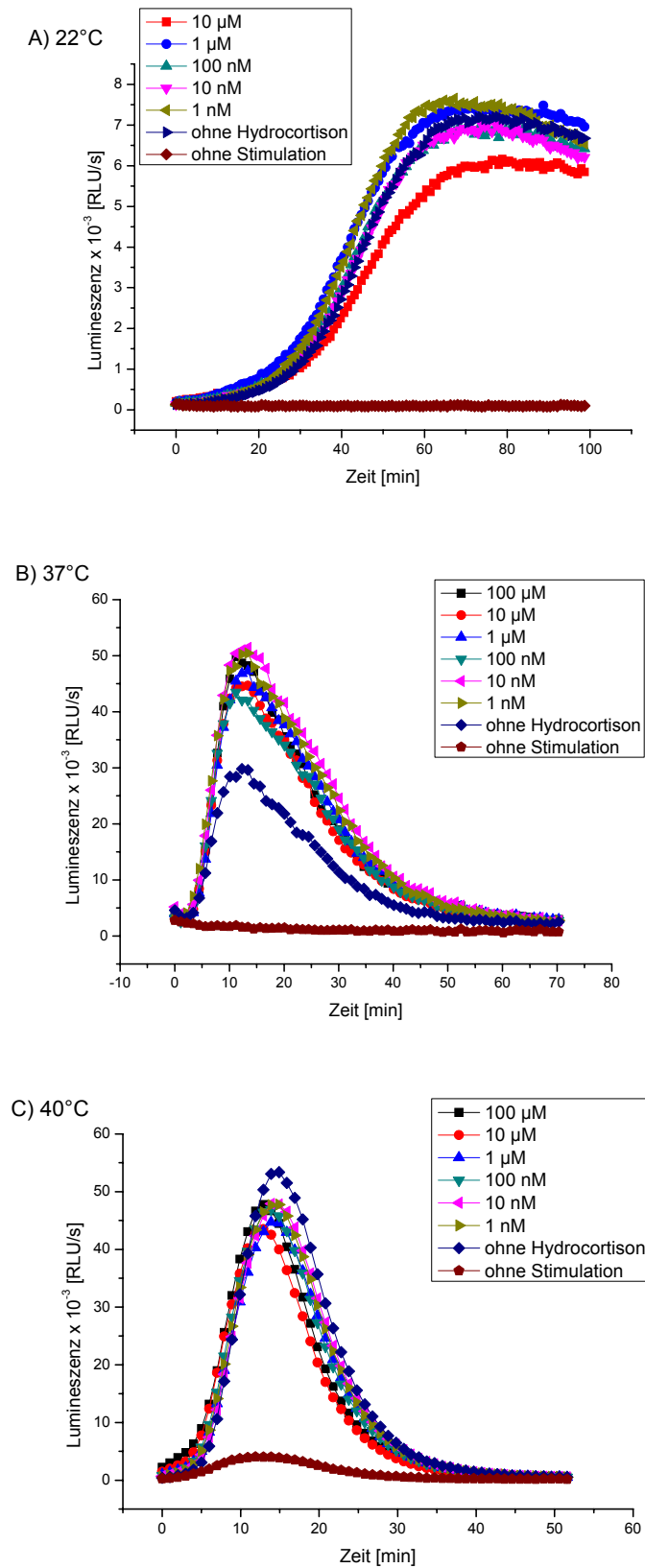
**Abbildung 30** Lagerung von HRP in "*measurement-bags*", Inkubation des Enzyms mit Zellen

#### 4.1.5 Temperaturtests

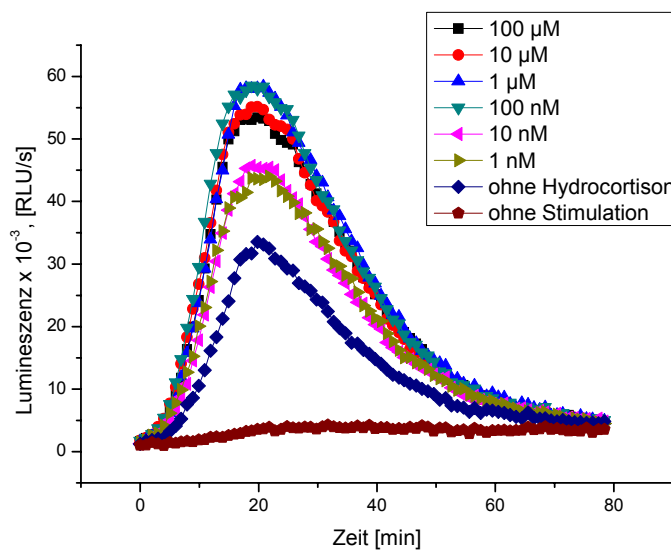
Bei Tests, in denen die Temperierung des Spectra-Fluor-Plus-Readers variiert wurde, stellte sich heraus, dass eine genaue Temperierung auf physiologische 37°C sehr wichtig für das Verhalten der Zellen ist. Abbildung 31 zeigt, dass beispielsweise die stimulierende Wirkung von Hydrocortison nicht mehr erkennbar ist und sich teilweise sogar in eine hemmende Wirkung umkehrt, wenn das physiologische Optimum verlassen wird und die Phagozytose bei 40°C oder bei Raumtemperatur stattfindet. Unterschiede der Signalstärke gehen auf eine verschieden hoch eingestellte Sensitivität des Messgerätes zurück.

#### 4.1.6 Verminderung der Sedimentation

Um für Versuche in Schwerelosigkeit eine bessere Vergleichbarkeit zwischen 0g Proben und 1g Kontrollen zu erzielen, wurden Medienzusätze getestet, mit denen die Sedimentation der Zellen verhindert werden sollte. Zunächst stellte sich Agarose als viel versprechendes Supplement dar, das die Zellen über mehrere Stunden vor dem Absinken bewahrte. Beim Phagozytostest mit Luminol fiel jedoch auf, dass auch ohne den Zusatz von Zymosan ein *oxidative burst* durch Agarose ausgelöst wurde. Die Zugabe von Methylzellulose ins Medium verhinderte ab einer Konzentration von 0,2 % ebenfalls ein Absinken der Zellen für mindestens eine Stunde (ermittelt durch mikroskopische Betrachtung und Zellkonzentrationsbestimmung vom Grund des Reaktionsgefäßes). Im Luminoltest konnte kein Einfluss von Methylzellulose auf die Phagozytose der Zellen nachgewiesen werden. Sie zeigten auch bei Zugabe von immunmodulierend wirkenden Substanzen die erwarteten, in Kapitel 4.2.2 beschriebenen Reaktionen, wie hier am Beispiel von Hydrocortison gezeigt ist (Abb. 32).



**Abbildung 31** Temperaturtest mit der Zelllinie NR8383. Die stimulierende Wirkung von Hydrocortison verändert sich stark und kehrt sich teilweise in eine Hemmung der Reaktion um, wenn das physiologische Optimum von 37°C nicht eingehalten wird. A: 22°C B: 37°C C: 40°C



**Abbildung 32** Luminolreaktion der Zelllinie NR8383 in mit 0,25 % Methylzellulose versetztem Medium unter Einfluss von Hydrocortison.

## 4.2 Immunsuppressive und immunstimulierende Einflüsse auf Phagozyten

Mit den optimierten Nachweissystemen wurde ein breites Spektrum an Substanzen auf ihre Wirkung getestet. Dabei sollte geprüft werden, ob sich der Luminoltest für einen automatisierten Einsatz als Bioassay eignet. Die so gesammelten Ergebnisse zu den verschiedenen Substanzen sind in diesem Kapitel dargestellt.

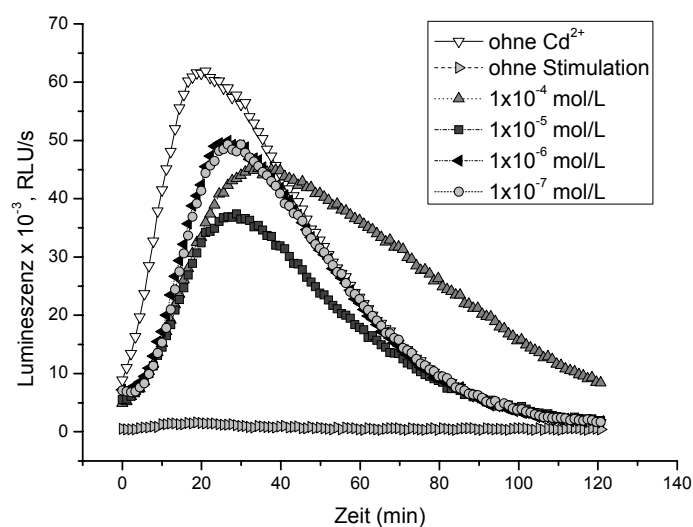
### 4.2.1 Neutrophile Granulozyten (PMN)

Die untersuchten PMN waren primäre Zellen, die aus Schafblut isoliert wurden. Getestet wurde die Wirkung des bekanntermaßen immunsuppressiv wirkenden Schwermetalls Cadmium sowie von Hydrocortison, einem entzündungshemmenden Steroidhormon. Die Intensität des *oxidative burst* wurde mithilfe der Oxidation von Luminol verfolgt. Die Ergebnisse der Untersuchungen mit PMN sind publiziert (Huber *et al.* 2005; Huber *et al.* 2006).

#### 4.2.1.1 Einfluss von Cadmium

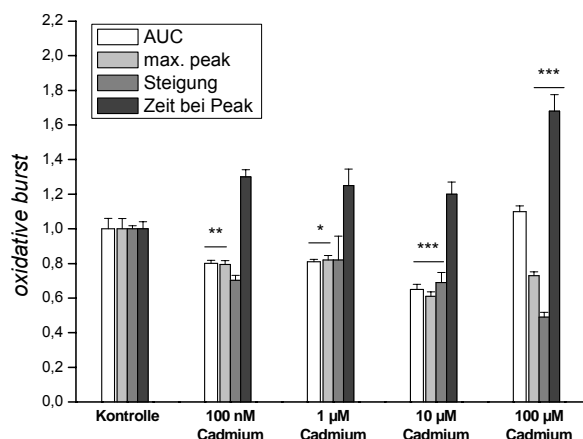
Die untersuchten Konzentrationen lagen zwischen  $1 \times 10^{-4}$  mol/l (100  $\mu$ M) bis  $1 \times 10^{-7}$  mol/l (100 nM) in Zehnerpotenz-Abständen. Abb. 33 zeigt die Kinetik der Luminolreaktion neutrophiler Granulozyten nach PMA-Stimulation unter Einfluss verschiedener

Cadmiumkonzentrationen. Deutlich ist ein veränderter Verlauf bei allen Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollkurve ohne Cadmium zu erkennen. Mit zunehmenden Konzentrationen wird das Signal schwächer, um dann mit der höchsten Konzentration ( $1 \times 10^{-4}$  mol/l) wieder anzusteigen. Bei der höchsten Konzentration fällt das Signal erst später und auch langsamer wieder ab. Der Kontrollansatz ohne PMA-Stimulation zeigt kein Signal. Die Daten der berechneten Einzelparameter befinden sich in Tabelle 13 im Anhang. Abbildung 34 stellt diese in normalisierter Form graphisch dar.



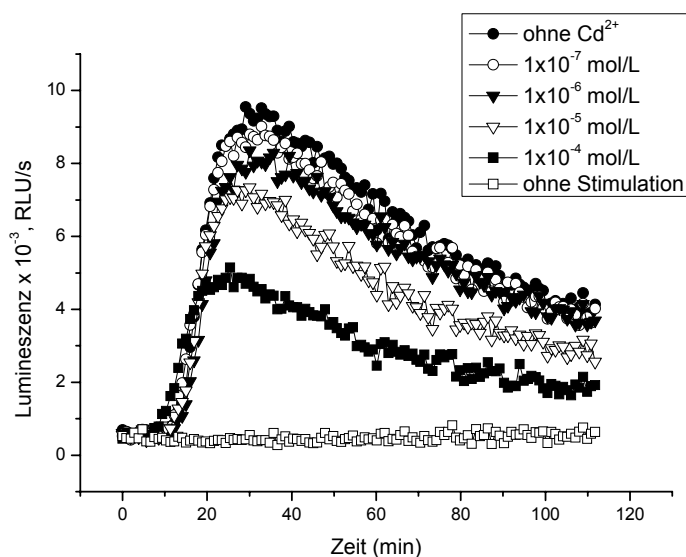
**Abbildung 33** Radikalbildung primärer neutrophiler Granulozyten nach PMA-Stimulation unter Einfluss von Cadmium (aus Huber *et al.* 2006).

Deutlich zeigt sich bei allen Konzentrationen ein hemmender Effekt auf den *oxidative burst* in Form einer Verminderung der AUC-Werte (außer bei einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$ ), sowie der maximalen *peak*-Höhe. Auch die maximale Steigung ist bei den beiden höchsten Konzentrationen vermindert. Die maximale *peak*-Höhe wird bei einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  signifikant später erreicht, die *lag*-Phase bleibt unverändert. Der stärkste Hemmeffekt konnte bei einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  beobachtet werden.



**Abbildung 34** Einfluss von Cadmium auf die ROS-Bildung bei PMN nach PMA-Stimulation, ermittelt im Luminoltest (normalisierte Werte).

Bei der Stimulation mit Zymosan, also dem Phagozytose-vermitteltem *oxidative burst*, verhält sich die Situation etwas anders. Abbildung 35 zeigt, dass das Signal mit zunehmenden Konzentrationen immer schwächer wird. Die höchste Konzentration (100 µM) weist auch den stärksten suppressiven Effekt auf. Ohne Zymosan findet keine Radikalproduktion statt.

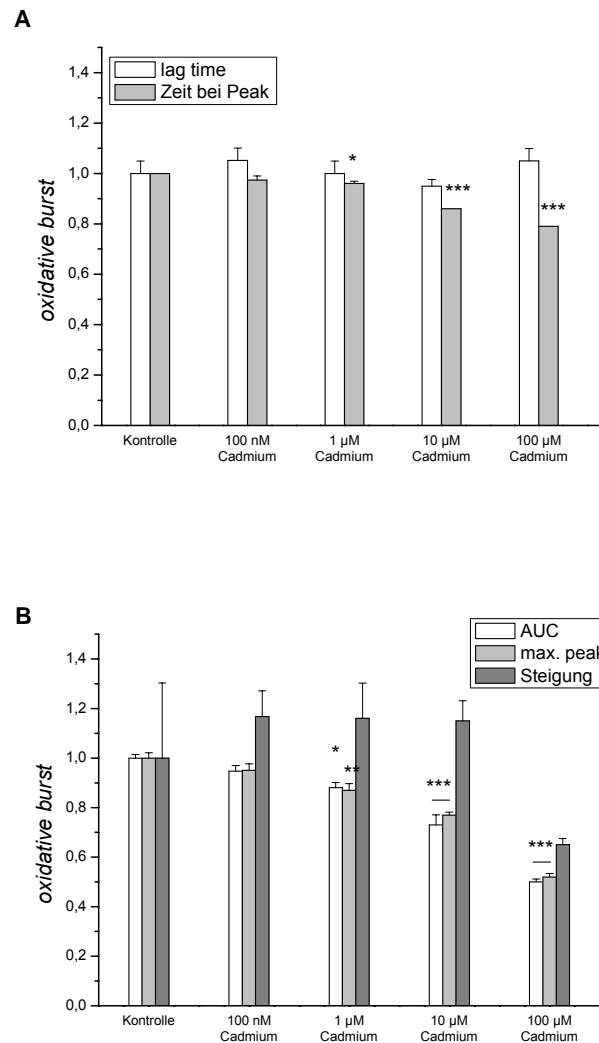


**Abbildung 35** Radikalbildung primärer neutrophiler Granulozyten nach Zymosan-Stimulation unter Einfluss von Cadmium (aus Huber *et al.* 2005).

Bei der Auswertung der Einzelkurven (Tab. 14 Anhang) lässt sich ab einer Cadmiumkonzentration von 10 µM eine signifikante Hemmung der Totalproduktion an



Sauerstoffradikalen (ermittelt über AUC und maximale *peak*-Höhe) nachweisen, welche mit zunehmenden Konzentrationen immer stärker wird. Die maximale *peak*-Höhe wird ebenfalls ab 10  $\mu\text{M}$  verspätet erreicht. Die *lag*-Phase sowie die maximale Steigung der Kurven zeigen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 36 A und B).

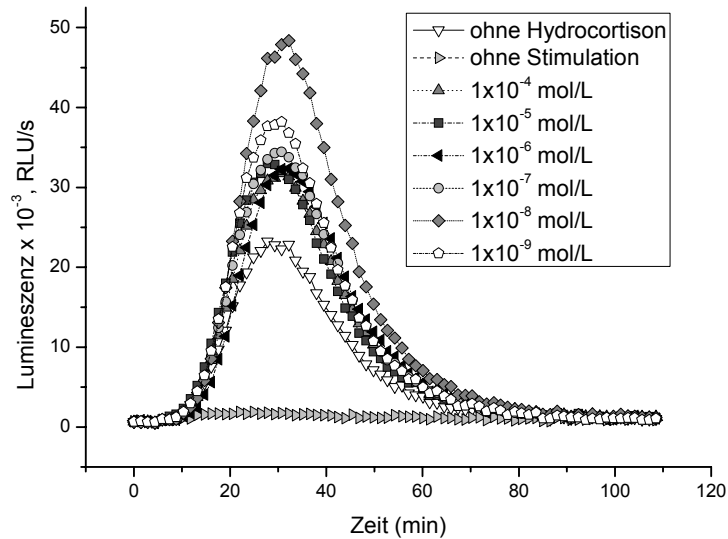


**Abbildung 36** Einfluss von Cadmium auf die ROS-Bildung bei PMN nach Zymosan-Stimulation, ermittelt im Luminoltest (normalisierte Werte).

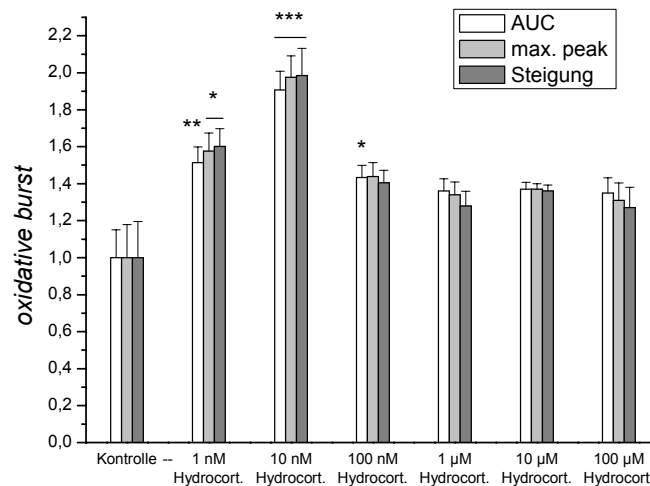
#### 4.2.1.2 Einfluss von Hydrocortison

Die getesteten Hydrocortisonkonzentrationen lagen zwischen  $1 \times 10^{-4}$  mol/l (100  $\mu\text{M}$ ) und  $1 \times 10^{-9}$  mol/l (1 mM) in Zehnerpotenzen. Abb. 37 stellt das Luminolsignal und damit den *oxidative burst* nach PMA-Stimulation dar. Es zeigt sich bei allen eingesetzten Konzentrationen eine Stimulation des *oxidative burst* im Vergleich zum Ansatz ohne

Hydrocortison. Das Maximum liegt bei einer Konzentration von  $1 \times 10^{-8}$  mol/l (10 nM). Ohne PMA lässt sich auch kein Signal feststellen. Tabelle 15 im Anhang zeigt die Einzeldaten. Sie lassen erkennen, dass die Stimulation nur in den niedrigen Konzentrationsbereichen (1 nM bis 100 nM) signifikant ist und AUC, die maximale *peak*-Höhe sowie die Steigung betrifft. Abb. 38 stellt die normalisierten Ergebnisse nochmals graphisch dar.

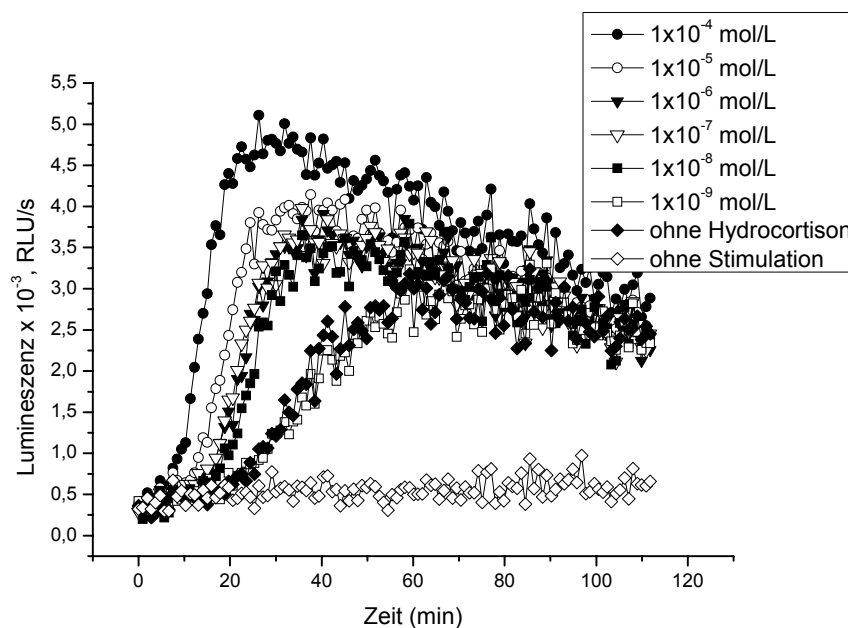


**Abbildung 37** Radikalbildung primärer neutrophiler Granulozyten nach PMA-Stimulation unter Einfluss von Hydrocortison (aus Huber *et al.* 2006).



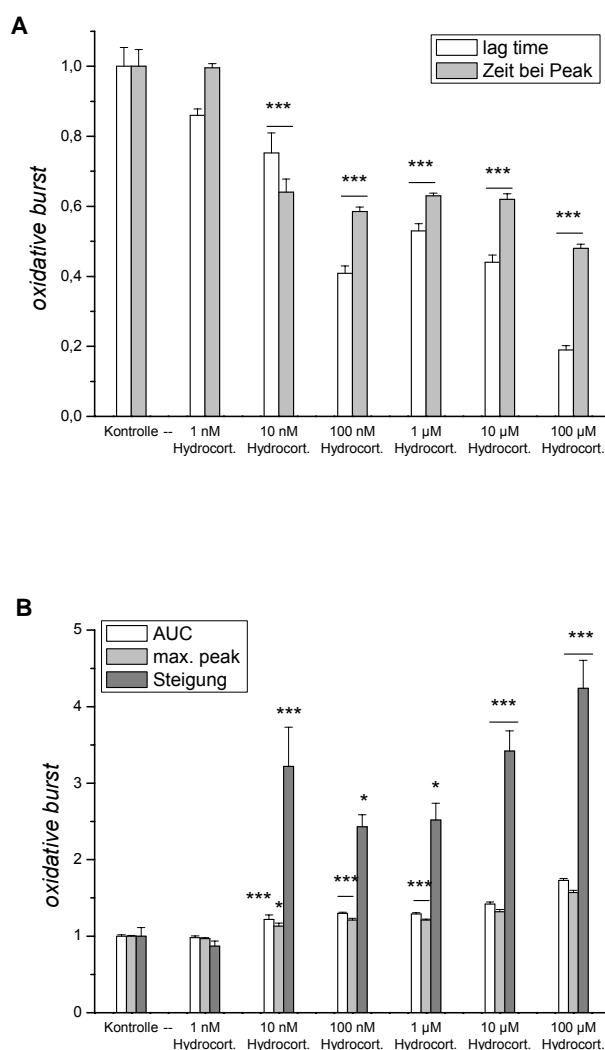
**Abbildung 38** Einfluss von Hydrocortison auf die ROS-Bildung bei PMN nach PMA-Stimulation, ermittelt im Luminoltest (normalisierte Werte).

Die Phagozytose-vermittelte *burst*-Reaktion unterscheidet sich von der PMA-vermittelten. Sie ist generell länger anhaltend, aber auch die Wirkung von Hydrocortison unterscheidet sich. Abb. 39 zeigt die Kinetik des Luminolsignals bei Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten. Auch hier wird die stimulierende Wirkung von Hydrocortison deutlich, jedoch ist der zeitliche Verlauf verschieden. Die stärkste Wirkung liegt bei einer Konzentration von 100n  $\mu$ M.



**Abbildung 39** Radikalbildung primärer neutrophiler Granulozyten nach Zymosan-Stimulation unter Einfluss von Hydrocortison (aus Huber *et al.* 2005)

Signifikant ist in diesem Fall die Stimulation erst ab einer Konzentration von 10 nM (Tab. 16 Anhang, Abb. 40B). Ein noch bedeutenderer Unterschied zum direkt durch PMA ausgelösten *oxidative burst* zeigt sich beim Phagozytose-vermitteltem *burst* durch die Verkürzung der *lag*-Phase mit zunehmenden Hydrocortisonkonzentrationen. Hinzu kommt, dass auch die maximalen *peak*-Höhe wesentlich schneller erreicht wird (Abb. 40A).



**Abbildung 40** Einfluss von Hydrocortison auf die ROS-Bildung bei PMN nach Zymosan-Stimulation, ermittelt im Luminoltest (normalisierte Werte).

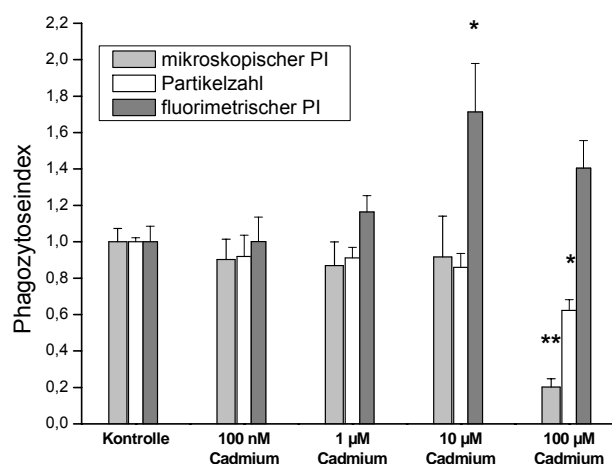
#### 4.2.2 Makrophagen

Die untersuchten Makrophagen der Zelllinie NR8383 stammen aus *Rattus norvegicus*. Die Zellen zeigen einen ausgeprägten *oxidative burst* bei der Phagozytose von opsonierten Zymosan, der mithilfe des Luminoltests, aber auch durch die Oxidation von NBT sowie des OxyBURST®-Reagenz für extrazelluläre Radikale detektiert wurde. Die Phagozytose von FITC-Zymosan wurde mikroskopisch oder fluorimetrisch im Spectra-Fluor-Plus-Reader (Tecan) ausgewertet. Da die Zelllinie besonders im Luminoltest ein sehr starkes und konstantes Signal lieferte, wurde damit ein sehr großes Spektrum verschiedener Substanzen getestet. Dazu gehören das bereits erwähnte Schwermetall Cadmium und die Steroidhormone

Hydrocortison und 17 $\beta$ -Östradiol. Zusätzlich wurde die Wirkung des Immunsuppressivums Cyclosporin A sowie verschiedene pharmakologisch wirksame Pflanzenextrakte untersucht.

#### 4.2.2.1 Einfluss von Cadmium

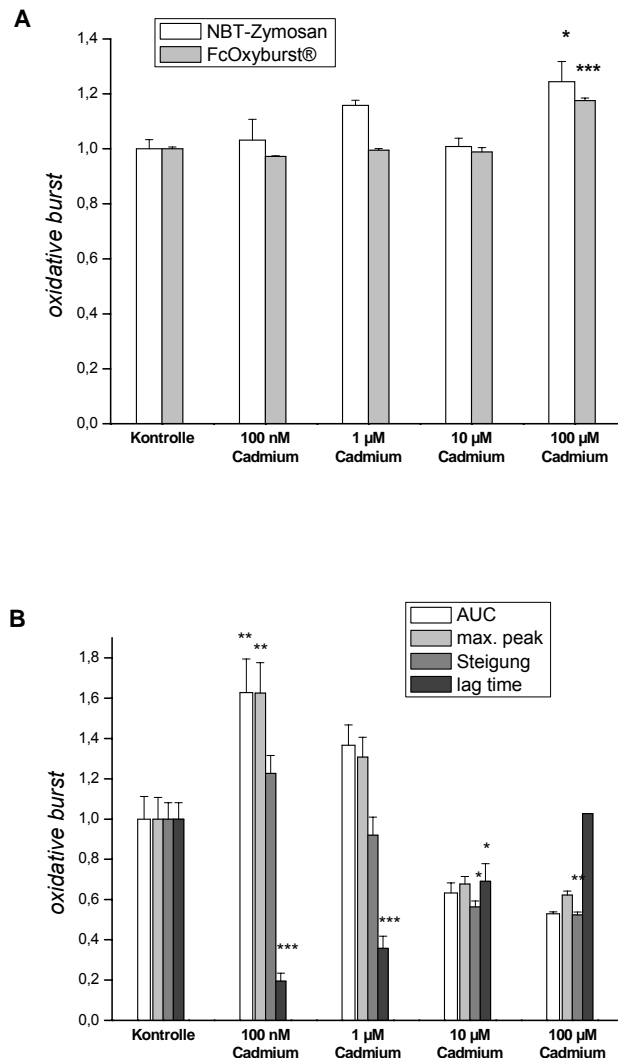
Die getesteten Cadmiumkonzentrationen lagen zwischen 100 nM und 100  $\mu$ M. Tabelle 17 (Anhang) fasst die Ergebnisse zur Phagozytose zusammen, die mit beiden Auswertemethoden bestimmt wurden. Es ergibt sich eine Diskrepanz zwischen den verschiedenen Methoden. Während bei der mikroskopischen Auswertung eine signifikante Verminderung des Anteils phagozytischer Zellen und auch der Anzahl aufgenommener Partikel bei der höchsten Cadmiumkonzentration festzustellen war, weisen die RFU-Werte, bestimmt im Mikrotiterplattenreader, auf eine Erhöhung der Phagozytoserate bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M hin. Abbildung 41 stellt die normalisierten Ergebnisse graphisch dar. Die mikroskopische Auswertung wies auf einen erhöhten Anteil apoptotischer Zellen bei der höchsten Cadmiumkonzentration (100  $\mu$ M) hin. Dies wurde anhand der DAPI-Färbung ersichtlich durch das Auftreten von *apoptotic bodies*.



**Abbildung 41** Einfluss von Cadmium auf den Phagozytoseindex (PI) der Zelllinie NR8383 (normalisierte Werte).

Die Ergebnisse zur Radikalbildung finden sich in Tabelle 18 (Anhang) sowie graphisch in Abbildung 42. Die Oxidation von NBT-Zymosan wies einen erhöhten Wert bei der höchsten Cadmiumkonzentration (100  $\mu$ M) auf, ebenso die RFU-Werte der extrazellulären ROS-Messung. Im Luminoltest konnte hingegen eine Stimulation der Radikalbildung bei einer Konzentration von 100 nM detektiert werden (erkennbar an den erhöhten AUC- und *peak*-

Werten). Die maximale Steigung der Kurven war bei diesem Test jedoch für die hohen Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  verringert. Eine Verminderung der *lag*-Phase zeigte sich bei allen eingesetzten Konzentrationen, nicht jedoch bei der höchsten von 100  $\mu\text{M}$ .

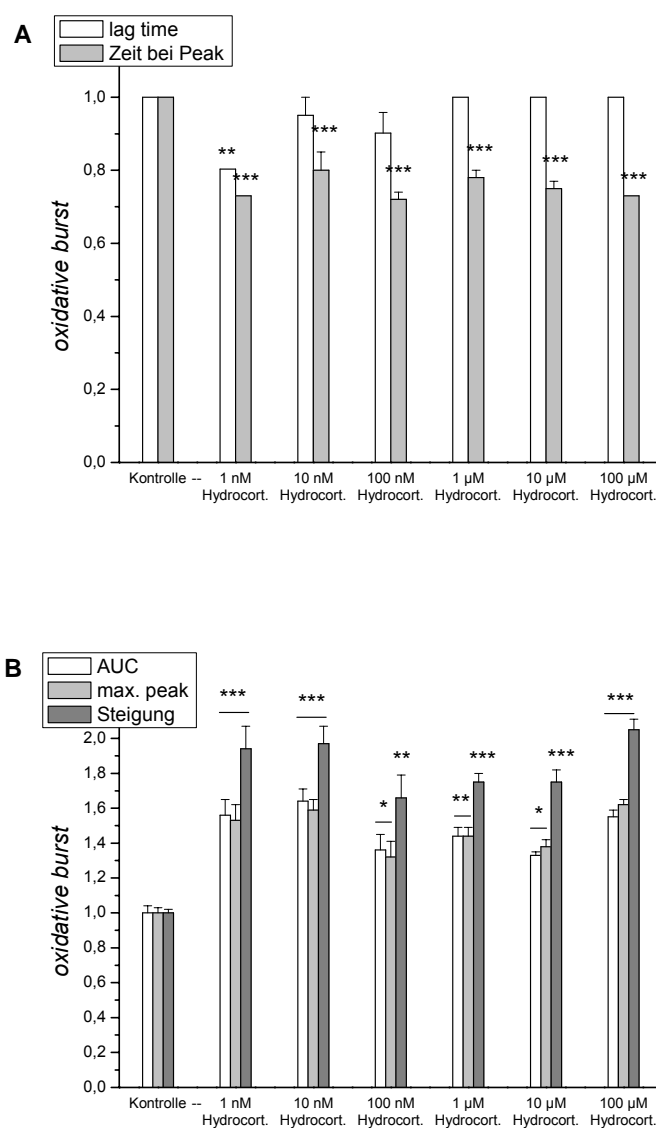


**Abbildung 42** Einfluss von Cadmium auf die ROS-Produktion der Zelllinie NR8383. A: Oxidation von NBT-Zymosan bzw. OxyBURST®; B: quantifizierte Daten aus dem Luminoltest (normalisierte Werte);

#### 4.2.2.2 Einfluss von Hydrocortison

Untersucht wurden Konzentrationen zwischen 1 nM und 100  $\mu\text{M}$  in Zehnerpotenzabständen. Wie Tabelle 19 zeigt, konnte bei keiner der getesteten Konzentrationen eine Veränderung der Phagozytoserate der Makrophagen festgestellt werden. Die Detektion der ROS-Produktion mittels NBT lieferte keine Unterschiede zwischen den mit Hydrocortison behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen (Tab. 20 Anhang). Auch bei der extrazellulären

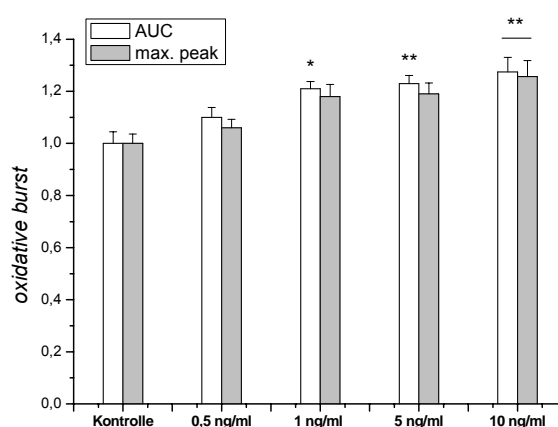
Radikalproduktion konnten keine Abweichungen konstatiert werden. Im Luminoltest war jedoch ein deutlicher Effekt bei allen Konzentrationen erkennbar. Während die ROS-Totalproduktion (AUC), die maximal produzierte ROS-Menge (*max. peak*), sowie die Geschwindigkeit der ROS-Produktion (Steigung) anstiegen, verkürzte sich die Zeit bis zum Erreichen der maximalen *peak*-Höhe bei allen Konzentrationen. Bei einer Konzentration von 1 nM war auch eine verkürzte *lag*-Phase festzustellen. Der stimulierende Effekt war bei 10 nM am stärksten ausgeprägt. Die normalisierten Daten des Luminoltests sind in Abbildung 43 graphisch dargestellt.



**Abbildung 43** Einfluss von Hydrocortison auf die ROS-Produktion der Zelllinie NR8383, ermittelt im Luminoltest. A: *lag*-Phase sowie Zeit bis zur maximalen *peak*-Höhe; B: AUC, *peak* und Steigung (normalisierte Werte);

### 4.2.2.3 Einfluss von 17 $\beta$ -Östradiol

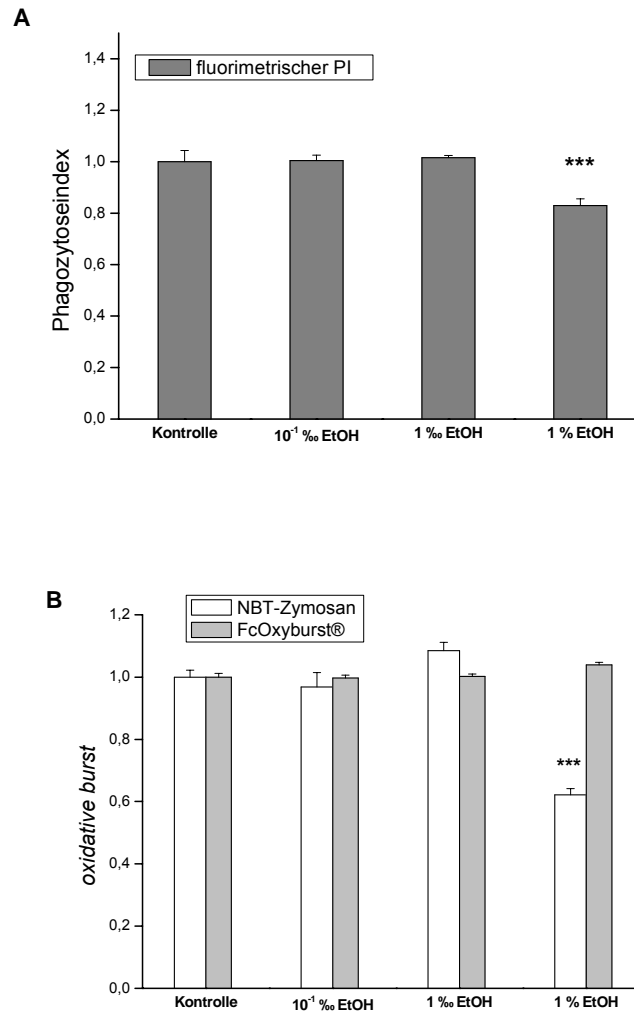
Im Falle des Steroidhormons 17 $\beta$ -Östradiol, einem Wirkstoff von Kontrazeptiva, wurden folgende Konzentrationen getestet: 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml sowie 10 ng/ml. Weder bei der Phagozytoseaktivität, noch bei der Oxidation von NBT oder von OxyBURST<sup>®</sup> wurden Veränderungen wahrgenommen. Im Luminoltest konnte eine Erhöhung der Radikalproduktion festgestellt werden (Tab. 21 Anhang). Dies äußerte sich im Anstieg der AUC-Werte ab einer Konzentration von 1 ng/ml, sowie einer erhöhten maximalen *peak*-Höhe im Falle von 10 ng/ml (Abb. 44).



**Abbildung 44** Einfluss von 17 $\beta$ -Östradiol auf die ROS-Produktion der Zelllinie NR8383, ermittelt im Luminoltest (normalisierte Werte).

Die 17 $\beta$ -Östradiol-Stammlösung wurde in Ethanol angesetzt. Um festzustellen, ab welcher Ethanolkonzentration eine Beeinflussung der Phagozytose sowie der Radikalproduktion eintreten, wurden Tests mit sehr hohen Ethanolkonzentrationen durchgeführt. Eine signifikante Hemmung der Phagozytose sowie der mit NBT-Zymosan erfassten Radikalproduktion war erst ab einer Konzentration von 1 % messbar (Tab. 22 Anhang, Abb. 45). Die mit OxyBURST<sup>®</sup> gemessene extrazelluläre Radikalproduktion zeigte selbst hier noch keine signifikanten Unterschiede, lediglich im Vergleich mit 0,1 % EtOH wies die statistische Auswertung auf einen leicht erhöhten Wert hin.





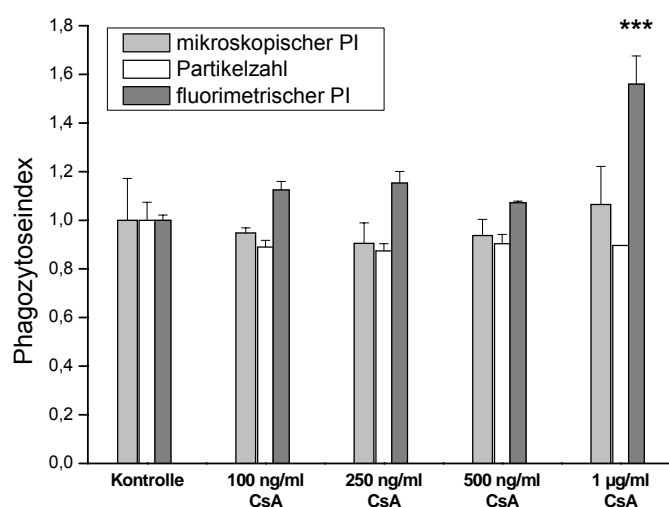
**Abbildung 45** Einfluss hoher EtOH-Konzentrationen auf die Zelllinie NR8383; A: Phagozytoseindex (PI) B: Radikalproduktion mittels NBT-Zymosan bzw. OxyBURST® (normalisierte Werte).

Da in keinem Test die Ethanolkonzentration 1 % betrug, wurden mit diesen drei Testsystemen keine weiteren Ethanolkontrollen für die Makrophagen-Zelllinie NR8383 durchgeführt. Der Luminoltest wies jedoch auf eine Beeinflussung des Signals vor allem durch besonders geringe EtOH-Konzentrationen (siehe Ergebnisse Einfluss von *Echinacea purpurea*) hin, weshalb nochmals explizit in einem Zwei-Stichproben t-Test die einzelnen Parameter des Luminoltests mit jeder entsprechenden EtOH-Konzentration verglichen wurde. Hierbei stellte sich heraus, dass die Stimulation durch 17 $\beta$ -Östradiol bedingt war durch die Restmenge Ethanol in der jeweiligen Verdünnungsstufe. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zu den Ethanolkontrollen.

#### 4.2.2.4 Einfluss von Cyclosporin A

Cyclosporin A (CsA) ist ein immunsuppressiver Wirkstoff, der routinemäßig nach Organtransplantationen verabreicht wird. Die getesteten Konzentrationen waren 1 µg/ml, 500 ng/ml, 250 ng/ml und 100 ng/ml. Da die CsA-Stammlösung in Ethanol angesetzt war, wurden auch die zugehörigen Ethanolkonzentrationen getestet.

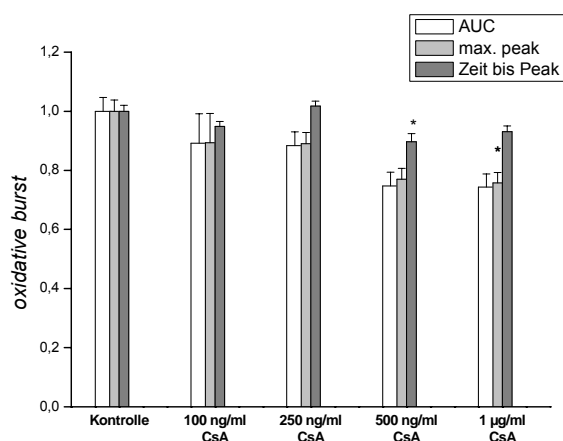
Die Phagozytoserate der Makrophagen war nach Auswertung mit dem Tecan-Reader bei einer Konzentration von 1 µg/ml signifikant erhöht. Mikroskopisch konnte diese Stimulation jedoch nicht nachgewiesen werden (Tab. 23 Anhang, Abb. 46).



**Abbildung 46** Einfluss von Cyclosporin A (CsA) auf den Phagozytoseindex (PI) der Zelllinie NR8383 (normalisierte Werte).

Der OxyBURST®-Test sowie der NBT-Test konnten keine Unterschiede der ROS-Produktion bei mit CsA behandelten Zellen detektieren. Im Luminoltest zeigten sich jedoch geringfügige Abweichungen (Tab. 24 Anhang). So war die maximale *peak*-Höhe bei der höchsten Konzentration von 1 µg/ml signifikant erhöht, bei 500 ng/ml wurde die maximale *peak*-Höhe ca. 1,5 min früher erreicht als in den Kontrollzellen (Abb. 47).

Da die CsA-Stammlösung in Ethanol angesetzt war, wurden auch in diesem Experiment Ethanolkontrollen im Luminoltest durchgeführt. Die Ergebnisse des Vergleichs aus dem 2-Stichproben t-Test mit den erreichten Signifikanzniveaus sind in Tabelle 6 dargestellt.



**Abbildung 47** Einfluss von Cyclosporin A (CsA) auf die ROS-Produktion der Zelllinie NR8383, ermittelt im Luminoltest (normalisierte Werte).

**Tabelle 6** Signifikante Unterschiede der einzelnen CsA-Konzentrationen zu den jeweiligen EtOH-Kontrollen, ermittelt über 2-Stichproben t-Test.

Signifikanzniveaux	AUC	max.Peakhöhe	Steigung [RLU/min]	Zeit bei Peak [min]
100 ng/ml CsA zu $10^{-3}$ % EtOH	***	**	*	
250 ng/ml CsA zu $2,5 \times 10^{-3}$ % EtOH	*	*		
500 ng/ml CsA zu $5 \times 10^{-3}$ % EtOH	***	***		***
1 µg/ml CsA zu $10^{-2}$ % EtOH	**	**	*	**

Hierbei bestätigt sich die hemmende Wirkung von Cyclosporin A. In fast allen Parametern des Luminoltests (außer *lag*-Phase) waren signifikante Unterschiede zu den jeweiligen Ethanolkontrollen erkennbar.

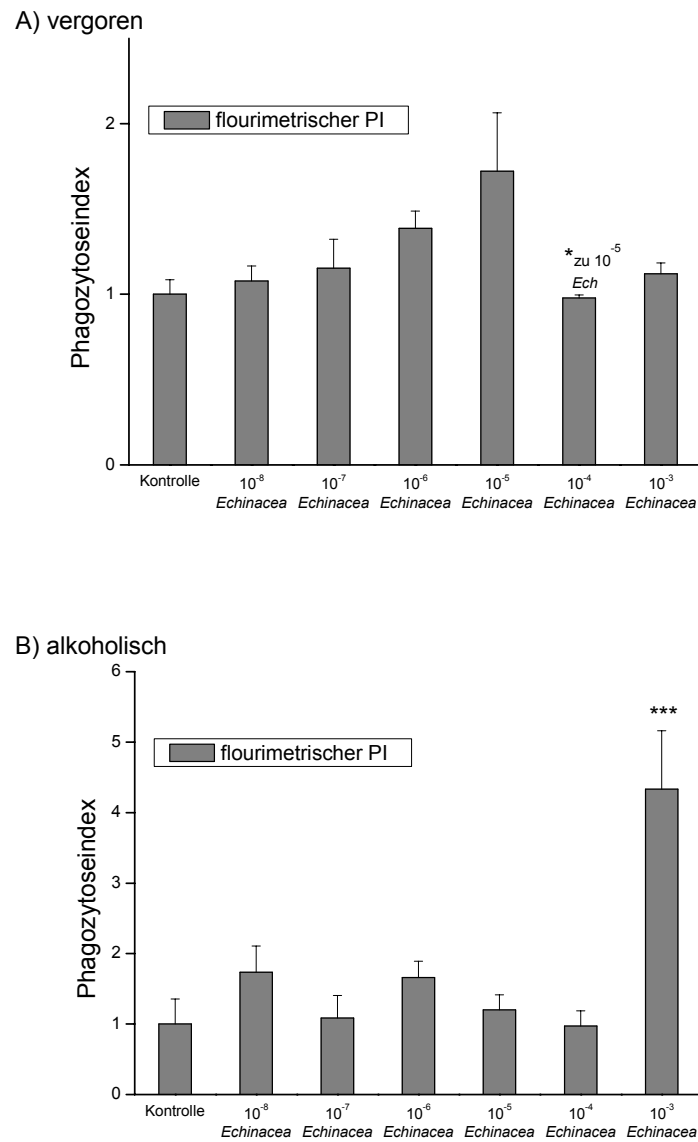
#### 4.2.2.5 Einfluss von *Echinacea purpurea*

Presssäfte des Purpursonnenhuts gelten allgemein als immunstimulierend. Die in dieser Arbeit getesteten *Echinacea purpurea* Extrakte lagen in zwei verschiedenen Lösungen vor, in vergorener sowie in alkoholischer Lösung (ca. 20 % (v/v) Ethanol). Beide Lösungen wurden auf einen 6,5 %igen (w/v) Gehalt an Trockenrückstand eingestellt und in Zehnerpotenzen verdünnt. Getestet wurden die Verdünnungen  $1 : 10^3$  ( $10^{-3}$ ) bis  $1 : 10^8$  ( $10^{-8}$ ). Die maximale Ethanolkonzentration lag damit bei  $2 \times 10^{-1}$  % (v/v). Beide Extrakte wurden unmittelbar vor

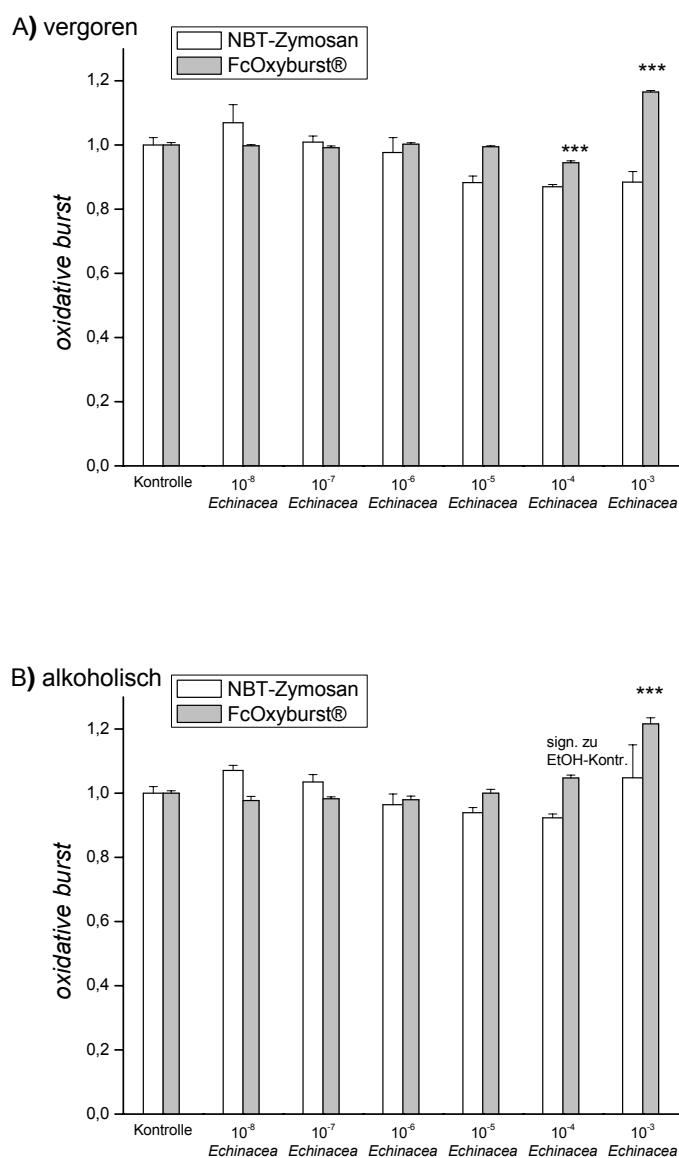
den Tests zugefügt, es wurden aber auch Experimente durchgeführt, bei denen die Extrakte für 2 bzw. 5 Tage in die Zellkulturflaschen gegeben wurden. Mit den langzeitexponierten Zellen wurde anschließend ein Luminoltest durchgeführt.

Die Tabellen 25 – 33 im Anhang fassen alle Ergebnisse der *Echinacea*-Experimente zusammen. In Abbildung 48 ist der Einfluss beider Lösungen auf die Phagozytoseaktivität der Zellen dargestellt. Während mit dem vergorenen Extrakt keine signifikanten Einflüsse im Vergleich zur Kontrolle festzustellen waren, sondern sich lediglich die Tendenz zu einer Stimulation bei  $10^{-5}$  abzeichnet, führte der alkoholische Extrakt zu einer Steigerung des Phagozytoseindex um das Vierfache in der höchsten Konzentration ( $10^{-3}$ ). Wie im Kapitel Cyclosporin A gezeigt wurde, haben die verwendeten Ethanolkonzentrationen keinen Einfluss auf die Phagozytoserate und die im NBT- und OxyBURST®-Test ermittelte ROS-Produktion. Aus diesem Grund wurden nur Ethanolkontrollen bei den Luminoltests mitgeführt.

Die mittels NBT-Zymosan gemessene Radikalbildung lieferte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ohne *Echinacea*. Hohe Konzentrationen ( $10^{-3}$ ) führten hingegen zu einer vermehrten Freisetzung extrazellulärer ROS, welche mit dem OxyBURST®-Reagenz detektiert werden konnten. Im Falle des vergorenen Extrakts war mit der Verdünnung  $10^{-4}$  eine signifikante Hemmung der extrazellulären ROS-Produktion verbunden, wohingegen in der alkoholischen Lösung wiederum eher eine Stimulation zu erkennen war, die im Vergleich zur EtOH-Kontrolle auch signifikant war (Abb. 49).

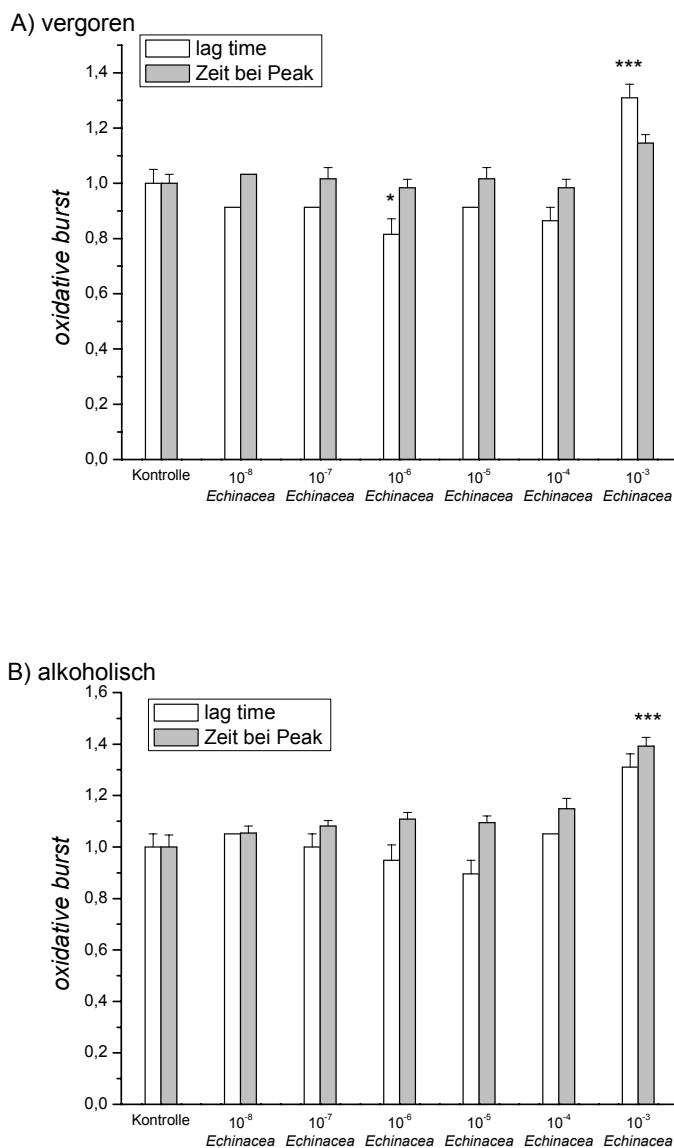


**Abbildung 48** Einfluss von *Echinacea purpurea*-Extrakt auf den Phagozytoseindex (PI) der Zelllinie NR8383; A: vergorene Lösung, B: alkoholische Lösung (normalisierte Werte).



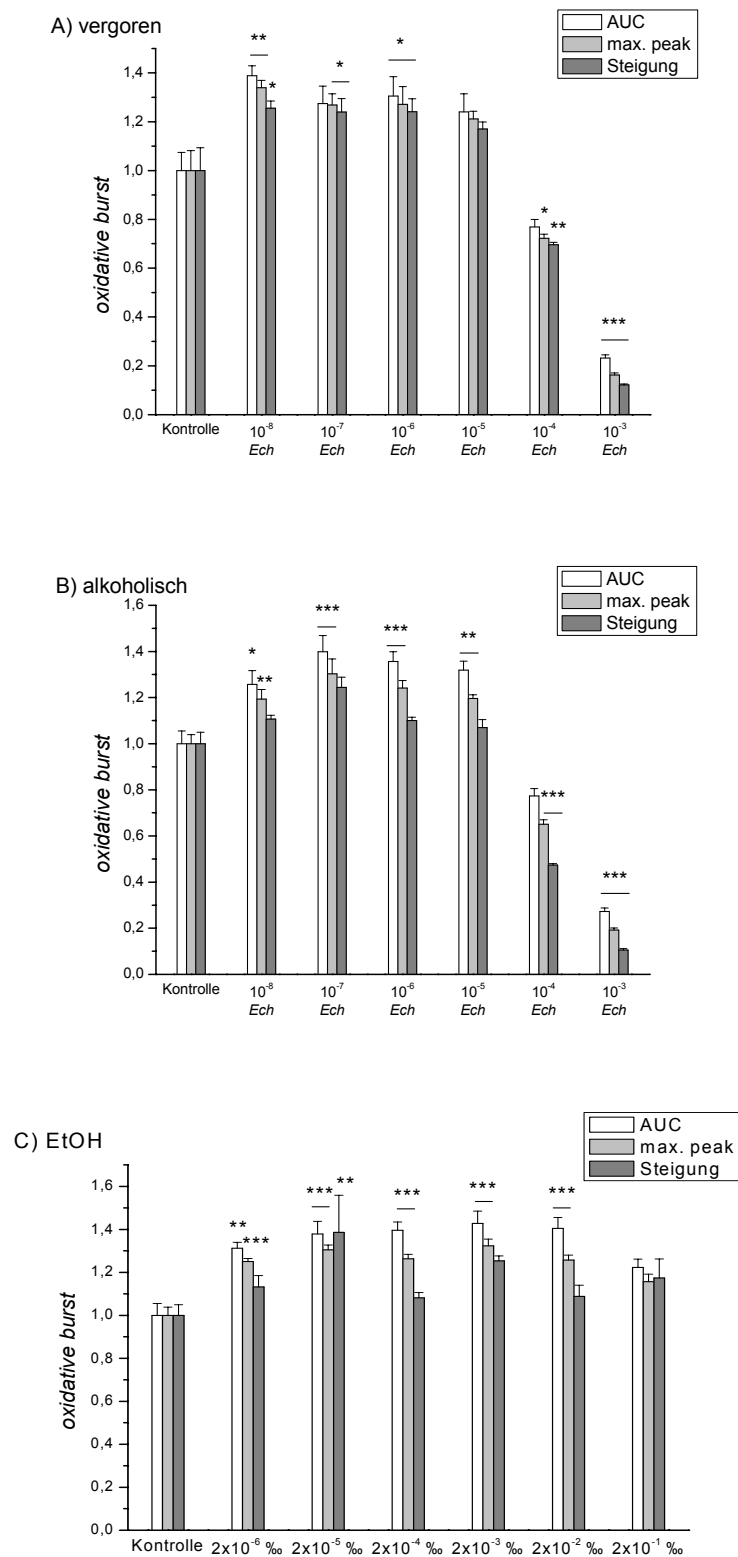
**Abbildung 49** Einfluss von *Echinacea purpurea*-Extrakt auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383, ermittelt über die Oxidation von NBT-Zymosan bzw. OxyBURST®; A: vergorene Lösung, B: alkoholische Lösung (normalisierte Werte).

Im Luminoltest waren deutlichere Effekte zu beobachten. Abbildung 50 zeigt die Veränderungen im zeitlichen Verlauf der Kinetik. Bei beiden Lösungen führten hohe Konzentrationen ( $10^{-3}$ ) zu einer Verzögerung der Reaktion. Im Falle des vergorenen Extrakts war die *lag*-Phase etwas verlängert (bei der Verdünnungsstufe  $10^{-6}$  war sie wiederum leicht verkürzt). Der alkoholische Extrakt führte dazu, dass die maximale *peak*-Höhe rund 6 min später erreicht wurde als bei den Zellen ohne Extrakt.



**Abbildung 50** Einfluss von *Echinacea purpurea*-Extrakt auf den zeitlichen Verlauf der Luminolreaktion bei NR8383; A: vergorene Lösung, B: alkoholische Lösung (normalisierte Werte).

Bei Betrachtung der produzierten Menge an ROS (AUC, max. *peak.*, Steigung, Abb. 51) ergibt sich ein einheitliches Bild der beiden Extrakte. Hohe Konzentrationen in den Verdünnungsstufen  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$  führten zu einer starken Hemmung der Radikalproduktion um bis zu 80 %, wohingegen niedrige Konzentrationen in den hohen Verdünnungsstufen ( $10^{-5}$  –  $10^{-8}$ ) die Radikalproduktion um 20 – 40 % steigerten.



**Abbildung 51** Einfluss von *Echinacea purpurea*-Extrakt auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383, ermittelt im Luminoltest; A: vergorene Lösung, B: alkoholische Lösung, C: EtOH-Kontrolle (normalisierte Werte).

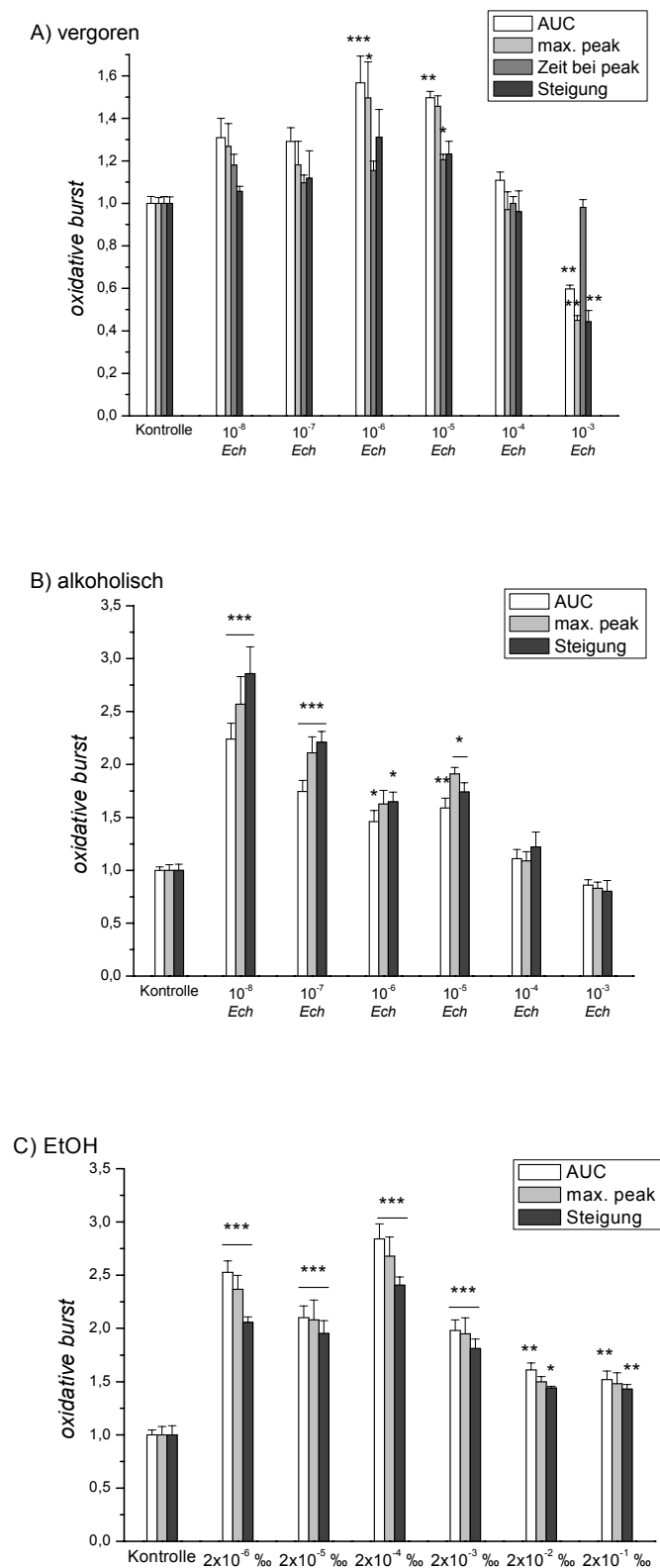


Allerdings lieferten die Ethanol-Kontrollen ähnliche Ergebnisse. Die hemmende Wirkung ist nicht eingetreten, dafür jedoch eine Stimulation der ROS-Produktion zwischen  $2 \times 10^{-2} \%$  und  $2 \times 10^{-6} \%$ , was den *Echinacea*-Verdünnungsstufen  $10^{-4} - 10^{-8}$  entspricht. Aus diesem Grund wurden alle einzelnen Parameter des Luminoltests nochmals einem Zwei-Stichproben t-Test unterzogen, bei dem jede Probe mit ihrer zugehörigen EtOH-Kontrolle verglichen wurde (Tab. 7). Dabei stellte sich heraus, dass nur die Verdünnungen  $10^{-3} - 10^{-5}$  signifikant verschieden waren, die Stimulation in den niedrigen Konzentrationsbereichen war im alkoholischen *Echinacea*-Extrakt bedingt durch den Gehalt an Restalkohol.

**Tabelle 7** Signifikante Unterschiede der einzelnen *Echinacea*-Verdünnungen zu den jeweiligen EtOH-Kontrollen ermittelt über 2-Stichproben t-Test. Test unmittelbar nach Extrakt-Zugabe.

Signifikanz-niveaux	AUC	max.Peakhöhe	Steigung [RLU/min]	lag time [min]	Zeit bei Peak [min]
$10^{-8}$ <i>Echinacea</i> zu $2 \times 10^{-6} \%$					
$10^{-7}$ <i>Echinacea</i> zu $2 \times 10^{-5} \%$					
$10^{-6}$ <i>Echinacea</i> zu $2 \times 10^{-4} \%$					
$10^{-5}$ <i>Echinacea</i> zu $2 \times 10^{-3} \%$		*	**		
$10^{-4}$ <i>Echinacea</i> zu $2 \times 10^{-2} \%$	***	***	***	*	
$10^{-3}$ <i>Echinacea</i> zu $2 \times 10^{-1} \%$	***	***	***	***	***

Nach 2 Tagen Kultivierung in mit *Echinacea*-Extrakt (bzw. EtOH) versetztem Medium zeigten die Zellen im Luminoltest das in Abbildung 52 dargestellte Verhalten bei der Phagozytose von Zymosan. Die Reaktion ähnelt der ROS-Produktion bei unmittelbarer Extrakt-Zugabe. Unter Zusatz des vergorenen Extrakts zeigten sich wiederum eine hemmende Wirkung der geringsten Verdünnung ( $10^{-3}$ ), sowie eine Stimulation bei den Verdünnungsstufen  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$ . Der alkoholische Extrakt rief eine stimulierende Wirkung im Bereich zwischen  $10^{-5} - 10^{-8}$  hervor, der auch bei den EtOH-Kontrollen zu erkennen war und teilweise 200 – 300 % Steigerung der ROS-Produktion mit sich brachte. Unter EtOH-Zugabe im Kulturmedium zeichnete sich bei allen Konzentrationen eine Stimulation des *oxidative burst* ab. Der zeitliche Verlauf der Reaktion wies kaum Unterschiede zu den ohne Zusatz kultivierten Zellen auf. Lediglich bei der Verdünnung von  $10^{-5}$  war die Zeit bis zur maximalen *peak*-Höhe um etwa 3 min verlängert.



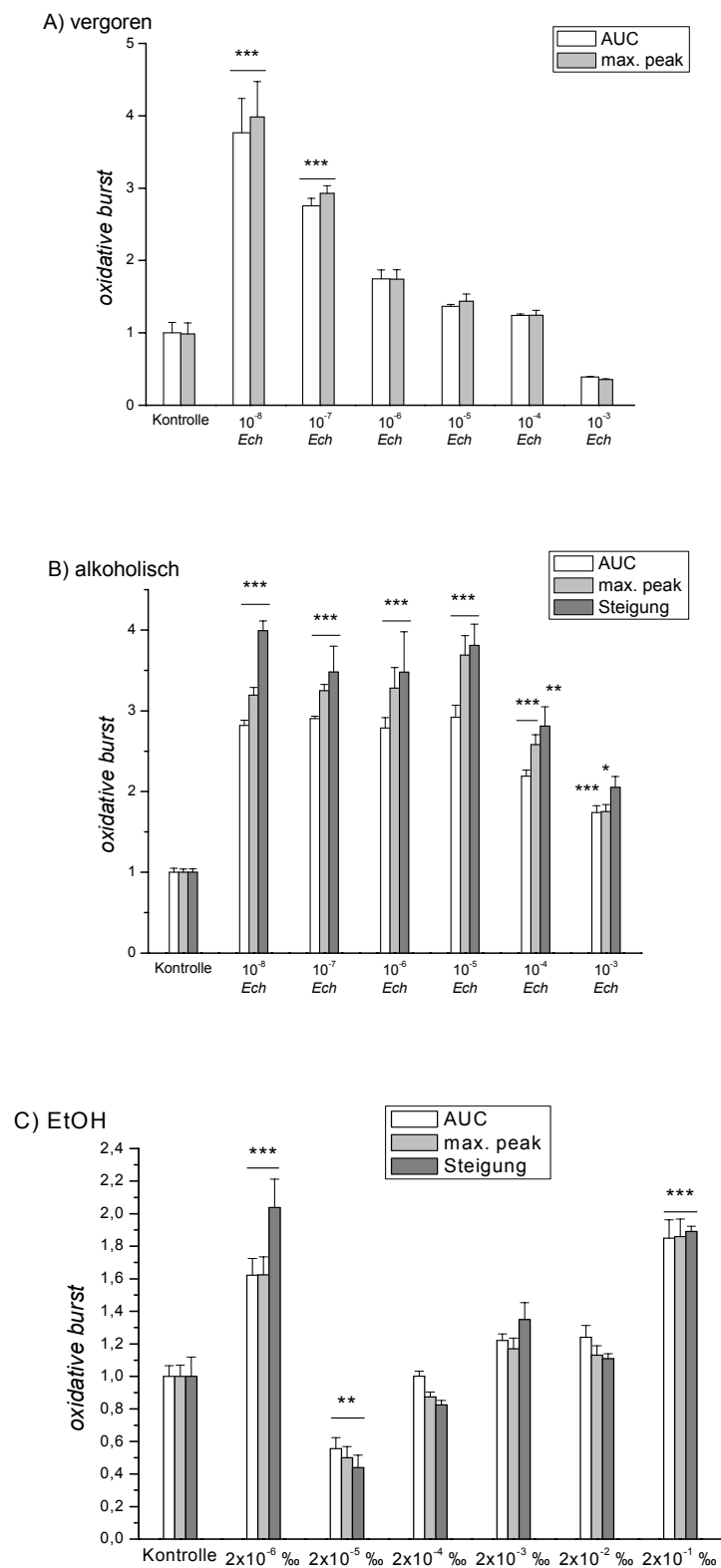
**Abbildung 52** Einfluss von *Echinacea purpurea*-Extrakt auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383, ermittelt im Luminoltest nach 2 Tagen in Kultur; A: vergorene Lösung, B: alkoholische Lösung, C: EtOH-Kontrolle (normalisierte Werte).

Im Einzelvergleich der jeweiligen *Echinacea*-Konzentrationen mit den zugehörigen EtOH-Konzentrationen ergab der Zwei-Stichproben t-Test die in Tabelle 8 angegebenen Signifikanzniveaus. Es zeigten sich in den meisten Fällen in einzelnen Parametern signifikante Unterschiede. Lediglich die Verdünnungsstufe  $10^{-7}$  wies einen identischen Verlauf mit der entsprechenden Ethanol-Konzentration auf.

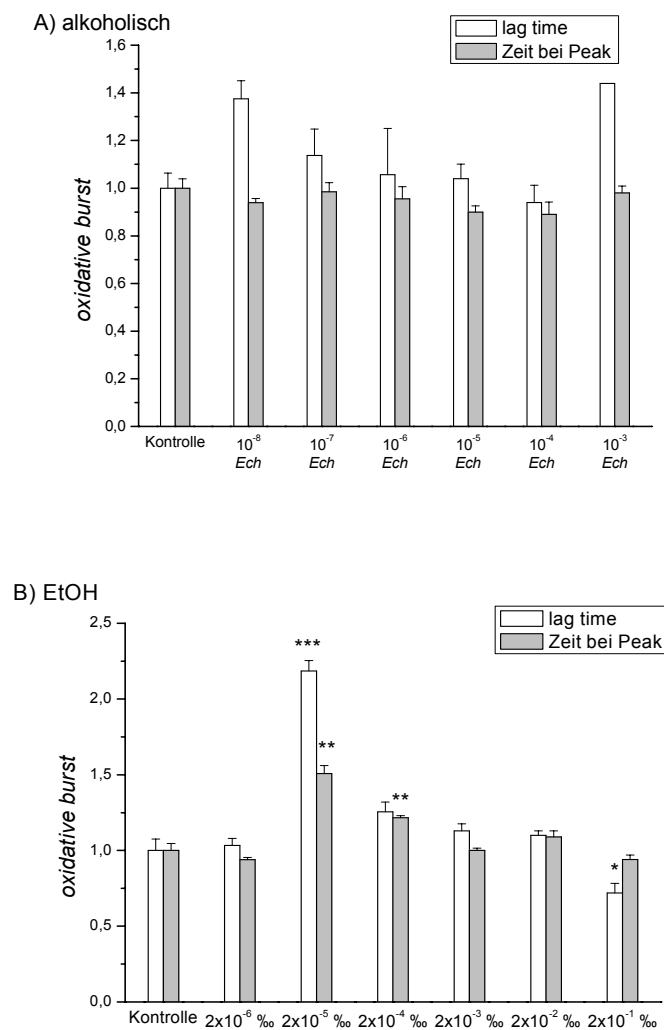
**Tabelle 8** Signifikante Unterschiede der einzelnen *Echinacea*-Verdünnungen zu den jeweiligen EtOH-Kontrollen ermittelt über 2-Stichproben t-Test. Luminoltest nach 2 Tagen in Kultur.

Signifikanz-niveaus	AUC	max.Peakhöhe	Steigung [RLU/min]	Zeit bei Peak [min]
$10^{-8}$ <i>Echinacea</i> zu $2 \times 10^{-6}$ ‰			*	*
$10^{-7}$ <i>Echinacea</i> zu $2 \times 10^{-5}$ ‰				
$10^{-6}$ <i>Echinacea</i> zu $2 \times 10^{-4}$ ‰	***	**	***	
$10^{-5}$ <i>Echinacea</i> zu $2 \times 10^{-3}$ ‰	*			
$10^{-4}$ <i>Echinacea</i> zu $2 \times 10^{-2}$ ‰	**	**		
$10^{-3}$ <i>Echinacea</i> zu $2 \times 10^{-1}$ ‰	***	**	**	

Nach 5 Tagen Kultivierung in *Echinacea*- (bzw. EtOH-) haltigem Medium veränderte sich die Reaktion deutlich (Abb. 53). Die Radikalproduktion mit vergorenem Extrakt war in den niedrigen Konzentrationen ( $10^{-7}$  bzw.  $10^{-8}$  Verdünnung) um das Drei- beziehungsweise Vierfache erhöht. Auch mit allen Verdünnungsstufen des alkoholischen Extrakts war eine Steigerung zu verzeichnen, die ebenso wie in vergorener Lösung in den niedrigen Konzentrationen am stärksten ausgeprägt war. Die Ethanolkontrollen riefen nicht so hohe Steigerungen hervor und diese auch nur in der höchsten und der niedrigsten Konzentration. Dazwischen ( $2 \times 10^{-5}$  ‰) konnte sogar eine Hemmung festgestellt werden. Im zeitlichen Verlauf der Luminolreaktion waren durch die *Echinacea*-Extrakte keine Unterschiede festzustellen, wohingegen die Ethanolkonzentrationen  $2 \times 10^{-5}$  ‰ und  $2 \times 10^{-4}$  ‰ eine Verzögerung verursachten (Abb. 54).



**Abbildung 53** Einfluss von *Echinacea purpurea*-Extrakt auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383, ermittelt im Luminoltest nach 5 Tagen in Kultur; A: vergorene Lösung, B: alkoholische Lösung, C: EtOH-Kontrolle (normalisierte Werte).



**Abbildung 54** Einfluss von *Echinacea purpurea*-Extrakt auf den zeitlichen Verlauf der Luminolreaktion bei NR8383 nach 5 Tagen in Kultur; A: alkoholische Lösung, B: EtOH-Kontrolle (normalisierte Werte).

Entsprechend zeigte der Einzelvergleich im Zwei-Stichproben t-Test auch signifikante Unterschiede bei allen Verdünnungsstufen des alkoholischen *Echinacea*-Extrakts (Tab. 9). Bei der Verdünnung von 10<sup>-3</sup> wurden zwar die gleichen Mengen ROS produziert, die verkürzte *lag*-Phase der EtOH-Kontrolle weist jedoch auf einen Unterschied der beiden Reaktionen hin.

**Tabelle 9** Signifikante Unterschiede der einzelnen *Echinacea*-Verdünnungen zu den jeweiligen EtOH-Kontrollen ermittelt über 2-Stichproben t-Test. Luminoltest nach 5 Tagen in Kultur.

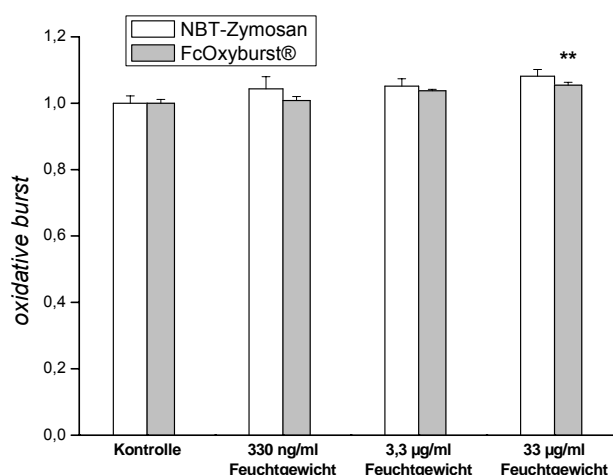
Signifikanz-niveaux	AUC	max.Peakhöhe	Steigung [RLU/min]	lag time [min]	Zeit bei Peak [min]
$10^{-8}$ <i>Echinacea</i> zu $2 \times 10^{-6}$ ‰	***	***	***		
$10^{-7}$ <i>Echinacea</i> zu $2 \times 10^{-5}$ ‰	***	***	***	***	***
$10^{-6}$ <i>Echinacea</i> zu $2 \times 10^{-4}$ ‰	***	***	***		***
$10^{-5}$ <i>Echinacea</i> zu $2 \times 10^{-3}$ ‰	***	***	***		
$10^{-4}$ <i>Echinacea</i> zu $2 \times 10^{-2}$ ‰	***	***	***		*
$10^{-3}$ <i>Echinacea</i> zu $2 \times 10^{-1}$ ‰				***	

#### 4.2.2.6 Einfluss des Pflanzenextrakts QMH 5566

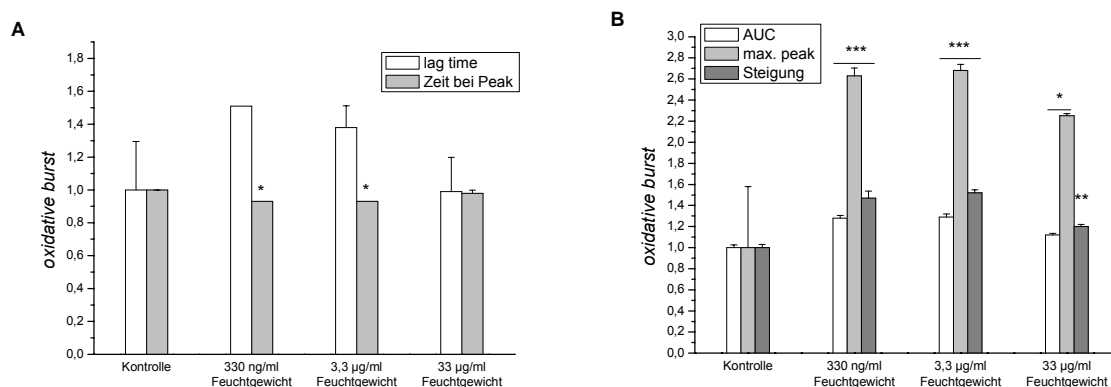
Ein weiterer getesteter Pflanzenextrakt wird momentan von mehreren Arbeitsgruppen auf seine entzündungshemmenden Wirkungen überprüft trägt die Patentnummer QMH 5566. Er lag in einer Konzentration von 330 mg Feuchtwicht pro ml Ethanol vor. Getestet wurden die Konzentrationen 33 µg/ml, 3,3 µg/ml und 330 ng/ml (Tab. 34 Anhang) sowie die dazu gehörigen Ethanolkonzentrationen im Luminoltest (Tab. 35 Anhang). Dass die verwendeten Ethanolkonzentrationen keinen Einfluss auf die Phagozytoseaktivität sowie auf die ROS-Produktion haben, gemessen über die Oxidation von NBT-Zymosan bzw. OxyBURST®, wurde bereits im Kapitel Cyclosporin A erläutert.

Die extrazelluläre ROS-Produktion war bei der höchsten Konzentration von 33 µg/ml leicht erhöht, wie in Abbildung 55 zu erkennen ist.

Im Luminoltest wurde bei allen getesteten Konzentrationen eine Stimulation der Radikalproduktion deutlich, sichtbar an den erhöhten AUC- und Steigungswerten, wie auch der gesteigerten maximalen *peak*-Höhe. Der Effekt war in der höchsten Konzentration (33 µg/ml) am schwächsten ausgeprägt. Hier war auch keine signifikante Zeitverschiebung bis zur maximalen *peak*-Höhe mehr zu beobachten, wie sie in den beiden anderen getesteten Konzentrationen festzustellen war (Abb. 56).



**Abbildung 55** Einfluss des Pflanzenextrakts auf die ROS-Produktion der Zelllinie NR8383 (normalisierte Werte).



**Abbildung 56** Einfluss des Pflanzenextrakts auf die ROS-Produktion der Zelllinie NR8383, ermittelt im Luminoltest. A: *lag*-Phase sowie Zeit bis zur maximalen *peak*-Höhe; B: AUC, *peak* und Steigung (normalisierte Werte);

Tabelle 35 (Anhang) zeigt, dass auch in den EtOH-Kontrollen ohne Pflanzenextrakt eine signifikante Stimulation im Luminoltest festzustellen war. Die ROS-Totalproduktion (AUC) sowie die maximal vorhandene ROS-Konzentration waren für die beiden höheren Konzentrationen signifikant erhöht, die maximal produzierte ROS-Menge pro min (Steigung) war für alle EtOH-Konzentrationen gesteigert. Zusätzlich verlängerte sich bei den beiden geringeren Konzentrationen die *lag*-Phase. Um auszuschließen, dass die mit Pflanzenextrakt gemessene Stimulation auf die Wirkung von EtOH zurückzuführen ist, wurden für alle Parameter die einzelnen Pflanzenextrakt-Konzentrationen nochmals einem Zwei-Stichproben

t-Test mit den jeweiligen EtOH-Kontrollen unterzogen. Die Ergebnisse mit den Signifikanzniveaus sind in Tabelle 10 dargestellt. Im direkten Vergleich mit den EtOH-Kontrollen ist bei allen Verdünnungsstufen wiederum eine signifikante Erhöhung der ROS-Produktion zu ermitteln.

**Tabelle 10** Signifikante Unterschiede der einzelnen Pflanzenextrakt-Konzentrationen zu den jeweiligen EtOH-Kontrollen ermittelt über 2-Stichproben t-Test.

<b>Signifikanzniveaux</b>	AUC	max.Peakhöhe	Steigung [RLU/min]
330 ng/ml Feuchtgewicht zu $10^{-3}$ ‰ EtOH	***	***	***
3,3 µg/ml Feuchtgewicht zu $10^{-2}$ ‰ EtOH	*	*	***
33 µg/ml Feuchtgewicht zu $10^{-1}$ ‰ EtOH		**	**

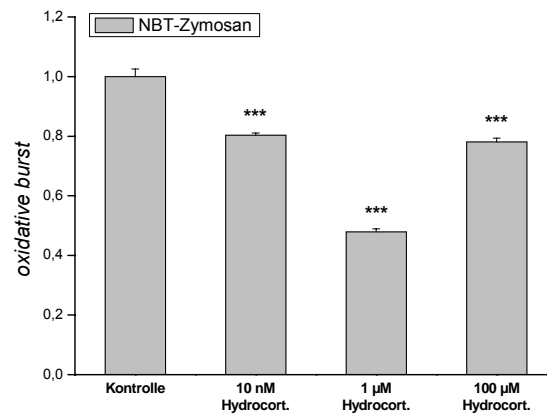
### 4.2.3 Mikrogliazellen

Die untersuchten Mikrogliazellen waren permanente Zellen der Linie BV-2. Sie zeigten kein ausreichend hohes Luminolsignal, um Einflüsse mit diesem Testsystem detektieren zu können. Für die Untersuchung der Wirkung einzelner Substanzen auf die Radikalbildung wurde deshalb der NBT-Test verwendet, die Phagozytoseleistung wurde mikroskopisch bewertet.

#### 4.2.3.1 Einfluss von Hydrocortison

Getestet wurden die Konzentrationen 10 nM, 1 µM und 100 µM im NBT-Test. Die Absorptionswerte finden sich in Tabelle 36 im Anhang, graphisch sind sie in Abbildung 57 normalisiert dargestellt. Alle eingesetzten Konzentrationen riefen eine signifikante Verminderung der Radikalproduktion hervor. Der am stärksten ausgeprägte Effekt war unter Einfluss von 1 µM Hydrocortison zu erkennen.

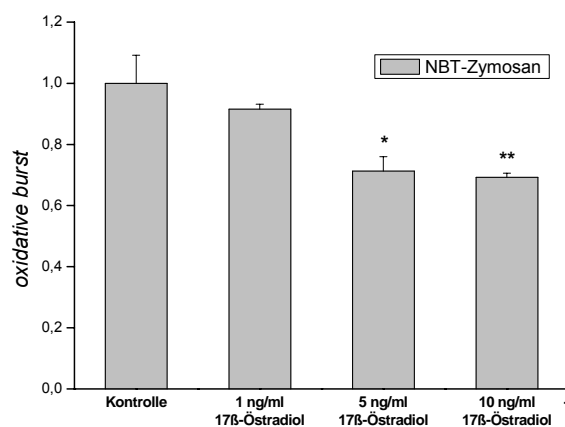




**Abbildung 57** Einfluss von Hydrocortison auf die ROS-Produktion der Zelllinie BV-2 (normalisierte Werte).

#### 4.2.3.2 Einfluss von 17 $\beta$ -Östradiol

Die untersuchten Konzentrationen des Steroidhormons 17 $\beta$ -Östradiol waren 1 ng/ml, 5 ng/ml sowie 10 ng/ml. Ab einer Konzentration von 5 ng/ml stellte sich ein hemmender Effekt auf die im NBT-Assay gemessene ROS-Produktion während der Phagozytose ein (Tab. 37 Anhang, Abb. 58).



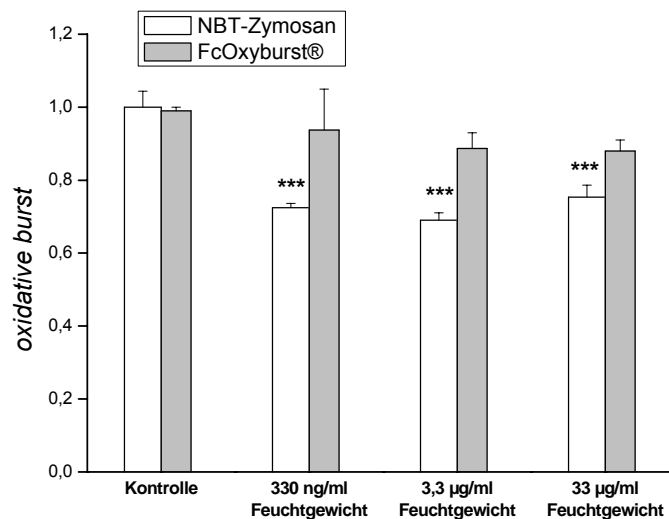
**Abbildung 58** Einfluss von 17 $\beta$ -Östradiol auf die ROS-Produktion der Zelllinie BV-2 (normalisierte Werte).

Die maximale Ethanolkonzentration bei diesem Experiment durch die Verdünnung der Ethanol-Stammlösung betrug  $10^{-3}$  ‰ bei 10 ng/ml Hormon. Im nächsten Kapitel ist aufgezeigt, dass die verwendeten Ethanolkonzentrationen keinen Einfluss auf die ROS-

Produktion der BV-2 Zellen haben, so dass bei diesem Experiment der Einfluss von Ethanol vernachlässigt werden kann.

#### 4.2.3.3 Einfluss des Pflanzenextrakts QMH 5566

Der Pflanzenextrakt lag in einer Konzentration von 330 mg Feuchtgewicht pro ml Ethanol vor. Getestet wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen die Konzentrationen 33  $\mu\text{g/ml}$ , 3,3  $\mu\text{g/ml}$  und 330  $\text{ng/ml}$  (Tab. 38 Anhang), sowie die dazu gehörigen Ethanolkonzentrationen als Kontrollversuch (Tab. 39 Anhang). Die Phagozytoseleistung der Zellen blieb in allen Fällen unverändert, ebenso wie die extrazelluläre Radikalproduktion, gemessen mit dem OxyBURST®-Reagenz. Die verwendeten Pflanzenextrakt-Konzentrationen, nicht aber die Ethanolkontrollen, konnten eindeutig eine hemmende Wirkung auf die ROS-Produktion der BV-2 Zellen nachweisen (Abb. 59).



**Abbildung 59** Einfluss des Pflanzenextrakts auf die ROS-Produktion der Zelllinie BV-2 (normalisierte Werte).

## 4.3 Der Einfluss von simulierter Schwerelosigkeit auf die Makrophagen-Zelllinie NR8383

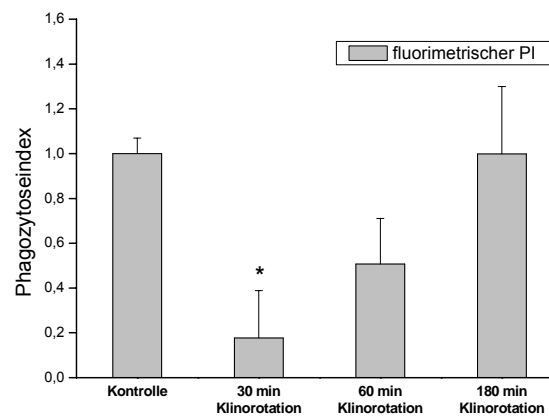
### 4.3.1 Klinorotation

Klinorotierte Objekte erfahren durch die konstante Drehung um ihre Achse einen ständig wechselnden Richtungsvektor des Schwerfeldes. Mit diesem Prinzip lassen sich Mikrogravitationsbedingungen im Labor simulieren.

Während der Inkubation im 2D-Küvettenklinostaten ist keine gleichzeitige Messung möglich. Deshalb konnte keine Kinetikmessung mit dem Luminoltest durchgeführt werden. Die Radikalproduktion wurde durch die Oxidation von NBT nach der Aufnahme von NBT-Zymosan ermittelt, der Phagozytoseindex wurde fluorimetrisch im Mikrotiterplattenreader bestimmt. Die Inkubationszeiten betragen 30, 60 und 180 min. Neben unterschiedlich langen Inkubationszeiten wurden auch der Einfluss von Cadmiumchlorid (10  $\mu\text{M}$ ) bzw. Hydrocortison (100  $\mu\text{M}$ ) während gleichzeitiger Klinorotation für 60 min untersucht. Die Sedimentation der Zellen in den Küvetten der 1g Kontrollen könnte die Ergebnisse möglicherweise verfälschen. Deshalb wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem das Medium mit 0,3 % Methylzellulose versetzt war. Die Inkubationszeit betrug dabei 60 min. Da bei dem Weltraumversuch kryokonservierte Zellen benutzt werden sollen, die einige Stunden vor dem Test regeneriert werden sollen, wurde getestet, ob diese frisch reaktivierten Zellen genauso sensitiv auf Klinorotation reagieren wie frisch aus Kultur entnommene Zellen. Bei einem Experiment im Klinostaten konnten jeweils zwei Wiederholungen durchgeführt werden. Gelegentlich ergaben sich unterschiedlich hohe Signalstärken bei den einzelnen Experimenten. Um die Wiederholungen trotzdem miteinander vergleichen zu können, wurden alle Ergebnisse normalisiert, dabei entsprach der Mittelwert der Kontrollen eines Einzelexperiments stets dem Wert 1. Tabelle 40 zeigt eine Zusammenfassung der normalisierten Ergebnisse aller Klinostatenexperimente. Da bei jedem Einzelexperiment 1g Kontrollen durchgeführt wurden, die bei der Normalisierung miteinander verrechnet wurden, ergab sich eine sehr hohe Anzahl an Wiederholungen.

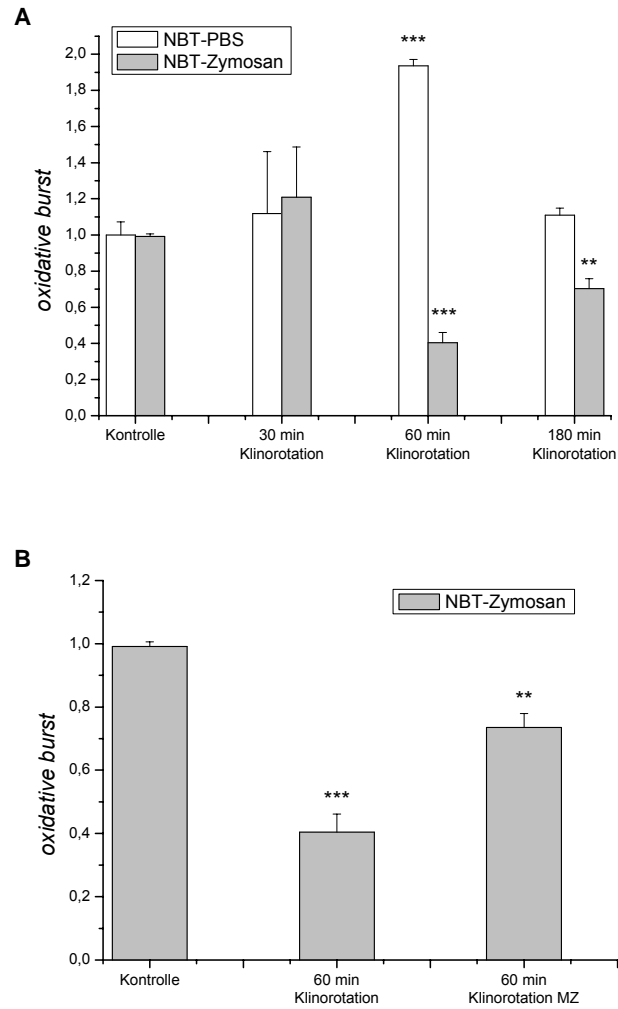
Die Phagozytoserate der Zellen war nach 30 min Klinorotation signifikant vermindert. Bei längerer Inkubation glich sich dieser Effekt jedoch wieder aus. Abbildung 60 zeigt den zeitlichen Verlauf der veränderten Phagozytoserate. Keine der in Tabelle 40 (Anhang) aufgeführten sonstigen Behandlungen, beispielsweise die Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Cadmium oder

100  $\mu$ M Hydrocortison führte zu einer signifikanten Veränderung der Phagozytoseaktivität, auch nicht der Zusatz von Methylzellulose.



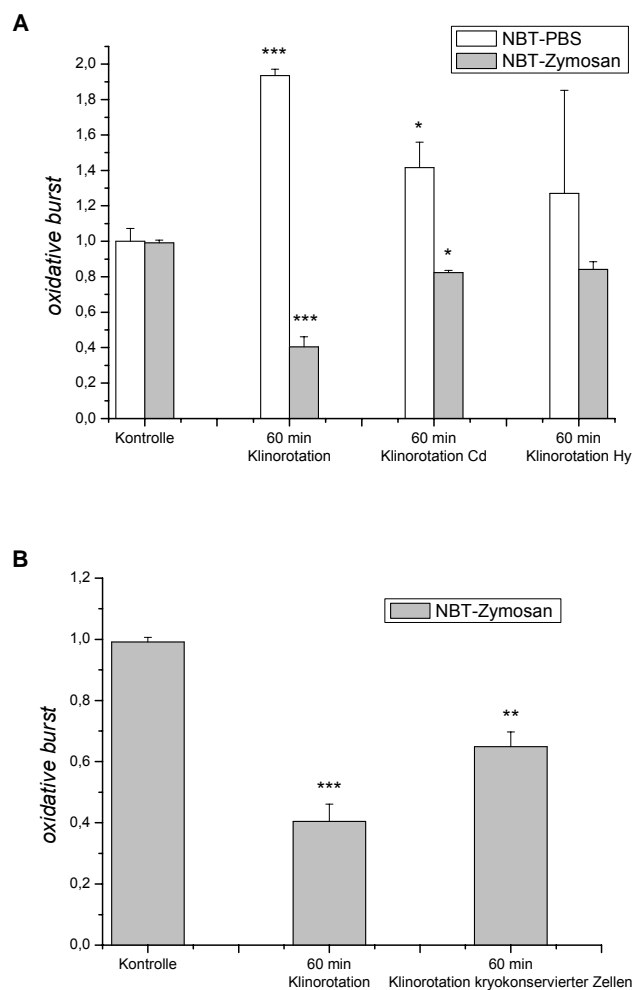
**Abbildung 60** Einfluss von Klinorotation auf den Phagozytoseindex (PI) der Zelllinie NR8383 (normalisierte Werte).

Die Produktion an ROS verändert sich unterschiedlich durch Klinorotation, je nachdem ob Phagozytose stattfindet oder nicht. Die Phagozytose-vermittelte Radikalproduktion wird durch Klinorotation vermindert und erfährt die stärkste Hemmung nach 60 min Inkubation. Die durch Stress bedingte, Phagozytose-unabhängige Radikalproduktion hingegen wird durch Klinorotation gesteigert und erreicht ebenfalls nach 60 min eine maximale Stimulation (Abb. 61A). Auch bei verminderter Sedimentation der Zellen durch Zusatz von Methylzellulose im Medium bleibt der hemmende Effekt auf die Phagozytose-vermittelte Radikalproduktion erhalten (Abb. 61B).



**Abbildung 61** Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383, ermittelt über die Oxidation von NBT-Zymosan bzw. NBT in Lösung (A); B: Oxidation von NBT-Zymosan nach 60 min Klinorotation mit normal viskosem bzw. mit 0,3 % Methylzellulose versetztem Medium (normalisierte Werte).

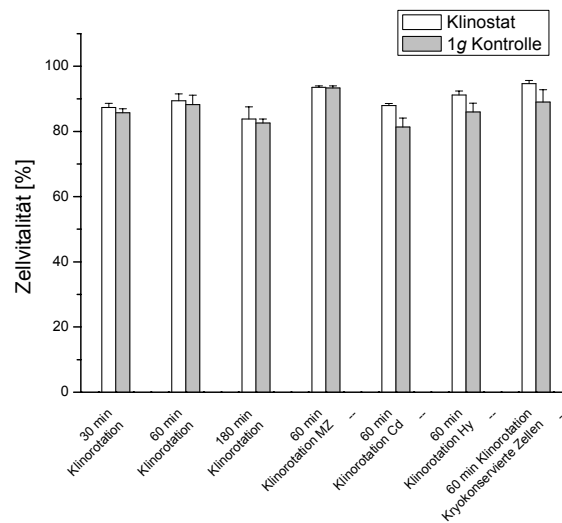
Auch bei Zugabe von Cadmiumchlorid (10  $\mu\text{M}$ ) während 60 min Klinorotation bleiben die oben beschriebenen Effekte erhalten, wenn auch in etwas abgeschwächter Intensität. Bei Zugabe von Hydrocortison (100  $\mu\text{M}$ ) lässt sich kein signifikanter Effekt durch Klinorotation feststellen (Abb. 62A). Kryokonservierte und für 3 h regenerierte Zellen zeigen ebenso wie die Zellen, die frisch aus einer Kultur entnommen wurden eine Hemmung der Phagozytosevermittelten Radikalproduktion nach 60 min Klinorotation (Abb. 62B).



**Abbildung 62** Einfluss von Klinorotation auf die Radikalproduktion der Zelllinie NR8383 unter Zusatz von Cadmium bzw. Hydrocortison (A), ermittelt über die Oxidation von NBT-Zymosan bzw. NBT in Lösung; B: Radikalproduktion von Zellen aus Kultur bzw. frisch regenerierten, kryokonservierten Zellen (normalisierte Werte).

Um zu überprüfen, ob Klinorotation einen Einfluss auf die Vitalität der Zellen hat, wurde bei jeder Einzelprobe stets die Vitalität mittels Trypanblaufärbung getestet. In keinem der Experimente war eine signifikant erhöhte Mortalität nachzuweisen. Abbildung 63 zeigt

stellvertretend für alle Ergebnisse die Zellvitalitäten nach der Phagozytose von FITC-Zymosan.



**Abbildung 63** Zellvitalität von klinorotierten NR8383-Zellen nach FITC-Zymosan Phagozytose, ermittelt über Trypanblaufärbung

### 4.3.2 Magnetische Levitation

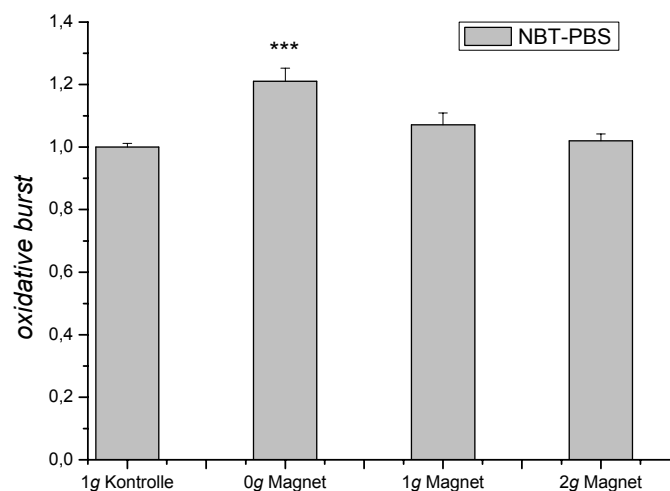
Durch die Platzierung eines Objekts in einem sehr starken magnetischen Gradienten ist es möglich, diamagnetische Stoffe schweben zu lassen. Die der Schwerkraft entgegengesetzten Kräfte wirken dabei auf molekularer Ebene.

Am physikalischen Institut der Universität Nottingham, wo sich der verwendete supraleitfähige Magnet befindet, war keine Kultivierung der Zellen möglich. Aus diesem Grund wurden vorher zu gleichen Teilen aliquotierte, kryokonservierte Zellen verwendet, wie sie auch für das Weltraumexperiment vorgesehen sind. Die Zellen wurden vor jedem Experiment aufgetaut und, im Gegensatz zu den Klinostatenexperimenten jedoch nur für ca. 20 min in kaltem Medium regeneriert.

Ebenfalls wie bei der Klinorotation ist während der Inkubation im supraleitfähigen Magneten keine gleichzeitige Messung möglich. Die Phagozytoseaktivität wurde mikroskopisch bestimmt, die Produktion von ROS wurde durch die Oxidation von NBT-Zymosan bzw. Phagozytose-unabhängig mit NBT in PBS-Lösung ermittelt. Die Inkubationszeit im Magneten betrug stets 90 min. Wie bei den Klinostatenversuchen konnten auch hier jeweils nur 2 Wiederholungen pro Experiment durchgeführt werden. Veränderungen in der Gesamtsignalstärke wurden wiederum durch die Normalisierung der Mittelwerte der 1g

Kontrollen außerhalb des Magnetfeldes ausgeglichen. Tabelle 41 fasst die gewonnenen Ergebnisse mit normal viskosem Medium zusammen, Tabelle 42 jene, die in Methylzellulose-Medium gewonnen wurden.

Wie in Tabelle 41 (Anhang) ersichtlich sind in Normalmedium keine signifikanten Veränderungen, weder der Phagozytoseaktivität, noch der ROS-Produktion festzustellen. Es lässt sich also auch kein Unterschied zwischen den Proben innerhalb des Magnetfeldes im Vergleich zur Kontrolle außerhalb des Magnetfeldes detektieren. Bei verminderter Sedimentation in Methylzellulose-Medium (Tab. 42 Anhang) konnte jedoch ein signifikanter Anstieg der Phagozytose-unabhängigen Radikalproduktion an der 0g Position im Magnetfeld nachgewiesen werden (Abb. 64). Der Vergleich der 1g-Kontrollposition außerhalb des Magnetfeldes mit der 1g-Magnetposition lieferte ebenso wie mit der 2g-Magnetposition keine unterschiedlichen Absorptionswerte. Auch wenn die Mittelwerte des Anteils phagozytischer Zellen in Methylzellulose-Medium niedriger scheinen als in Normalmedium, sind die Abweichungen zu groß, als dass der Unterschied signifikant wäre.



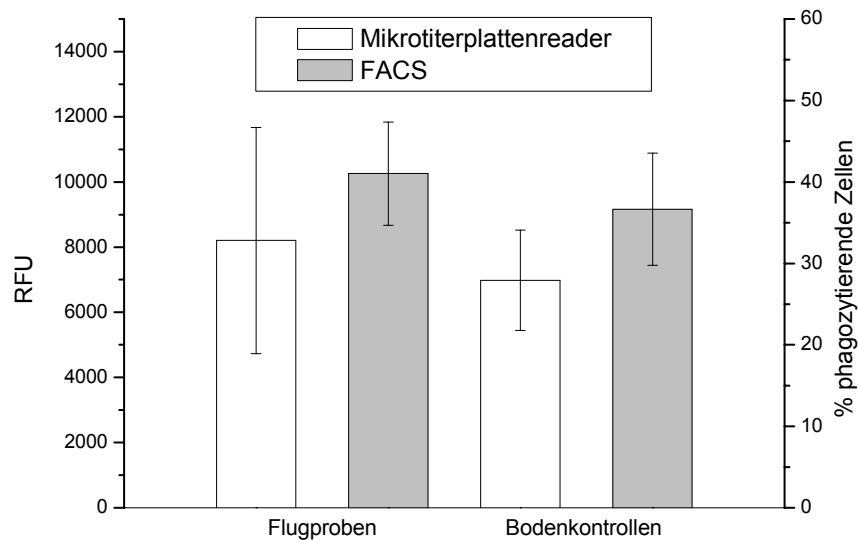
**Abbildung 64** Einfluss von magnetischer Levitation auf die stressbedingte ROS-Produktion der Zelllinie NR8383, ermittelt über NBT-PBS in mit Methylzellulose versetztem Medium (normalisierte Werte).

### 4.3.3 Parabelflug

Bei einem Parabelflugexperiment wurde der Einfluss wechselnder Schwerkraftbedingungen auf die Phagozytoseaktivität der Zelllinie NR8383 überprüft. Hierzu wurden die Zellen nach 43 min und 15 Parabelmanövern Phagozytose von FITC-Zymosan fixiert und nach Freising transportiert.



Die Auswertung fixierter Zellen ergab keine Unterschiede in der Phagozytoserate. Alle drei Auswertungsmethoden der FITC-Zymosan-Proben wurden durchgeführt, jedoch traten enorm hohe Schwankungen bei allen Analysen auf. Die Ergebnisse der Auswertung im Mikrotiterplattenreader (in RFU) sowie der FACS-Analyse (durch den prozentualen Anteil phagozytischer Zellen im Vergleich zu nicht phagozytischer Zellen, bei 0°C inkubierten Zellen), sind in Abbildung 65 aufgetragen.



**Abbildung 65** Einfluss von wechselnden Schwerkraftbedingungen im Parabelflug auf die Phagozytoserate der Zelllinie NR8383, ermittelt fluorimetrisch im Mikrotiterplattenreader (RFU) sowie mittels FACS-Analyse (% phagozytische Zellen). Mittelwerte  $\pm$ SE.

---

## 5 Diskussion

### 5.1 Optimierung des TRIPLE-LUX Weltraumversuchs und Anpassung der Nachweissysteme

#### 5.1.1 Auswahl der Zellen

Für den TRIPLE-LUX Weltraumversuch waren zunächst polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) vorgesehen, da sie bei der Phagozytose einen ausgeprägten *oxidative burst* entwickeln. Keine der beschriebenen Zelllinien als Modell für neutrophile Granulozyten brachte die Eigenschaft mit, einfach und zuverlässig zum *oxidative burst* stimuliert werden zu können, weshalb primäre PMNs und Monozyten aus Schafblut isoliert wurden.

Entscheidend war eine große Ausbeute an PMNs mit gleichen Eigenschaften aus einer Aufreinigung. Die größte Ausbeute lieferte das Verfahren nach Calson und Kaneko (1973) mit maximal  $1,1 \times 10^9$  Zellen/l Blut. Somit konnte die erwartete Zellzahl, die im Blut durchschnittlich zwischen  $2 \times 10^9$  und  $8 \times 10^9$  liegt, annähernd erreicht werden. Die restlichen Reinigungsverfahren lieferten eine zu geringe Ausbeute, vor allem die der primären Monozyten. Aufgrund der starken Schwankungen der einzelnen Zellchargen war eine Standardisierung des Luminoltests mit Primärzellen jedoch nicht möglich. Die aliquotierten und kryokonservierten Zellen aus einem Ansatz lieferten nur eine begrenzte Anzahl zum Vergleich verschiedener Testwiederholungen. Die unterschiedlichen Reaktionen der Primärzellen resultierten vermutlich aus Schwankungen des Aktivitätsstatus. PMN müssen aktiviert sein, bevor ein weiterer Stimulus den *oxidative burst* auslösen kann. Das *priming* (Zeller und Sullivan 1992; Watson und Edwards 1996) der PMN richtet sich nach dem jeweiligen Immunstatus des Tieres, so kam es vermutlich zu den unterschiedlich aktivierbaren PMN-Chargen.

Aus diesem Grund wurden verschiedene Makrophagen-Zelllinien auf ihre Fähigkeit zum *oxidative burst* untersucht. Als geeignete Zelllinie erwies sich die Makrophagen-Linie NR8383 aus *Rattus norvegicus*. Wie in Helmke *et al.* (1989) beschrieben, liefert diese Zelllinie ein gutes Modellsystem, das viele ursprüngliche Makrophageneigenschaften erhalten hat. Die semiadherenten Zellen mussten vor dem Test aus den Zellkulturflaschen geerntet werden. Wie Abbildung 23 auf Seite 61 zeigt, verzögerte sich das Luminolsignal enorm bei der Ernte durch Trypsinieren. Da Trypsin unselektiv Peptidbindungen hinter Lysin und Arginin spaltet, werden neben den Adhäsionsmolekülen sämtliche nach außen gerichteten

Proteine an der Plasmamembran angegriffen, was zu einer zeitweiligen Beeinträchtigung der Phagozytoseleistung und der Signalverarbeitung der Zellen führen kann. Aus diesem Grund wurden die Zellen zukünftig durch Abschaben geerntet. Im Weltraumexperiment ist keine Ernte der Zellen erforderlich, da sie in Kulturbeuteln aus Biofolie ständig leicht bewegt werden, wodurch das Adhärenz verhindern wird.

Wichtig für das Weltraumexperiment ist außerdem die Tatsache, dass die eingesetzte Zellzahl proportional zum erhaltenen Luminolsignal ist (Abb. 24). Vor dem Experiment wird die Zahl der in die Messbeutel überführten Zellen automatisch durch Videomikroskopie bestimmt. Eventuelle Schwankungen der eingesetzten Zellzahl können somit nachträglich mit dem erhaltenen Luminolsignal verrechnet werden. Da kein Signal durch mechanische Stimulation im „TRIPLE-LUX-breadboard“ ausgelöst wurde (Abb. 26) konnte gezeigt werden, dass die vorgesehenen mechanischen Injektionsverfahren kein falsch positives Luminolsignal durch stressbedingte Aktivierung der Zellen auslösen.

### 5.1.2 Kryokonservierung der Zellen

Beim Transport zur und der Lagerung der Zellen auf der ISS ist kein flüssiger Stickstoff vorhanden. Daher wurde die Kryokonservierung der Zellen bei verschiedenen höheren Lagertemperaturen (-20°C, -70°C, -80°C) getestet. Die zwei größten Probleme bei der Kryokonservierung sind Austrocknen und mechanische Zerstörung durch Kristallbildung. Sie wurden bereits von Mazur *et al.* (1972) in der so genannten „Zwei-Faktoren-Hypothese“ zusammengefasst. Ein Schrumpfen der Zellen durch zu schnelle Diffusion von Wasser in den gefrierenden Extrazellulärraum entsteht bei zu langsamem Einfrieren. Zu schnelles Einfrieren führt zu einer massiven Bildung großer intrazellulärer Eiskristalle. Eine genau definierte und auf den Zelltyp abgestimmte Einfriergeschwindigkeit, unter Zugabe von Gefrierschutzmitteln ist demnach von großer Bedeutung. Alle Proben wurden unter definierten Standardbedingungen eingefroren (1°C pro min), bis die zu testende Endtemperatur erreicht war. Heiko Zimmermann vom Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik in Ingbert fasste die verschiedenen Phasen bei der Kryokonservierung und die möglichen Schädigungen sehr anschaulich zusammen (Zimmermann, Informationsbroschüre Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik). Zwischen -15°C und -25°C beginnt in den Zellen die Bildung von Eiskristallen, was zu einer Entmischung und Delokalisierung der Zytoplasmabestandteile führt. Da das Volumen der Eiskristalle um 1/11 größer ist als das der Wasserphase, kann der daraus resultierende mechanische Stress zu Zellschädigungen führen. Aufkonzentrierte Ionen

an den Eisfronten führen zusätzlich zu Potenzialgradienten mit ebenfalls schädigender Wirkung (Workman-Reynold-Effekt, dielektrischer Durchbruch der Biomembran). Diese Effekte sorgten dafür, dass keine Zellen die Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  überlebten, auch nicht nach vorherigem Abkühlen auf  $-80^{\circ}\text{C}$  für mehrere Wochen. Zwischen  $-25^{\circ}\text{C}$  und  $-130^{\circ}\text{C}$  wachsen die (durch die Kryoprotektiva klein gehaltenen) Eiskristalle weiter an. Diese Umkristallisation schädigt die Zellen sehr stark, der Effekt findet aber bei geringer werdenden Temperaturen immer langsamer statt. Trotz der tiefen Temperaturen können Wassermoleküle aufgrund der thermischen Stöße weiter ihre Position wechseln, wodurch die großen Eisdomänen auf Kosten der kleineren Kristalle wachsen können. Diese Diffusion geschieht entsprechend  $k \times T$  ( $k$  = Boltzmann-Konstante,  $T$  = Temperatur), was erklärt, weshalb bei einer Lagerung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  die Mortalität der Zellen wesentlich größer war als bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Erst ab einer Temperatur von unter  $-130^{\circ}\text{C}$  kommen die Diffusionsprozesse nahezu vollständig zum Erliegen. Für das Weltraumexperiment bedeutet dies, dass der Transport und die Lagerung der Zellen nicht unter  $-80^{\circ}\text{C}$  erfolgen dürfen.

Auch die Auftaugeschwindigkeit und –temperatur ist von großer Bedeutung für das Überleben der Zellen. Entscheidend dafür, ob das Auftauen schnell in warmem Medium oder langsam in kühlem Medium erfolgen soll, ist, auf welche Weise die Zellen vorher eingefroren wurden (Gao und Critser 2000). Haben sich viele Eiskristalle in den Zellen durch schnelles Einfrieren gebildet, ist sehr schnelles Auftauen in warmem Medium erforderlich. Bei stark dehydrierten Zellen durch langsames Einfrieren regenerieren diese sich besser bei kühleren Temperaturen (Raumtemperatur). Die in dieser Arbeit gewählte Form des Einfrierens scheint eine Dehydrierung zu begünstigen, da die besten Regenerationsergebnisse bei Raumtemperatur erzielt wurden. Die  $37^{\circ}\text{C}$  warme Auftautemperatur führte zu raschem Tod der Zellen, vermutlich durch osmotische Probleme beim Auftauen. Zu kühle Temperaturen ( $12^{\circ}\text{C}$ ) wiederum führten ebenfalls zu hohen Sterberaten, vermutlich durch das lange Einwirken des zelltoxischen DMSO.

### 5.1.3 Optimierung der Einzelkomponenten

#### – Zymosan

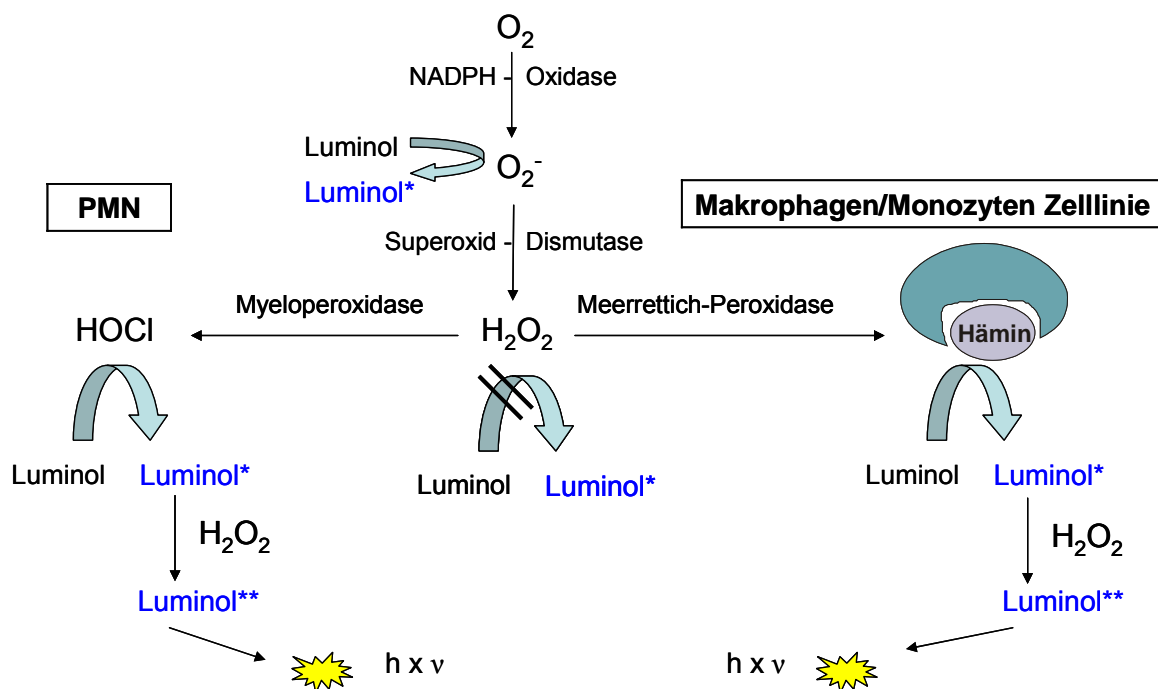
Verschiedene Phagozyten erkennen zum Teil mit unterschiedlichen Rezeptoren die aufzunehmenden Partikel. So tragen PMN und Makrophagen auch unterschiedliche Rezeptoren auf ihrer Plasmamembran. Ein Weg der Zymosanererkennung läuft beispielsweise über den kürzlich entdeckten Dectin-1-Rezeptor Weg (Gross *et al.* 2006). Toll-like-

Rezeptoren (TLR) zählen zu den wichtigsten Zymosan-Rezeptoren, wie beispielsweise TLR-2 bzw. TLR-2/6-Heterodimere bei Makrophagen (Underhill *et al.* 1999). Die unterschiedliche Verteilung der Rezeptoren erklärt auch die unterschiedliche Reaktion von PMN und Makrophagen auf nicht-opsoniertes Zymosan. Während Makrophagen Zymosan direkt erkennen und der Signalweg zur Aktivierung der NADPH-Oxidase ausgelöst wird, reagierten PMN in diesem Falle nur auf opsoniertes Zymosan. Hier treten andere Rezeptoren in den Vordergrund zur Erkennung von Komplementfaktoren und Fc-Fragmenten. Dass Opsonierung zu einer Verstärkung der Phagozytose und des *oxidative burst* führen, ist bereits hinlänglich bekannt (Janeway *et al.* 2002) und bei der Phagozytose von NBT-markiertem Zymosan deutlich erkennbar (Abb. 27). Der Kontakt mit nicht-opsoniertem Zymosan führte zu einer leicht erhöhten Produktion an extrazellulären ROS, detektiert mithilfe des OxyBURST®-Reagenz. Dies zeigt ebenfalls, dass unterschiedliche Signalwege durch die Bindung der zu phagozytierenden Partikel an unterschiedliche Rezeptoren ausgelöst werden. Extrazelluläre ROS werden neben ihrer Funktion zur Abwehr extrazellulärer Pathogene auch als Signalmoleküle diskutiert, die wieder in die Zelle (und in Nachbarzellen) diffundieren können und dort die Signaltransduktion beeinflussen (Sanlioglu *et al.* 2001; DeYulia *et al.* 2005).

– Meerrettichperoxidase (HRP)

Die Zugabe von Meerrettichperoxidase (HRP) in den Luminoltest erwies sich als notwendig für die Zelllinie NR8383. Auch die standardmäßig in der Kriminalistik verwendete Luminolreaktion zum Nachweis von Blut wird durch das Eisen im Häm katalysiert, das auch Zentralatom der Peroxidase ist. Katalysator im klassischen Luminol-Schülerversuch ist Kaliumhexacyanoferrat. Dahlgren und Stendahl (1983) zeigten, dass bei PMN die Luminolreaktion nur bei normal exprimierter oder exogen zugeführter Myeloperoxidase funktioniert. Da Makrophagen keine Myeloperoxidase-Aktivität aufweisen (Adams und Marino 1984; el-Hag *et al.* 1986; Klebanoff 1991; Lincoln *et al.* 1995), muss für die erforderliche Hämkatalyse des Luminols (Lundqvist *et al.* 1995) eine Peroxidase zugeführt werden. Lefkowitz *et al.* (1997) steigerten durch die Zugabe von Eosinophil-Peroxidase bei PMN das Luminolsignal. Luminol erwies sich als membranpermeabel (Dahlgren und Karlsson 1999), dadurch kann mit Luminol sowohl die extrazelluläre, als auch die intrazelluläre Radikalproduktion verfolgt werden. Wie in der in Abb. 11 (S. 39) dargestellten Luminolreaktion ersichtlich, findet diese in zwei Schritten statt, wovon der erste Oxidationsschritt mehr Energie erfordert als der zweite (Allen 1986). Abbildung 66 fasst die

erforderlichen Schritte für eine Luminolreaktion bei beiden Zelltypen nach den Vorschlägen von Allen (1986) zusammen. Monozyten exprimieren geringe Mengen an Myeloperoxidase und liefern im Luminoltest ein geringeres Signal als PMN, das durch die Zugabe von HRP verstärkt werden kann (Johansson und Dahlgren 1989). Über den genauen Ablauf der Luminolreaktion und die beteiligten ROS gibt es viele Kontroversen. Nach Van Dyke *et al.* (2003) dient Luminol zum Nachweis von Peroxynitrit. Faulkner und Fridovich (1993) postulieren, dass Superoxid erst im zweiten Oxidationsschritt mit Luminol reagiert und Luminol wegen einer möglichen Autooxidation durch selbst generiertes Superoxid nicht zu dessen Nachweis geeignet ist. Jedoch zeigten alle Negativkontrollen, die bei jedem Test mit unstimulierten Zellen (ohne Zymosan- bzw. PMA-Zugabe) durchgeführt wurden, kein oder nur ein sehr schwaches Luminolsignal, so dass eine Autooxidation von Luminol bei den in dieser Arbeit gemessenen Reaktionen ausgeschlossen werden kann. Luminol dient daher generell zum Nachweis des *oxidative burst* und einer Vielzahl der dabei gebildeten ROS.



**Abbildung 66** Schematische Darstellung der Oxidation von Luminol in verschiedenen Zelltypen. Die Luminolreaktion erfordert eine Häm-Katalyse im ersten, energiereicheren Oxidationsschritt. In PMN wird dies durch das Enzym Myeloperoxidase verursacht. Bei Makrophagen, die keine Myeloperoxidase exprimieren, kann die Luminolreaktion durch die Zugabe von exogener Meerrettichperoxidase ausgelöst werden.

Die verschiedenen Lagerungsmöglichkeiten für das Weltraumexperiment führten alle zu unterschiedlichen Luminol-Kinetiken. Eine gemeinsame Lagerung von HRP mit einer weiteren Komponente der Reaktion ist notwendig, da die Anforderung für die Zugabe von HRP erst zu einem späteren Zeitpunkt auftrat. Für die anfangs vorgesehenen PMN war, wie oben beschrieben, keine externe Peroxidase notwendig. Daher ist in der TRIPLE-LUX

*hardware* kein extra Behältnis für HRP vorgesehen. Für die Makrophagenzelllinie NR8383 musste dies nachträglich in den Ablauf integriert werden. Als beste Möglichkeit hat sich die Lagerung zusammen mit Zymosan erwiesen. Diese Variante lieferte dieselbe Kinetik wie mit frisch zugesetzten Komponenten. Bei der gemeinsamen Lagerung mit Luminol kam es zu einer Abschwächung des Signals. Vermutlich reagiert Luminol mit dem Enzym vorab unter Verbrauch einer oder beider Komponenten, so dass beim Start der Reaktion nicht mehr ausreichend Substrat zum ROS-Nachweis vorhanden ist. Wieso es bei dreistündiger Inkubation bei 37°C im Behältnis mit den Zellen zu einer Verzögerung der Reaktion bei ansonsten fast gleich bleibender Signalstärke kommt, konnte nicht geklärt werden. Dass selbst nach 3 h Inkubation bei 37°C HRP noch ein starkes Luminolsignal begünstigen kann, beweist die hohe Stabilität dieses Enzyms im Vergleich zu vielen anderen Enzymen. Ein von Xu *et al.* (2002) entwickelter Biosensor mit immobilisierter HRP konnte zeigen, dass Meerrettichperoxidase nach 3 h bei 50 °C lediglich 40 % seiner Aktivität verloren hat, bei 25°C waren es nur 10 %. Für die Lagerungstests wurde zehnfach konzentrierte HRP eingesetzt. Dies ist demnach vollkommen ausreichend für eine genügend hohe Signalstärke bei gemeinsamer Lagerung mit Zymosan.

#### 5.1.4 Der Einfluss von Temperatur

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist für ein automatisiertes *in vitro*-Testsystem, mit dem große Probenmengen *gescreent* werden sollen, von vorrangiger Bedeutung. Die Einhaltung einer konstanten Temperatur, hier der physiologischen Körpertemperatur, erwies sich für den Luminoltest als entscheidendes Kriterium für einen zuverlässigen Nachweis immuntoxischer Wirkungen. Am Beispiel von Hydrocortison ist sehr deutlich zu erkennen, dass sich je nach Temperatur unterschiedliche Auswirkungen der Exposition zeigen (Abb. 31 S. 67). Dies ist nicht weiter verwunderlich, wenn man bedenkt, dass alle biochemischen Reaktionen temperaturabhängig sind. Bereits sehr frühe Studien diskutieren eine durch Hydrocortison ausgelöste Hypothermie (Woodward *et al.* 1951; Kass 1955). Hydrocortison hemmt die Ausschüttung von Pyrogenen bei menschlichen Leukozyten (Dillard und Bodel 1970), so ist es auch nahe liegend, dass Temperaturveränderungen die Sensitivität der Zellen und deren Radikalproduktion beeinflussen. Während kurzzeitige Temperaturveränderungen, wie beispielsweise ein Hitzeschock bis zu 60°C für 1,2 s, keinen Einfluss auf die Radikalproduktion zu haben scheinen (Fildes *et al.* 1998), potenzierte sich beispielsweise der Einfluss von Acetaminophen auf die ROS-Produktion bei PMN, gemessen im Luminoltest

---

(Shalabi und al-Tuwajjri 1996). Um beim *screening* verschiedener Einflüsse auf die ROS-Produktion keine Beeinflussung oder gar Verfälschung durch den Temperatureffekt zu erhalten, ist es daher sehr wichtig, während der Messung 37°C zu gewährleisten.

### 5.1.5 Vermeidung von Sedimentation

Schwereleose Zellen sedimentieren nicht. Da sich in den Kontrollversuchen bei 1g die Zellen jedoch am Grund der Reaktionsgefäße sammeln, könnten gemessene 0g-Effekte auch auf die ausbleibende Sedimentation der Zellen, anstatt auf die erfahrene Mikrogravitation, zurückzuführen sein. Um diesen Effekt zu untersuchen, wurde eine viskose Trägersubstanz gesucht, die ohne Beeinträchtigung der Zellfunktion das Absinken der Zellen bei 1g verlangsamt bzw. ganz verhindert.

Das aus D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalactose bestehende Polysaccharid Agarose führte bei Zugabe zum Zellkulturmedium auch ohne Aktivierung der Zellen zu einer Radikalproduktion. Dieser Effekt wurde bisher noch nicht beschrieben. Vermutlich binden die Zuckerreste der Agarose an die Zellmembran und aktivieren die Zellen auch ohne einen Stimulus. Neben der Aktivierung über Kontaktrezeptoren ist auch eine mechanische Aktivierung der Zellen denkbar. Die langkettigen Zuckerketten könnten an mehrere Rezeptoren gleichzeitig binden, wodurch es zu Spannungen in der Plasmamembran und dem Zytoskelett kommt. In Myoblasten wurde vor kurzem die Aktivierung von spannungssensitiven Ionenkanälen über *stress fibers* beschrieben (Formigli *et al.* 2007). Dabei spielen *focal adhesions* eine große Rolle, also die Kontaktpunkte zwischen dem Aktin-Zytoskelett und der extrazellulären Matrix. Neben Strukturproteinen enthalten *focal adhesions* auch viele Proteine mit Signaltransduktionsaktivität, wie beispielsweise *focal adhesion kinase* und *src*, die wiederum die MAPK und PI-3-K/AP I Kaskaden in Gang setzen (Schoenwaelder und Burridge 1999; Yu *et al.* 2000; Goel und Dey 2002; Khurana und Dey 2003). Eine Aktivierung der Zellen durch Agarose über *focal adhesions* könnte daher vielleicht eine Erklärung für die Zymosan-unabhängige ROS-Produktion darstellen. Denkbar wären aber auch osmotische oder toxische Effekte durch die Agarose. Beim Krankheitsbild der Galactosämie ist der Galactosestoffwechsel aufgrund eines Enzymdefekts gestört (Stryer 1995). Der Zucker wirkt sich toxisch auf die Körperzellen aus, was durch die hohen Konzentrationen im umgebenden Medium auch in diesem Experiment aufgetreten sein könnte.



Die Glukoseketten der Methylzellulose riefen keine durch Radikalbildung nachweisbare Aktivierung der Zellen hervor. Als optimale Konzentration erwies sich der Bereich zwischen 0,2 – 0,3 %, wodurch das Absinken der Zellen um ca. 1,5 h verhindert werden konnte, ohne dabei die Phagozytoserate der Zellen zu beeinträchtigen (Tab. 40 Klinorotation). Die Signalstärke im Luminolassay, sowie bei der Oxidation von NBT, war insgesamt in Methylzellulose-supplementiertem Medium etwas erniedrigt. Abb. 32 zeigt aber exemplarisch für Hydrocortison, dass die beobachteten Veränderungen bei Zugabe von immunstimulierenden Substanzen unverändert blieben, wenn die Reaktion in viskoserem Medium stattfand.

## **5.2 Vergleich der Bioassays zum Nachweis immunmodulatorischer Einflüsse, ein Methoden- und Zelltypvergleich**

Der für den Weltraumversuch gewählte Luminoltest wurde in der Vergangenheit vielfach für den ROS-Nachweis bei PMN benutzt. Da bisher nicht genau geklärt werden konnte, welche reaktiven Sauerstoffspezies genau mit Luminol reagieren und die exakte Kinetik des Assays nicht geklärt ist, wird dieses Verfahren teilweise kritisch diskutiert. Fäldt *et al.* (1999) vermuten sogar, dass Luminol die Signaltransduktion in PMN beeinflussen kann. In dieser Arbeit sollte anhand verschiedener Testsubstanzen untersucht werden, ob der Luminolassay ein zuverlässiges und gut automatisierbares Testsystem darstellt. Dafür wurden verschiedene Nachweissysteme zum Vergleich herangezogen, die intra- und extrazellulär produzierte ROS detektieren. Um festzustellen, ob Unterschiede in der Radikalproduktion auf eine Beeinflussung der Phagozytoserate zurückzuführen sind, ging in der Regel jedes *screening* einer Testsubstanz auch mit einem Phagozytoseassay einher.

### **5.2.1 Das Schwermetall Cadmium**

Cadmium ist ein ubiquitär vorkommendes Schwermetall. Es wird primär für Schutzüberzüge verwendet, geringere Mengen finden sich aber auch in Legierungen, Batterien, Düngemitteln und Stabilisatoren sowie im Klärschlamm und Hausmüll. Die Hauptbelastung besteht durch mit Verbrennungsabgasen verunreinigte Luft und durch Phosphatdünger, der je nach Herkunft einen unterschiedlichen Cadmiumgehalt aufweist (Fellenberg 1990; Greenwood und Earnshaw 1990). Die akute und chronische Toxizität von Schwermetallen, vor allem in höheren Dosen, ist allgemein bekannt (Zelikoff und Cohen 1996). Die immuntoxischen

Effekte der Schwermetalle hängen stark vom Metall, der Konzentration und vom jeweiligen Organismus ab. Viele Metalle zeigen eine Erhöhung der Immunkompetenz bei niedriger Dosierung und eine immunsuppressive Wirkung bei höheren Dosierungen. So führt zum Beispiel eine niedrige Dosis Arsen zu einer Erhöhung der Antikörperproduktion, eine hohe Dosis hingegen zu einer Inhibierung (Zelikoff und Cohen 1996). Der immunsuppressive Effekt von Cadmium ist schon sehr lange bekannt (Koller 1973; Gallagher und Gray 1981). Er lässt sich auf die direkte Schädigung der Zellmembran und der Organellen, aber auch auf Veränderungen der Signaltransduktionswege und enzymatische Systeme zurückführen (Cherian und Ferguson 1997). So kann es beispielsweise zur Substitution von Zink durch Cadmium im katalytischen Zentrum von Enzymen kommen, wodurch die Sensitivität und Substratspezifität verändert wird (Zhang *et al.* 1996). Henderson *et al.* (1988) konnten schon sehr früh zeigen, dass die für ein stabiles Membranpotential und konstanten intrazellulären pH-Wert während des *oxidative burst* verantwortliche  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Pumpe in der Plasmamembran durch Cadmium gehemmt wird. Irato *et al.* (2001) zufolge könnte die verminderte ROS-Detektion bei Makrophagen in Anwesenheit von Cadmium durch eine gesteigerte Metallothionein-Synthese herrühren. Dieses Molekül spielt eine große Rolle als Radikalfänger und wird durch die Anwesenheit von Schwermetallen induziert.

Die bei PMN gemessene Hemmung der Radikalbildung im Luminoltest, sowohl bei PMA-Stimulation als auch mit Zymosan, verdeutlicht diese immunsuppressive Wirkung. Dass bei der höchsten Cadmiumkonzentration (100  $\mu\text{M}$ ) in PMA-stimulierten PMN wiederum eine leichte Erhöhung der Radikalproduktion festzustellen ist, geht möglicherweise auf die Apoptose der Zellen zurück. Konzentrationen zwischen 10 – 100  $\mu\text{M}$  lösten in verschiedenen humanen Zelllinien Apoptose aus (Tsangaris und Tzortzatou-Stathopoulou 1998). Johanson *et al.* (1996) sowie Polyak *et al.* (1997) konnten zeigen, dass die p53-abhängige Apoptose mit einer erhöhten Radikalproduktion einher geht. Dafür spricht auch die veränderte Kinetik dieser Reaktion. Die maximale Konzentration an Radikalen war 15 min später erreicht als bei den Kontrollzellen ohne Cadmiumzugabe bei gleich bleibender Radikal-Totalproduktion. Dies weist darauf hin, dass entweder die beteiligten Enzyme stark beeinträchtigt wurden oder die detektierten ROS durch einen anderen Mechanismus freigesetzt wurden. Die Phagozytose-vermittelte Radikalproduktion bei Stimulation mit Zymosan wies diesen Effekt der höchsten Cadmiumkonzentration nicht auf. Bei PMN kam es zu keiner Beeinflussung der *lag*-Phase durch Cadmium. Die Graphik der PMA-stimulierten PMN lässt zwar eine Verzögerung vermuten, welche jedoch nicht signifikant ist. Die Messung wurde bei diesem Experiment etwas verzögert gestartet, weshalb die *lag*-Phase schwer zu bestimmen war. Die

Einzelkinetiken wiesen große Schwankungen in der *lag*-Phase auf, so dass keine signifikanten Unterschiede festzustellen waren.

Bei der mikroskopischen Auswertung der Phagozytoseaktivität der Makrophagen-Zelllinie NR8383 war anhand der DAPI-Färbung deutlich eine gesteigerte Apoptoserate bei 100  $\mu\text{M}$  Cadmium zu erkennen (anhand der Bildung von *apoptotic bodies*). Dies stützt die Vermutung, dass die oben beschriebene gesteigerte Radikalproduktion bei 100  $\mu\text{M}$  auf Apoptose zurückzuführen ist. Bei dieser Konzentration war in der mikroskopischen Auswertung auch die Phagozytoserate der Zelllinie NR8383 signifikant erniedrigt. Was zu einer Erhöhung der Phagozytose bei 10  $\mu\text{M}$  in der fluorimetrischen Auswertung im Mikrotiterplattenreader führte, konnte nicht geklärt werden. Die Daten lassen sich vermutlich auf einen Messfehler zurückführen.

Die ROS-Produktion der Makrophagen-Zelllinie NR8383 unterschied sich von den in PMN gemessenen Werten. Sowohl die Oxidation von NBT als auch des OxyBURST<sup>®</sup>-Reagenz wiesen eine erhöhte ROS-Produktion bei der höchsten Cadmiumkonzentration auf, im Luminolassay konnte bei dieser Konzentration nur eine Verminderung der Produktionsrate (Steigung) detektiert werden, die Totalproduktion und Maximalkonzentration blieben unverändert. Das OxyBURST<sup>®</sup> Ergebnis zeigt, dass die extrazelluläre Radikalkonzentration zunahm. Verglichen mit den unveränderten AUC-Werten aus dem Luminoltest, das intra- und extrazelluläre ROS detektiert, spricht dies für eine Hemmung der intrazellulären ROS-Produktion. Eine Diskrepanz ergibt sich im Vergleich mit der im NBT-Test gemessenen Erhöhung. Das an Zymosan gekoppelte NBT kann theoretisch sowohl durch intrazelluläre ROS nach Aufnahme im Phagosom als auch durch extrazelluläre ROS oxidiert werden. Demnach erwartet man im Luminoltest ähnliche Ergebnisse. Die Daten des NBT-Experiments ähneln jedoch mehr dem des OxyBURST<sup>®</sup>-Nachweissystems. Basierend auf der sehr stark verminderten Phagozytoseleistung bei 100  $\mu\text{M}$  könnte angenommen werden, dass überwiegend extrazelluläre Radikale detektiert wurden.

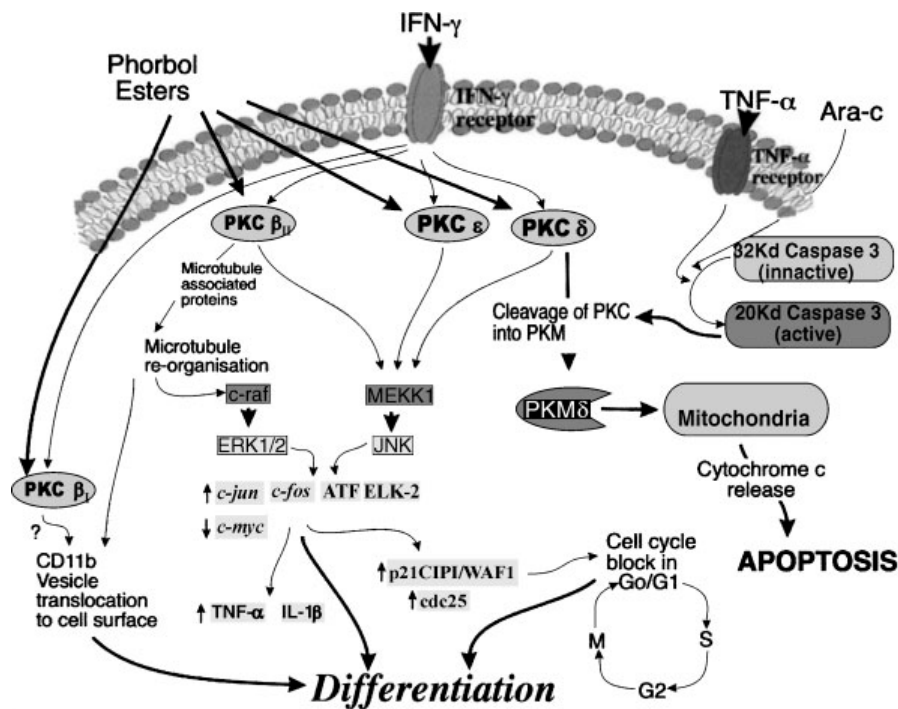
Die im Luminoltest festgestellte Stimulation der Radikalproduktion bei 100 nM Cadmium konnte im NBT-Assay ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Verglichen mit der unveränderten extrazellulären ROS-Konzentration deuten die erhöhten AUC und *peak*-Werte auf die Stimulation intrazellulärer ROS-Produktion hin. Dies ist, wie bereits weiter oben beschrieben (Zelikoff und Cohen 1996), ein häufig beobachteter Effekt bei Schwermetallen. Block *et al.* (1992) konnten zeigen, dass niedrige Cadmiumkonzentrationen die Produktion von Inositol-Triphosphat (IP-3) und die Ausschüttung von intrazellulärem Calcium begünstigen, was wiederum zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) führt, einem

Schlüsselenzym bei der Aktivierung des *oxidative burst* (Grzeskowiak *et al.* 1985). Auf eine Stimulation dieses Signaltransduktionsweges deutet auch die verkürzte *lag*-Phase der Reaktion bei niedrigen Konzentrationen hin. Bei unveränderter Phagozytoserate liegt eine direkte Beeinflussung der NADPH-Oxidase oder deren Aktivierungsmechanismus nahe.

### 5.2.2 Die Steroide Hydrocortison und 17 $\beta$ -Östradiol

Glucocorticoide wie die Steroidhormone Hydrocortison und 17 $\beta$ -Östradiol werden in der Nebenniere über die Vorstufe Progesteron gebildet. Glucocorticoide haben vielfältige physiologische Wirkungen. Sie beeinflussen den Stoffwechsel, den Wasser- und Elektrolythaushalt, das Herz-Kreislaufsystem und das Nervensystem. Ferner wirken sie entzündungshemmend und immunsuppressiv. Aus letzterem Grund wird Hydrocortison auch als Immunsuppressivum bei Autoimmunerkrankungen extern verabreicht, aber auch zahlreiche entzündungshemmende Salben basieren auf der Wirkung von Hydrocortison. 17 $\beta$ -Östradiol wird als Wirkstoff vieler Kontrazeptiva in großen Mengen an Frauen verabreicht. Die Wirkung der beiden getesteten Substanzen auf Phagozyten wird in der Literatur sehr kontrovers diskutiert.

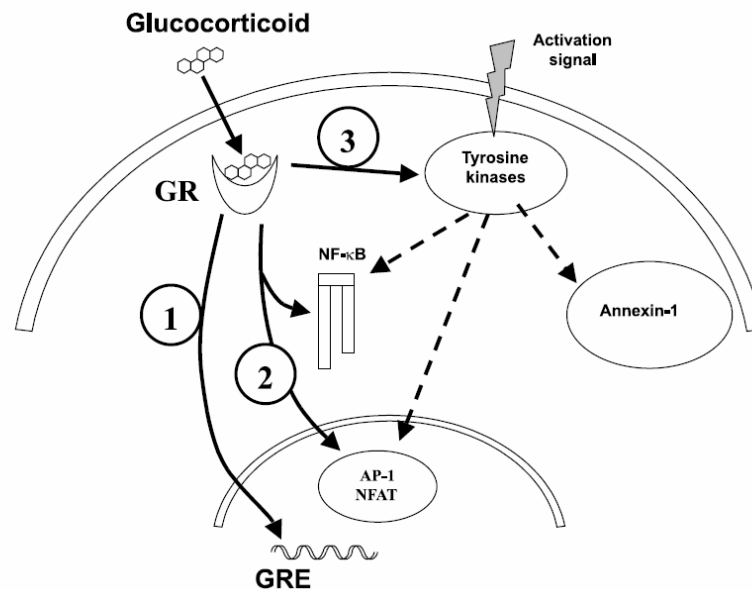
Bei PMN waren deutliche Unterschiede in der Reaktion auf Hydrocortison zu erkennen, wenn die Zellen entweder mit PMA oder mit Zymosan aktiviert wurden. In beiden Fällen war die Wirkung stimulierend, jedoch mit völlig unterschiedlicher Kinetik. Nach PMA-Stimulation war eine Erhöhung der Radikalproduktion bei niedrigen Konzentrationen (1 nM – 100 nM) festzustellen, jedoch ohne Einfluss auf die zeitlichen Parameter der Reaktion. Nach Zymosan-Stimulation konnte eine mit zunehmenden Konzentrationen immer stärker werdende Stimulation beobachtet werden, die in stark verkürzter *lag*-Phase (bis zu 19 min Unterschied) und der Zeit bis zur maximalen *peak*-Höhe (bis zu 33 min Unterschied) bei zunehmender Steigungsrate ihren Ausdruck findet. AUC sowie *peak*-Werte gleichen jedoch wiederum der Reaktion auf PMA. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Hydrocortison bei PMN an verschiedenen Stellen regulierend auf die Radikalproduktion einwirkt. Phorbolester wie PMA sind direkte Aktivatoren verschiedener Proteinkinase C (PKC)-Isoformen, wie in Abbildung 67 exemplarisch bei Monozyten veranschaulicht ist (Hatton *et al.* 2002). Für die Aktivierung der NADPH-Oxidase ist PKC wiederum von entscheidender Bedeutung, indem es beispielsweise die Untereinheiten p40<sup>phox</sup> und p67<sup>phox</sup> phosphoryliert (Babior 1999; Fontayne *et al.* 2002; von Knethen *et al.* 2005).



**Abbildung 67** Signaltransduktion bei Monozyten nach der Stimulation mit Phorbolestern (aus Hatton *et al.* 2002).

Hydrocortison in niedrigen Konzentrationsbereichen hat anscheinend einen direkten Einfluss auf PKC oder eines der nachfolgenden Signalmoleküle. Mouithys-Mickalad *et al.* (2004) konnten bei der Monozytenzelllinie THP-1 beispielsweise eine erhöhte Aktivierung von NF- $\kappa$ B und die erhöhte Expression von p22<sup>phox</sup>, einer NADPH-Oxidase-Untereinheit bei niedrigen Hydrocortisonkonzentrationen feststellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit bei *Chlamydia-primed* THP-1 Zellen, in denen auch die Ehylenproduktion gemessen wurde, ähneln sehr stark den PMA stimulierten PMN. Die Verkürzung der Reaktionszeit bei der Phagozytose von Zymosan deutet jedoch darauf hin, dass Hydrocortison auch einen direkten Effekt auf die Phagozytose oder die zeitlich vor der PKC-Aktivierung gelegene Signalverarbeitung haben kann. Belgi und Friedmann (2002) fassten die unterschiedlichen Wirkungsweise von Glucocorticoiden zusammen (Abb. 68). Demnach können an ihren Rezeptor gebundene Glucocorticoide neben ihrer allseits bekannten Funktion als Transkriptionsfaktoren auch direkten Einfluss auf Proteinkinasen nehmen und dadurch sehr schnelle Reaktionen in verschiedensten Signalverarbeitungsprozessen auslösen. Dies scheint der Fall zu sein bei phagozytierenden PMN, wohingegen die Wirkung auf PMA-stimulierte PMN eher auf eine Interaktion mit NF- $\kappa$ B zurückzuführen sein könnte. Die Aktivierung der NADPH-Oxidase bei phagozytierenden Zellen findet vermutlich über die klassischen Signalmoleküle Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) statt. IP<sub>3</sub> stimuliert die Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Reticulum durch eine Interaktion mit dem IP<sub>3</sub>-Rezeptor. DAG in

Kombination mit hohen cytoplasmatischen Calciumkonzentrationen aktiviert wiederum PKC (Tauber 1987; Morel *et al.* 1991).



**Abbildung 68** Wirkungsmechanismen von Glucocorticoiden: 1) direkte Wirkung als Transkriptionsfaktor, Aktivierung von Genen mit *glucocorticoid response element* (GRE) 2) Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren 3) direkte Interaktion mit Proteinkinasen zur Induktion von Phosphorylierung und Aktivierung weiterer Komponenten (aus Belgi und Friedmann 2002).

Die Makrophagen-Zelllinie NR8383 reagierte auf alle Hydrocortisonkonzentrationen mit einer erhöhten Phagozytose-vermittelten ROS-Produktion, gemessen im Luminoltest. Mit allen anderen Nachweissystemen konnte kein Einfluss des Steroids detektiert werden, auch nicht auf die Phagozytoserate. Dies deutet darauf hin, dass auch bei PMN keine Beeinflussung der Phagozytose stattgefunden hat, sondern dass die oben beschriebene Aktivierung einer Tyrosinkinase die veränderte Luminol-Kinetik bedingt. Auch bei NR8383 war die maximale *peak*-Höhe früher erreicht, die *lag*-Phase jedoch nur bei 1 nM Hydrocortison leicht verkürzt. Die Zeitverschiebungen bewegten sich hierbei jedoch nur im Bereich von 3 – 4 min und waren nicht so ausgeprägt zu beobachten wie bei den PMN.

Die Mikroglia-Zelllinie BV-2 reagierte im Gegenzug mit einer Reduktion der Radikalproduktion auf Hydrocortison, gemessen im NBT-Assay. Die Inhibition war bei 1  $\mu$ M Hydrocortison mit ca. 50 % am stärksten. Dies scheint auf den ersten Blick im Widerspruch zu den oben gezeigten Ergebnissen zu stehen. Da die Mikrogliazellen bei der Stimulation mit Zymosan im Luminoltest nur ein sehr schwaches Signal zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass sie als Reaktion auf diesen Reiz nur einen sehr schwachen *oxidative burst* zeigen. Lieb *et al.* (2003) berichteten von einer Inhibition der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) durch Hydrocortison in Mikrogliazellen. Ausgehend von diesen Erkenntnissen ist

anzunehmen, dass NBT unspezifisch sowohl durch ROS als auch durch RNS oxidiert wird und im Falle von Mikrogliazellen bei der Stimulation mit Zymosan überwiegend NO detektiert wurde.

Der bei PMN und Makrophagen beschriebene stimulierende Effekt steht im Widerspruch zu einigen früheren Arbeiten, in denen Hydrocortison als immunsuppressiv hervorgeht, wie beispielsweise bei Békési *et al.* (2000) in humanen PMN oder bei Weyts *et al.* (1998) in aus Karpfen isolierten neutrophilen Granulozyten. Fleming *et al.* (1991) konnten keine Veränderung der Superoxidanionproduktion in Phagozyten von Mäusen nachweisen, nachdem diese mit hohen Corticosteron-Dosen behandelt wurden. Mouithys-Mickalad *et al.* (2004) zeigten jedoch in ihrer Arbeit mit THP-1 Monozyten, dass die Wirkung von Hydrocortison abhängig ist vom *priming* der Zellen. Während in den *Chlamydia-primed* Zellen Hydrocortison, wie oben beschrieben, stimulierend wirkte, stellte sich bei LPS-behandelten THP-1 Zellen eine starke Inhibierung der ROS-Produktion ein. Auch Franchimont *et al.* (1999) kamen zu dem Ergebnis, dass die Empfindlichkeit für Glucocorticoide von der Art und dem Fortschritt eines Entzündungsprozesses abhängt und daher der physiopathologische Zustand eines Organismus entscheidend ist für die Wirkung von Glucocorticoiden.

Im Gegensatz zu Hydrocortison wurde beim Einsatz des Steroidhormons 17 $\beta$ -Östradiol kein Einfluss auf die Makrophagen-Zelllinie NR8383 nachgewiesen. Im Luminoltest zeichnete sich zwar wie bei Hydrocortison ein stimulierender Effekt ab, beim direkten Vergleich mit den Ethanolkontrollen wurde jedoch deutlich, dass geringe Ethanolkonzentrationen, wie sie durch das Verdünnen der alkoholischen Stammlösung entstehen, die ROS-Produktion stimulieren. Da mehrere Testsubstanzen in Ethanol-Stammlösungen angesetzt waren, wurde mit allen Assays der Einfluss von Ethanol bestimmt. Die Phagozytoserate, ebenso wie die ROS-Produktion gemessen über die Oxidation von NBT und OxyBURST<sup>®</sup>, wurde erst ab einer Konzentration von 1 ‰ EtOH beeinträchtigt. Da in allen Fällen geringere Endkonzentrationen erreicht wurden, war das Mitführen von EtOH-Kontrollen für diese Assays nicht mehr erforderlich. Im Luminoltest zeigte sich jedoch mehrfach, dass besonders geringe Alkoholkonzentrationen stimulierend wirken, weshalb in allen Experimenten mit Ethanol als Lösungsmittel nochmals alle Parameter des Luminoltests separat auf signifikante Unterschiede getestet wurden.

Jareo *et al.* (1996) stellten bei *in vivo* Tests mit Ratten nach 7 Tagen Ethanolgabe eine Hemmung der Radikalproduktion in PMN fest. Auch Morisaki (1989) berichtet von einer Hemmung der Superoxidproduktion humaner PMN durch Ethanol. Dies widerspricht dem in

dieser Arbeit festgestellten stimulierenden Effekt durch Alkohol. Kono *et al.* konnten hingegen in Kupffer-Zellen eine gesteigerte Radikalproduktion sowie die Aktivierung von NF- $\kappa$ B bei Mäusen mit EtOH-Infusion nachweisen (Kono *et al.* 2000; 2000). Nguyen *et al.* (1998) fanden keinen Einfluss der Lösungsmittel DMSO und Ethanol bis zu einer Konzentration von 0,3 % auf die Radikalproduktion differenzierter HL-60 Zellen. Die meisten Arbeiten übergehen jedoch den Einfluss des Lösungsmittels auf den *oxidative burst*.

Ebenso wie die Wirkung von Hydrocortison wird auch der 17 $\beta$ -Östradiol-Effekt sehr widersprüchlich diskutiert. Während Arbeiten mit bovinen (Winters *et al.* 2003) und humanen PMN (Shibuya *et al.* 1991) sowie mit PMN aus Pferden (Strzemiński *et al.* 1987) keinen Effekt durch 17 $\beta$ -Östradiol auf Phagozyten nachweisen konnten, deuten andere Experimente auf eine immunsuppressive Wirkung hin. So konnten beispielsweise Bodel *et al.* (1972) wie auch Békési *et al.* (2000) eine Hemmung der Superoxidation-Produktion und des *oxidative burst* in humanen PMN nachweisen. Wie oben beschrieben hängen die gemessenen Effekte meist stark vom Immunstatus des Organismus ab. Auch die *in vitro*-Konditionen, die gewählten Analysemethoden und die gewählten Versuchsspezies haben Einfluss auf die Ergebnisse, wie Wessendorf *et al.* (1998) in ihrem Review über den Effekt von 17 $\beta$ -Östradiol bestätigen.

Die Mikroglia-Zelllinie BV-2 reagierte mit einer Hemmung der Radikalproduktion um ca. 30 % ab einer Konzentration von 5 ng/ml. Dies widerspricht den Ergebnissen von Lieb *et al.* (2003), die keinen Einfluss auf die iNOS-vermittelte Radikalbildung durch 17 $\beta$ -Östradiol nachweisen konnten. Howard *et al.* (2001) zeigten dagegen eine Hemmung der ROS-Produktion in Mikrogliazellen, jedoch bei einer Konzentration von 100 nM. Dies übersteigt bei weitem die in dieser Arbeit festgestellte Reaktionsgrenze von 5 ng/ml (d.h. weniger als 1 nM). Die Arbeit von Bruce-Keller *et al.* (2000) wiederum stimmt weitgehend mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein. Im Konzentrationsbereich zwischen 100 pM und 10 nM wirkte sich 17 $\beta$ -Östradiol hier hemmend auf die Superoxidationproduktion in der N9 Mikroglia-Zelllinie aus. Bei 1 nM und 10 nM war dies auch verbunden mit einer geschwächten Phagozytoseaktivität. Bei der BV-2 Zelllinie wurde die Phagozytoseaktivität unter Einfluss von 17 $\beta$ -Östradiol nicht untersucht. Die in dieser Arbeit gemessene verminderte ROS-Produktion bei einer Konzentration von 5 ng/ml und 10 ng/ml könnte also auch die Folge einer verminderten Phagozytoseaktivität sein. Der *oxidative burst* bei Mikrogliazellen muss äußerst genau reguliert sein. Eine Überproduktion an ROS kann fatale Folgen für die umliegenden Neuronen haben. Die hier festgestellte Hemmung der ROS-Produktion deckt sich mit mehreren Erkenntnissen zur Wirkung von 17 $\beta$ -Östradiol *in vivo*. So



treten bei Frauen, die sich nach der Menopause einer Östrogensersatztherapie unterziehen, seltener ein Abbau kognitiver Fähigkeiten sowie Depressionen und Psychosen auf (Huber *et al.* 2001; Freeman *et al.* 2002; Sherwin 2002). Der Schweregrad des Krankheitsbildes von Multipler Sklerose schwächt sich bei Frauen in der Schwangerschaft meist ab, während viele postpartum einen neuen Schub erleiden (Birk *et al.* 1990; Confavreux *et al.* 1998). Dieser Verlauf korreliert mit den hohen bzw. niedrigen Östrogenspiegeln. Die alveolare Makrophagen-Zelllinie NR8383 war nicht so sensitiv gegenüber der Wirkung von 17 $\beta$ -Östradiol wie die Mikroglia-Zelllinie BV-2.

### 5.2.3 Cyclosporin A

Das zyklische, aus elf Aminosäuren bestehende Protein Cyclosporin, bzw. Cyclosporin A (CsA), wird aus zwei norwegischen *Ascomyceten* isoliert und vorwiegend in der Transplantationsmedizin und bei Autoimmunerkrankungen eingesetzt. Als Calcineurin-Inhibitor wirkt es durch die Dephosphorylierung von NF-AT (*nuclear factor of activated T cells*) vor allem suppressiv auf T-Zellen (Crabtree 1999).

In dieser Arbeit sollte die Wirkung auf die Makrophagen-Zelllinie NR8383 untersucht werden. Die bei der fluorimetrischen Auswertung im Mikrotiterplattenreader gemessene Erhöhung der Phagozytoserate bei der höchsten getesteten Konzentration von 1  $\mu$ g/ml steht im Widerspruch zu der vielfach berichteten Hemmung der Phagozytoseaktivität in der Literatur (Chen *et al.* 1998; Dhondt *et al.* 1998; Sovcikova *et al.* 2002). Roilides *et al.* (1994) hingegen fanden keine Veränderung der Phagozytoserate bei Monozyten, selbst nach 1 – 2-tägiger Inkubation. Wie schon beim Test mit Cadmium scheint diese scheinbare Stimulation der Phagozytose ein methodischer Fehler der Mikrotiterplatten-Auswertung zu sein, da sie bei der mikroskopischen Auswertung nicht festzustellen war. Im NBT-Test sowie beim Nachweis extrazellulärer ROS war bei keiner der getesteten CsA-Konzentrationen ein Einfluss festzustellen. Im Luminoltest hingegen konnte bei 500 ng/ml eine leichte Verzögerung der Reaktion nachgewiesen werden, bei 1  $\mu$ g/ml war die maximale ROS-Konzentration erniedrigt. Verglichen mit den jeweiligen Ethanolkontrollen, in denen sich eine leichte Stimulation des Luminolsignals abzeichnete, war die ROS-Produktion bei allen getesteten Konzentrationen signifikant gehemmt.

Diese Hemmwirkung durch CsA stimmt mit zahlreichen Arbeiten überein, die nachweisen konnten, dass das Protein nicht nur auf T-Zellen wirkt, sondern sich auch hemmend auf antibakterielle und fungizide Funktionen in Phagozyten auswirken kann. Beispielsweise

berichteten Thorat *et al.* (1994) und Kurokawa *et al.* (1992) von einer dosisabhängigen Inhibition der Phagozytose und der intrazellulären Kapazität zum Abtöten von Hefen bei PMN und Makrophagen. Die Hemmung der intrazellulären ROS-Produktion wird von beiden Autoren mit der erhöhten Suszeptibilität für Infektionen in Verbindung gebracht, die man bei Patienten die mit einem Spenderorgan unter Behandlung mit CsA beobachten kann. Nguyen *et al.* (1998) konnten ebenfalls eine Hemmung der Radikalproduktion, der Degranulation, sowie der Calciumkonzentration im Zytoplasma bei HL-60 Zellen bei Inkubationszeiten von 2 – 4 h feststellen. Die Autoren postulieren einen Einfluss auf die Signalkaskade vor der Ausschüttung intrazellulären Calciums, also vermutlich schon die Beeinflussung des Rezeptorsignals. Bei langen Inkubationszeiten von 20 h kehrte sich die Wirkung von CsA jedoch um, was in einer Erhöhung des cytoplasmatischen Calciums und der ROS-Produktion resultierte. Bei Langzeiteinfluss scheint eine weitere Signalgebung in Kraft zu treten, wobei die Autoren von einer Regulation über Calcineurin ausgehen. Die von Nguyen *et al.* gemessenen Effekte wurden mit einer wesentlich geringeren Konzentration von 0,1 – 10  $\mu\text{M}$  erzielt als die in dieser Arbeit detektierte hemmende Wirkung auf die Zelllinie NR8383, die ab einer Konzentration von ca. 500  $\mu\text{M}$  ( $\approx$  500 ng/ml) signifikant war. Die Arbeit von Roilides *et al.* (1994) weist darauf hin, dass Wirkungen therapeutischer Konzentrationen von CsA auf Phagozyten nur *in vitro*-, nicht jedoch *in vivo*-Effekte sind.

Ein Vergleich der verschiedenen Arbeiten stößt auf Schwierigkeiten, da meist in sehr unterschiedlichen Konzentrationsbereichen sowie mit unterschiedlichen Zelltypen und Versuchsorganismen gearbeitet wurde. Die in dieser Arbeit festgestellte zeitliche Verzögerung der Luminol-Kinetik ab 500 ng/ml CsA in Verbindung mit der gehemmten ROS-Produktion spricht jedoch sehr stark für einen direkten Einfluss auf die Signaltransduktionskaskade, die zur Aktivierung der NADPH-Oxidase führt.

#### 5.2.4 Die Pflanzenextrakte von *Echinacea purpurea* und QMH 5566

Die Presssäfte verschiedener *Echinacea*-Arten werden schon seit langer Zeit vorbeugend und zur Unterstützung bei Atemwegs- oder Harnwegs-Infekten, sowie äußerlich bei schlecht heilenden Wunden eingesetzt. Die Wirksamkeit der Extrakte wird jedoch in wissenschaftlichen Studien sehr kontrovers diskutiert. Für den Presssaft vom frischen Kraut des Purpursonnenhuts (*Echinacea purpurea*) konnte bereits in mehreren Arbeiten eine Wirkung auf das Immunsystem nachgewiesen werden (Stimpel *et al.* 1984; Jurcic *et al.* 1989; Stahl *et al.* 1990; Roesler *et al.* 1991; Goel *et al.* 2005). Die Wirksamkeit der Presssäfte der

Wurzeln von *Echinacea angustifolia* wurden beispielsweise von Turner *et al.* (2005) bei Atemwegserkrankungen abgesprochen. Ein von Wissenschaftlern der Stanford-Universität durchgeführte Vergleichsstudie soll zeigen, dass Echinaceae-Arzneien bei Erkältungen grundsätzlich unwirksam sind. Die immer wieder postulierte immunstimulierende Wirkung von *Echinacea* sei nach diesen Ergebnissen nicht vorhanden (Caruso und Gwaltney 2005). Dabei wird allerdings nicht näher darauf eingegangen, welche Arten des Sonnenhutes Objekt der Studien waren. Jedoch ist nicht nur die *Echinacea* Art entscheidend für die Wirkungsweise, sondern auch die Reife der Pflanze sowie der verarbeitete Anteil der Pflanze. Dies konnten Genexpressionsstudien an der Monozyten/Makrophagen-Zelllinie THP-1 zeigen (Brovelli *et al.* 2005). Die am häufigsten beschriebenen Reaktionen bei Lymphozyten sind im Bereich Proliferation und Cytokinsekretion zu finden. Bei Makrophagen wurde von Roesler *et al.* (1991) eine Steigerung der Radikalproduktion bei Infektion mit *Candida* festgestellt. Auch PMN reagierten mit gesteigerter Radikalproduktion bzw. erhöhter Phagozytoserate gemessen im Luminoltest (Jurcic *et al.* 1989). Stimpel *et al.* (1984) wiesen eine gesteigerte Makrophagenaktivierung durch Polysaccharide aus *Echinacea*-Extrakt nach 24stündiger Inkubation nach. Dies äußerte sich in erhöhter IL-1-Sekretion und gesteigertem *oxidative burst* bei der Phagozytose von Zymosan.

Die Studien sind nur sehr bedingt mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen zu vergleichen. Zum einen variiert die Zusammensetzung der Extrakte stark, aber auch die gewählten Zelltypen, Organismen und Analysemethoden unterscheiden sich stark. Meist wurden *in vivo* Experimente durchgeführt und die Zellen nach der Aufreinigung aus dem Blut der Versuchstiere analysiert. Dies macht auch einen Vergleich mit den eingesetzten Konzentrationen unmöglich. Um eine Dosisabhängigkeit der beiden Extrakte festzustellen, wurde ein großes Spektrum an Konzentrationen getestet. Ein Vergleich der getesteten Konzentrationsbereiche mit den homöopathischen Verdünnungsstufen der Zehnerpotenzen (D-Potenzen) bzw. Hunderterpotenzen (C-Potenzen) könnte bei externer Verabreichung (z. B. Wundsalbe) durchaus herangezogen werden. Bei der oralen Verabreichung der homöopathischen Substanz kommt es jedoch zu weiteren starken Verdünnungseffekten, deren Konzentrationsbereiche die getesteten stark unterschreitet. Die in dieser Arbeit verwendete höchste Verdünnungsstufe ( $10^{-8}$ ) würde beispielsweise der homöopathischen Potenz D8 bzw. C4 entsprechen.

Die festgestellten Effekte auf die Makrophagen-Zelllinie NR8383 lassen sich wie folgt zusammenfassen: Zunächst unterschieden sich die beiden Extrakte (vergoren und ethanolisch) geringfügig in ihrer Wirkung bei kurzzeitigem Einfluss. Ethanol stimulierte die mittels

Luminolreaktion gemessene Radikalproduktion, weshalb jeder Parameter der mit ethanolischem Extrakt gewonnenen Kinetik nochmals mit der jeweiligen Ethanolkontrolle verglichen wurde.

Wenn die Extrakte unmittelbar vor Aktivierung der Zellen zugesetzt wurden, konnten folgende Veränderungen festgestellt werden:

- Die Phagozytoserate war mit ethanolischem Extrakt bei der höchsten Konzentration ( $10^{-3}$ ) erhöht. Mit vergorenem Extrakt zeigte sich die Tendenz zu einer Stimulation bei mittleren Konzentrationen, die jedoch nicht signifikant war.
- Im NBT-Assay zur Bestimmung extra- und intrazellulärer ROS-Produktion zeigte sich kein Einfluss durch *Echinacea*-Extrakt.
- Die extrazelluläre Radikalproduktion, gemessen mit dem OxyBURST®-Reagenz, war bei hohen Konzentrationen ( $10^{-3}$ ) erhöht, in vergorenem Extrakt bei ( $10^{-4}$ ) leicht erniedrigt.
- Der Luminoltest wies auf eine Verzögerung der Reaktionskinetik bei hohen Konzentrationen ( $10^{-3}$ ) hin. Die ROS-Produktion war bei beiden Extrakten im hohen Konzentrationsbereich gehemmt ( $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ), bei mittleren und geringeren Konzentrationen jedoch gesteigert.

Nach zweitägiger Kultivierung der Zellen in *Echiacea*-haltigem Medium blieb die Luminolreaktion mit vergorenem Extrakt ähnlich dem Verlauf bei unmittelbarer Zugabe (Stimulation der Radikalproduktion bei  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$ , Hemmung bei  $10^{-3}$ ). Die alkoholische Lösung rief in allen Konzentrationsbereichen eine Stimulation der ROS-Produktion hervor.

Nach 5 Tagen zeigten die niedrigen Konzentrationen des vergorenen Extrakts ( $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ) einen gesteigerten *oxidative burst* auf. Mit ethanolischem Extrakt wiesen alle getesteten Konzentrationen diesen Effekt auf.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das verwendete Extraktionsmittel bzw. das zur Lagerung verwendete Lösemittel für kurzzeitige Effekte einen Einfluss haben kann. Der Langzeit-Einfluss von *Echinacea*-Extrakt kann bei Makrophagen zu einer Stimulation der ROS-Produktion führen, besonders in geringen Dosen. Der kurzzeitige Einsatz hoher Dosen kann zu einer Hemmung des intrazellulären Abbaus phagozytierter Partikel führen, jedoch auch zu einer Schädigung des umliegenden Gewebes durch extrazelluläre Radikalfreisetzung. Die Phagozytoseaktivität der Makrophagen wird jedoch nur bei hohen Konzentrationen von *Echinacea*-Extrakt gesteigert.

Anzumerken ist, dass die in dieser Arbeit verwendeten *Echinacea*-Extrakte bei 4°C gelagert wurden. Senchina *et al.* (2005) konnten zeigen, dass sich bereits nach vier Tagen Lagerung die immunwirksamen Eigenschaften verschiedener Extrakte verändern können. Da

die verschiedenen Tests über einen Zeitraum von mehreren Wochen gemacht wurden, könnte diese Veränderung der immunwirksamen Substanzen Einfluss auf die Testergebnisse haben. Als mögliche wirksame Substanz in Echinacea-Extrakten wurde beispielsweise Melanin vorgeschlagen (Pugh *et al.* 2005), das den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B in der Monozytenzelllinie THP1 aktiviert. Eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung könnte auch zu einer verstärkten NADPH-Oxidase-Aktivität führen. Alkylamide, Chicoriensäure und Polysaccharide wurden ebenfalls als wirksame Komponenten identifiziert (Stimpel *et al.* 1984; Roesler *et al.* 1991; Dalby-Brown *et al.* 2005). Alkylamide aus *Echinacea*, so konnte kürzlich gezeigt werden, können ähnlich wirken wie Cannabinoide, wobei aber keine psychomimetischen Effekte auftreten (Gertsch *et al.* 2004; Woelkart *et al.* 2005). Raduner *et al.* (2006) haben gezeigt, dass N-Isobutylamide eine neue Klasse von Cannabino-Mimetika darstellen, die an die peripheren CB2 Cannabinoid-Rezeptoren auf Immunzellen binden, aber nicht an die CB1 Rezeptoren im zentralen Nervensystem. Dieser Zusammenhang könnte ein großes Wirkungsspektrum von Pflanzenextrakten erklären.

Bei der Untersuchung des Pflanzenextrakts QMH5566 war bei der Makrophagen-Zelllinie NR8383 eine Erhöhung der extrazellulären ROS-Produktion bei 33  $\mu$ g/ml, also bei der höchsten getesteten Konzentration festzustellen. Der NBT-Assay wies auf keine Unterschiede hin, im Luminoltest jedoch war die ROS-Produktion bei allen Konzentrationen gesteigert. Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Radikalproduktion traten jedoch beim Vergleich mit den Ethanolkontrollen nicht mehr auf, was darauf hinweist, dass nur die Intensität des *oxidative burst* gesteigert wurde, die Reaktionszeit auf einen Stimulus jedoch nicht verändert war. Die Mikroglia-Zelllinie BV-2 reagierte jedoch mit einer verminderten Radikalproduktion, gemessen im NBT-Assay. Ethanol in den entsprechenden Verdünnungsstufen zeigte keine Wirkung auf die Zellen. Der Pflanzenextrakt wirkt sich also auf beide Zelltypen in unterschiedlicher Weise aus, in beiden Fällen jedoch unabhängig von der Phagozytoseleistung. Wie bereits im Kapitel zu Hydrocortison beschrieben, ist der *oxidative burst* bei Mikrogliazellen vermutlich überwiegend über Stickstoffverbindungen, und damit über iNOS geregelt, wohingegen Makrophagen eine starke Involvierung der NADPH-Oxidase aufweisen. Der Pflanzenextrakt scheint sich also unterschiedlich auf die Signaltransduktions-Mechanismen auszuwirken, die für die Regulation dieser beiden Enzyme verantwortlich sind. Über die Inhaltsstoffe und die möglichen wirksamen Komponenten dieses Pflanzenextrakts kann aus patentrechtlichen Gründen in dieser Arbeit nicht hingewiesen werden.

Eine generelle Interpretation der verwendeten Nachweissysteme ist in Kapitel 5.4 zu finden.

### 5.3 Der Einfluss von simulierter Schwerelosigkeit auf die Makrophagen-Zelllinie NR8383

Für die Simulation von Schwerelosigkeit mit der Makrophagen-Zelllinie NR8383 wurden verschiedene Methoden getestet. Das Prinzip des 2D-Küvettenklinostaten beruht auf der Aufhebung von Sedimentation durch Rotation in einem Probengefäß mit sehr kleinem Radius. Durch eine genaue Abstimmung der Rotationsgeschwindigkeit und dem Abstand der Zellen zur Rotationsachse kann die Bewegung der Partikel bis auf die Brownsche Molekularbewegung reduziert werden (Klaus *et al.* 1997). Magnetische Levitation hingegen basiert auf den diamagnetischen Eigenschaften organischer Proben. In einem starken extern angelegten magnetischen Gradienten können Zellen zum Schweben gebracht werden. Im Parabelflug wurden abwechselnd Beschleunigungen zwischen 1,8 g und ca.  $10^{-2}g$  erreicht. In diesem Experiment waren die Zellen 15 Parabeln mit alternierenden Gravitationsbedingungen ausgesetzt. Bei allen Experimenten in simulierter Schwerelosigkeit waren nur Endpunktmessungen möglich. Die Phagozytose wurde mit FITC-Zymosan untersucht, die Intensität des *oxidative burst* mithilfe des NBT-Assays bestimmt.

#### 5.3.1 Einfluss auf die Phagozytose

Bei klinorotierten Zellen konnte nach 30 min eine signifikante Hemmung der Phagozytose um durchschnittlich 80 % nachgewiesen werden. Allerdings verschwindet dieser Effekt nach längerer Inkubation wieder, die Zellen scheinen die verminderte Phagozytoseleistung wieder auszugleichen. Abb. 69 stellt diesen Effekt schematisch dar. Offensichtlich ist die maximale Phagozytosekapazität der Zellen bei überschüssigem Zymosan nach 30 – 60 min erschöpft, so dass es rückblickend nicht weiter verwunderlich ist, dass bei den langen Inkubationszeiten im Magneten von 1,5 h kein Einfluss durch magnetische Levitation auf die Phagozytoserate der Zelllinie NR8383 festgestellt werden konnte.

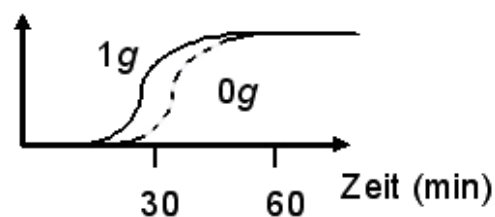


Abbildung 69 Veränderung der Phagozytoserate durch Klinorotation. Schematische Darstellung

Nach 60minütiger Klinorotation konnte auch keine Verminderung der Phagozytoseaktivität in mit Methylzellulose (MZ) supplementiertem Medium nachgewiesen werden. Grund dafür könnte sein, dass die Sedimentation nicht verhindert wurde. Durch optische und quantitative Auswertung konnte jedoch vorab nachgewiesen werden, dass die verwendete Methylzellulosekonzentration die Sedimentation zumindest stark verzögert und bis zu einer Stunde aufhält. Würde die Sedimentation der Zellen und der Zymosanpartikel Einfluss auf die Phagozytoserate der Zellen nehmen und diese beschleunigen, so müsste man in MZ-Medium nach einer Stunde Klinorotation zumindest die Tendenz einer Hemmung noch nachweisen können. Da dies nicht der Fall war, kann davon ausgegangen werden, dass bei den eingesetzten Zymosankonzentrationen Methylzellulose keinen Einfluss auf die Phagozytoseaktivität der Zellen hat. Der Zusatz von Cadmium bzw. Hydrocortison hatte auch bei rotierten Zellen, wie schon bei den in Kapitel 5.2 diskutierten Ergebnissen keinen Einfluss auf die Phagozytoseaktivität. Auch nach 15 Parabeln mit wechselnden Schwerkraftbedingungen (entsprechend einer Inkubationszeit von 43 min) konnte mit keinem der drei Auswerteverfahren eine Veränderung der Phagozytoseaktivität festgestellt werden. Für zukünftige Versuche ergibt sich hieraus die Konsequenz, kürzere Inkubationszeiten von 5 – 30 min zu wählen. Dies gilt auch für Immuntoxizitätstests mit diversen Testsubstanzen.

Kaur et al. konnten bei Phagozyten, die aus dem Blut von Astronauten aufgereinigt wurden, ebenfalls eine Verringerung der Phagozytose bei PMN (Kaur *et al.* 2004) sowie bei Monozyten (Kaur *et al.* 2005) nachweisen. In ihren Arbeiten betrug die Inkubationszeit mit opsonierten, FITC-markierten *E. coli* 30 min. Bei Monozyten war die verminderte Phagozytoserate begleitet von einer geringeren Expression des Oberflächenmarkers CD32 (Fc $\gamma$ -RII). Die *in vivo*-Studie stimmt also grundsätzlich mit dem durch Klinorotation hervorgerufenen Effekt überein, auch wenn die Astronauten während einer 5tägigen Mission beobachtet wurden und damit wesentlich länger realen Weltraumbedingungen, mit komplexen Wechselwirkungen der Zellen im Körper, ausgesetzt waren.

Ob eine veränderte Expression von phagozytotisch bedeutenden Oberflächenmarkern auch bei kurzzeitiger Klinorotation zu beobachten ist, bleibt zu klären. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass die kurzzeitigen Effekte durch Veränderungen des Zytoskeletts verursacht werden. Die Phagozytose ist ein Zytoskelett-abhängiger Prozess. Durch die Interaktion spezifischer Rezeptoren auf der Zelloberfläche mit Liganden auf der Oberfläche von Pathogenen oder entarteten Zellen kommt es zur Polymerisation von Aktin an der Stelle der Ingestion und zur Aufnahme des Partikels mittels eines auf Aktin basierenden Mechanismus. F-Aktin, Vinculin,  $\alpha$ -Aktinin, Paxillin und Phosphotyrosin-haltige Proteine

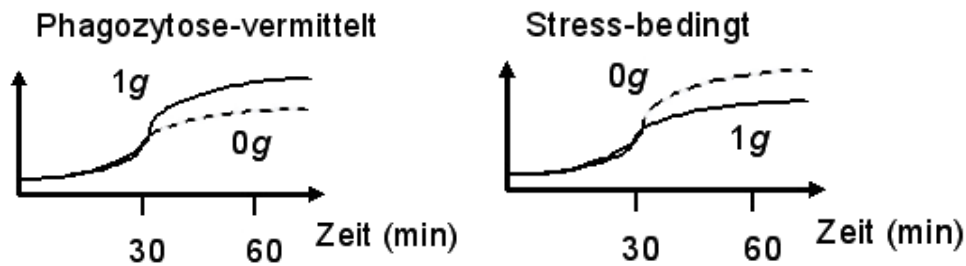
spielen bei der Komplementrezeptor-basierten Phagozytose, wie sie durch die Opsonierung durch Pferdeserum hier vorliegt, ebenso eine entscheidende Rolle wie intakte Mikrotubuli (Aderem und Underhill 1999). Meloni *et al.* (2006) zeigten vor kurzem, dass simulierte Schwerelosigkeit auf einer *random positioning machine* (RPM) bereits nach einer Stunde zu massiven Veränderungen des Zytoskeletts bei Monozyten führt. Erst nach 24 h begann sich das Aktin- und Tubulin-Netzwerk zu reorganisieren. Das Ankerprotein Vinculin, ein wichtiges Element in *focal adhesions*, fand sich in dicken Clustern in der Plasmamembran, die normale Anordnung des Proteins war gestört. Die von den Autoren postulierte Konsequenz dieser Ergebnisse ist eine gestörte Zellmotilität, doch da dieselben hier gestörten Strukturen auch unverzichtbar für eine normale Phagozytoseleistung sind, lässt sich die in dieser Arbeit festgestellte kurzzeitige Hemmung der Phagozytose durch Klinorotation vermutlich auf Veränderungen des Zytoskeletts zurückführen. Tatsächlich konnten Cologli-Greuter *et al.* (1998) in Jurkat T-Zellen bereits nach 30 s realer Schwerelosigkeit im *sounding rocket* Flug veränderte Vimentin-Strukturen beobachten. Auch bei thyroiden Karzinomazellen waren nach 30 min RPM-Inkubation massive Veränderungen des Zytoskeletts festzustellen (Infanger *et al.* 2006). Schatten *et al.* (2001) berichteten bereits 2001 vom totalen Zusammenbruch des Zytoskeletts, insbesondere des Mikrotubuli-Systems von T-Zellen bei einer Space Shuttle Mission. All diese Arbeiten bestätigen das von Ingber (1999) beschriebene *tensegrity*-Modell zur Schwerkraftwahrnehmung mithilfe des Zytoskelettsystems.

### 5.3.2 Einfluss auf den *oxidative burst*

Der *oxidative burst* der Zelllinie NR8383 war durch simulierte Schwerelosigkeit stark verändert. Zum einen wurde die Phagozytose-vermittelte Radikalbildung mit NBT-Zymosan untersucht, darüber hinaus sollte aber auch die ROS-Produktion von Zellen getestet werden, deren Phagozytose nicht aktiviert wurde. Durch NBT-Lösung im Zellkulturmedium konnte auf diese Weise der durch Stress der Zellen verursachte *oxidative burst* verfolgt werden. Abbildung 70 fasst schematisch die erhaltenen Erkenntnisse aus den Klinostatenexperimenten zusammen. Während phagozytierende Zellen nach 60 min eine um 60 % verminderte Radikalproduktion aufweisen, hat sich die Radikalproduktion bei nicht phagozytierenden Zellen im selben Zeitraum verdoppelt, verglichen mit 1g Kontrollzellen. Bei längerer Inkubation schwächt diese Wirkung wieder ab. Es scheint also, als ob ruhende, nicht aktivierte Zellen den Wegfall der Schwerkraft auf zellulärer Ebene als aktivierenden Stressor



interpretieren. Umgekehrt reagieren aktivierte Zellen mit einer verminderten mikrobiziden und fungiziden Abwehrreaktion durch ROS-Produktion.



**Abbildung 70** Veränderung des *oxidative burst* durch Klinorotation. Schematische Darstellung

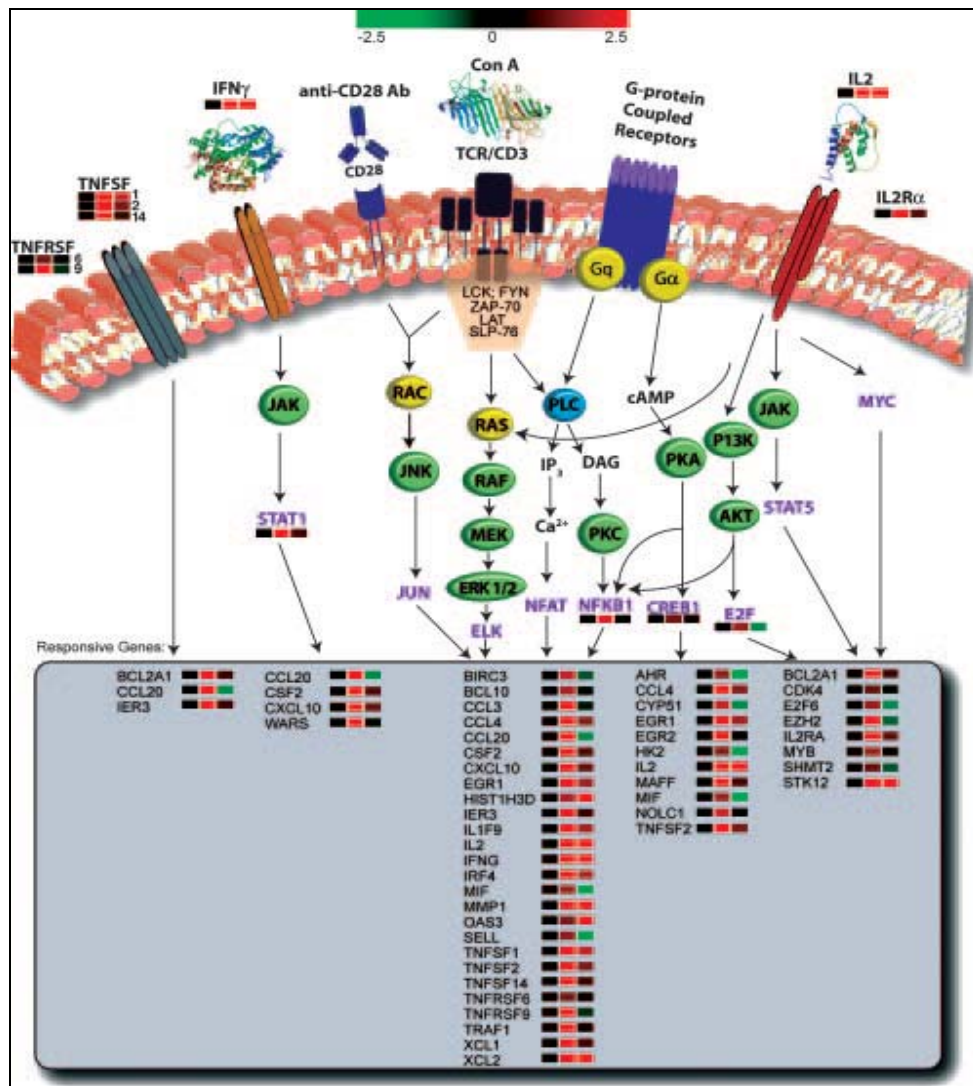
Auch bei verminderter Sedimentation der Zellen in MZ-Medium blieb dieser Effekt erhalten, war jedoch nicht ganz so stark ausgeprägt. Die Zellen scheinen also in einer viskoserer Umgebung nicht ganz so stark auf das Wegfallen der Schwerkraft zu reagieren. Dies deckt sich mit der Erkenntnis, dass Suspensionszellen sensitiver auf Mikrogravitation reagieren als adhärenente Zellen (Gmunder *et al.* 1992). Zellen in Suspension in MZ-Medium könnten durch die veränderten Kräfte an ihren Oberflächenrezeptoren eventuell adhärenente Zellen ähneln. Bei der Zugabe von immunmodulierend-wirksamen Substanzen während Klinorotation blieb die oben beschriebene Hemmung des Phagozytose-vermittelten *oxidative burst* und die Stimulation der stressbedingten ROS-Produktion im Falle von 10  $\mu\text{M}$  Cadmium erhalten. Der Zusatz von Hydrocortison, das wie oben beschrieben eine Stimulierung der ROS-Produktion in phagozytierenden NR8383 Zellen hervorruft, verhinderte tatsächlich die Abweichung der ROS-Produktion. Hier war kein signifikanter Einfluss durch Klinorotation mehr nachzuweisen. Vermutlich greift Hydrocortison also stärker regulierend in Phosphorylierungsschritte durch Proteinkinasen ein, so dass veränderte Signalmuster durch den Wegfall der Schwerkraft wieder aufgehoben werden. Bestätigt sich dieses Phänomen, wären weitere Versuche für einen therapeutischen Ansatz zur Bekämpfung der Immunsuppression bei Astronauten durchaus interessant.

Die Ergebnisse der Klinorotationsexperimente stehen im Gegensatz zu den Arbeiten von Fleming *et al.* (1991). Bei Parabelflugexperimenten wurde die Produktion von Superoxid bei *Propionibacterium acnes-primed* Mäuse-PMN nach PMA-Stimulation bestimmt. Die Stimulation in Mikrogravitation resultierte in einer vierfachen Erhöhung der Superoxidanionproduktion im Vergleich mit 1g Kontrollzellen, ohne PMA wurde jedoch keine ROS-Produktion ausgelöst. Diese Ergebnisse stehen sowohl im Konflikt mit der postulierten Hemmwirkung bei Phagozytose und der gesteigerten ROS-Produktion bei

---

unstimulierten Zellen, die aus dieser Arbeit hervorgehen. Im Parabelflug wurden jedoch nur die ersten 20 s nach PMA-Stimulation untersucht. Ferner unterscheidet sich die Studie von Fleming *et al.* im untersuchten Zelltyp. Wie bereits erwähnt kann auch das Priming der Zellen entscheidenden Einfluss auf deren Reaktion nehmen (Franchimont *et al.* 1999; Mouithys-Mickalad *et al.* 2004). In den bereits im Kapitel Phagozytose angesprochenen Untersuchungen von Kaur *et al.* (2004; 2005) mit Phagozyten von Astronauten wurde auch die Fähigkeit zum *oxidative burst* untersucht. Die ROS-Produktion wurde dabei durch Fc $\gamma$ -Rezeptor-vermittelte Phagozytose ausgelöst. In Monozyten wurde keine Veränderung der Radikalbildung im Vergleich zu Zellen aus einer Kontrollgruppe festgestellt, PMN hingegen reagierten mit einem abgeschwächten *oxidative burst*, was sich mit zunehmender Missionsdauer noch verstärkte.

Auch wenn ein direkter Vergleich dieser Ergebnisse mit den hier gefundenen Effekten nicht korrekt ist, da es sich um *in vivo*-Expositionen handelt und die Fc $\gamma$ -R-basierte Phagozytose einen anderen Aktivierungsmechanismus auslöst als die Komplementrezeptor-basierte, stimmen die Grundtendenzen der Arbeiten zur Hemmung des *oxidative burst* während der Phagozytose überein. Eine umfangreiche Genexpressionsanalyse an Nierenzellen, die während eines Shuttle-Fluges für 6 Tage der Schwerelosigkeit ausgesetzt waren, konnte eine Vielzahl an verändert regulierten Genen ausfindig machen. Darunter fiel auch eine vierfache Erhöhung der Expression von Superoxiddismutase auf. Dies könnte auf einen verstärkten Abbau von Superoxid hinweisen, entweder als protektiven Mechanismus zum Schutz vor übermäßig hohen Radikalkonzentrationen oder aber als Regulationsmechanismus für die Signaltransduktion.



**Abbildung 71** Signaltransduktionswege in T-Zellen und durch Mikrogravitation signifikant veränderte regulierte Gene. Die farbigen Blöcke repräsentieren von links nach rechts: 0h 1g, 4h 1g und 4h simulierte Schwerelosigkeit mittels RPM. rot: herab- grün: hochregulierte Gene (aus Boonyaratanakornkit *et al.* 2005)

Zahlreiche Arbeiten lassen darauf schließen, dass ROS nicht nur in Lymphozyten direkt auf die Signaltransduktion Einfluss nehmen können. Die genauen Mechanismen sind bisher nur in Ansätzen erforscht, aber beispielsweise durch die Oxidation von Cysteinresten am aktiven Zentrum von Enzymen, könnten Radikale direkt auf (De-) Phosphorylierungen einwirken. So scheinen ROS etwa die Aktivität von PKC-Isoformen, das Rac-Ras-System oder auch als *second messenger* Transkriptionsfaktoren zu regulieren (Reviews siehe Suzuki *et al.* 1997; Finkel 1998). Diese mögliche regulatorische Funktion durch ROS macht umso deutlicher, wie exakt die Intensität des *oxidative burst* reguliert sein muss und welche fatalen Konsequenzen eine mögliche Störung der Radikalproduktion durch Mikrogravitation haben könnte. Die vielfach beschriebenen, durch Schwerelosigkeit ausgelösten Veränderungen der Signaltransduktionswege in Säugerzellen (Cogoli 1997; Galleri *et al.* 2002;

Boonyaratanakornkit *et al.* 2005; Morrow 2006) könnten demnach sowohl Ursache für als auch Folge von gestörter Regulation des *oxidative burst* sein. Abb. 71 zeigt exemplarisch für T-Zellen die aus einer differentiellen Genexpressionsanalyse hervorgegangenen zahlreichen Veränderungen durch Schwerelosigkeit (Boonyaratanakornkit *et al.* 2005).

Die Abschwächung der 0g-Effekte nach längerer Inkubationszeit deckt sich mit den Ergebnissen von Degan *et al.* (2005), die zeigen, dass die anfänglich durch Mikrogravitation ausgelösten Stressantworten transient sind und Lymphozyten bei längerer Behandlung aus Schutz vor Apoptose und Zellschädigungen in eine Art metabolischen Ruhezustand übergehen.

Schließlich konnte auch gezeigt werden, dass kryokonservierte Zellen, die kurz vor dem Experiment regeneriert werden, schnell ihre normale Immunfunktion zurückgewinnen und beinahe im gleichen Ausmaß sensitiv auf Klinorotation reagieren wie frisch aus Kultur entnommene Zellen. Dieses Ergebnis ist wichtig für das TRIPLE-LUX-Weltraumexperiment, da dafür keine Kultivierung der Zellen vorgesehen ist. Dies wäre technisch zwar machbar, jedoch von der Umsetzung her zu teuer, da dafür mehr Astronauten-Zeit erforderlich wäre. Hinzu käme das Risiko einer gehemmten Proliferation der Zellen durch kosmische Strahlung und Mikrogravitation. Da jedoch gezeigt werden konnte, dass auch frisch regenerierte Zellen gravisensitiv sind, kann auf eine aufwändige Kultivierung auf der ISS verzichtet werden. Nach allen Klinostatenexperimenten wurde die Vitalität der Zellen überprüft. Diese war bei allen Versuchen und Inkubationszeiten unverändert. Aus diesem Grund kann keines der Ergebnisse, insbesondere die Hemmeffekte, auf eine verringerte Vitalität der Zellen zurückgeführt werden.

Die Experimente mit magnetischer Levitation führten nur in einem Fall zu einem signifikant veränderten Ergebnis. In MZ-Medium kam es an der 0g-Position bei nicht phagozytierenden Zellen zu einer gesteigerten Radikalproduktion im Vergleich zu 1g Kontrollzellen. Dieses Ergebnis stützt die im Klinostaten beobachtete stressbedingte Aktivierung der Zellen. Die Phagozytose-abhängige Hemmung konnte jedoch nicht bestätigt werden. Auffällig war, dass die dem starken Magnetfeld ausgesetzten Zellen sich in ihrer Radikalproduktion nicht von den Kontrollzellen außerhalb des Magnetfeldes unterschieden. Offensichtlich hat das starke magnetische Feld keinen funktionellen Einfluss auf die Zellen und löst zumindest keinen stressbedingten *oxidative burst* aus. Die Zellen für die Magnet-Experimente waren kryokonserviert und wurden kurz vor den Tests aufgetaut und vor der Aktivierung für 5 - 10 min bei 37°C inkubiert. Bei den Klinostatenexperimenten konnten sich

---

die Zellen für 3 h regenerieren. Für die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Simulationsmethoden gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten:

- Die kryokonservierten Zellen für die Magnet-Versuche hatten sich noch nicht richtig adaptiert, die 10-minütige Regenerationsphase war also zu kurz für eine Reaktion auf Schwerelosigkeit (bzw. hyper-g).
- Eine der beiden Methoden stellt kein geeignetes Modell für die Simulation von Schwerelosigkeit dar.

Eine mögliche Fehlerquelle könnte allen Berechnungen zum Trotz eine Beschleunigung der Zellen im 2D-Klinostaten durch zu starke Rotation sein. Bezüglich der Exposition von Säugerzellen in solch starken Magnetfeldern, wie sie für die Levitation erforderlich sind, gibt es jedoch bisher kaum Erfahrungen, so dass auch die Störung normaler Zellfunktionen durch magnetische Levitation denkbar ist. Die verwendeten Magnetfeldstärken von über 10 T überschreiten die normale Erdmagnetfeldstärke von ca.  $5 \times 10^{-5}$  T enorm. Einige Magnetresonanz-Tomographen (MRI) arbeiten mit Feldstärken von 4 – 8 T. Ärzten zufolge gibt es keine Beweise für eine kumulative, schädigende Wirkung durch die Exposition zu starken Magnetfeldern (Schenck 2000). Bei Experimenten mit Froschembryonen (Denegre *et al.* 1998) und Muskelzellen (Iwasaka *et al.* 2003) wurden durch die Exposition in sehr starken Magnetfeldern von über 10 T Störungen der Zellteilung und der Morphologie festgestellt. Beide Autoren gehen davon aus, dass eine Störung von Zytoskelettstrukturen für die beobachteten Veränderungen verantwortlich ist. Auch wenn die beobachteten Wirkungen in beiden Fällen nicht letal waren, kann doch von einer Störung normaler Zellfunktionen ausgegangen werden. In dem hier getesteten Fall führte die Exposition jedoch nicht zu einer stressbedingten Erhöhung der ROS-Produktion.

Weitere experimentelle Arbeiten zum Vergleich der verschiedenen Simulationsmethoden sind in Anbetracht der enormen Kosten von Weltraumexperimenten und dem beschränkten Zugang zu Flugmöglichkeiten unbedingt erforderlich.

## 5.4 Bewertung der verschiedenen Assays

In allen hier vorgestellten Nachweissystemen, sowohl zur Phagozytoseaktivität als auch zur ROS-Produktion, wurde stets derselbe Aktivator benutzt, nämlich mit Pferdeserum

opsoniertes Zymosan A, das anschließend je nach Assay weiter modifiziert wurde (FITC-, NBT-Markierung). Auf diese Weise wurden bei jedem Experiment (außer PMA-Aktivierung von PMN) dieselben Aktivierungsmechanismen in den Zellen ausgelöst. Somit konnten die Ergebnisse aus den unterschiedlichen Assay-Systemen verglichen werden.

Die verschiedenen Auswertungsverfahren des Phagozytose-Assays bergen verschiedene Nachteile. So ist die mikroskopische Auswertung äußerst aufwändig und birgt die Gefahr der subjektiven Betrachtungsweise. Daher ist es wichtig, die einzelnen Behandlungen verdeckt auszuwerten, also ohne vorherige Information über den untersuchten Einfluss. Die fluorimetrische Bestimmung im Tecan-Microtiterplattenreader brachte verschiedentlich unstimmmige Ergebnis hervor. Manche der bei mikroskopischer Betrachtung aufgefallenen Hemmwirkungen konnten hierbei nicht detektiert werden, und im Gegensatz dazu traten teilweise unerklärbare Stimulationen auf. Vorab wurde sicher gestellt, dass bei der fluorimetrischen Auswertung im Tecan-Reader ab einer Zellkonzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen pro Kavität die Signalstärke proportional zur eingesetzten Zellzahl zunimmt. FITC-Zymosan wurde stets im Überschuss zugegeben. Daher können die voneinander abweichenden Ergebnisse der beiden Auswerteverfahren nicht erklärt werden. Tendenziell sind die Ergebnisse aus der mikroskopischen Auswertung schlüssiger und besser durch Literatur belegt. Für eine besonders sensitive Auswertung sind zukünftig FACS-Analysen notwendig. Dies war jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Die Zelllinie NR8383 scheint in ihrer Phagozytoseaktivität nicht sehr sensitiv auf äußere Beeinflussung zu reagieren. Möglicherweise waren auch die gewählten Inkubationszeiten von 1 – 1,5 h zu lange. Dies zeichnete sich in den Klinostatenversuchen ab, wo nach 30minütiger Inkubation eine Hemmung der Phagozytoseaktivität festzustellen war. Für zukünftige Arbeiten sollte die Inkubationszeit für Untersuchungen der Phagozytoseaktivität an der Makrophagen-Zelllinie NR8383 deshalb deutlich verkürzt werden.

Die Untersuchungen zum *oxidative burst* wiesen ebenfalls Unstimmigkeiten auf, vor allem zwischen den beiden Systemen Luminol und NBT. Prinzipiell sollten beide Testsysteme sowohl intrazelluläre, als auch extrazelluläre ROS detektieren. Grundsätzlich fiel auf, dass die Kinetikmessung mit Luminol offensichtlich wesentlich sensitiver sind, da viele Einflüsse mit Luminol, nicht aber mit NBT detektiert werden konnten. Die Ergebnisse der Endpunktmessung mit NBT sollten eigentlich mit den AUC-Werten aus den Luminoltests übereinstimmen, da diese die ROS-Totalproduktion repräsentieren. Dies war jedoch meist nicht der Fall. Bei Mikrogliazellen, deren *oxidative burst* vermutlich überwiegend durch die iNOS bedingt ist, erwies sich das NBT-Nachweissystem als sehr gut geeignet für die

Detektion immuntoxischer Einflüsse. Bei der Makrophagen-Zelllinie NR8383 hingegen ähnelten die Ergebnisse stark denen aus dem sehr sensitiven OxyBURST®-Nachweissystem für extrazelluläre ROS. Der Vergleich von Ergebnissen aus Luminoltests mit dem OxyBURST®-System legt die Vermutung nahe, dass das Luminolsystem überwiegend Schwankungen der intrazellulären ROS-Produktion aufweist, oder aber die Schwankungen der extrazellulären Radikalproduktion nur sehr gering sind. Dafür spricht die Tatsache, dass Erhöhungen des extrazellulären *oxidative burst* im OxyBURST®-System nur bei sehr unphysiologischen Bedingungen gefunden wurden, wie beispielsweise sehr hohen Cadmiumkonzentrationen. Da extrazellulär freigesetzte Radikale große Schäden im umliegenden Gewebe verursachen können, ist eine sehr restriktive Regulierung der extrazellulären Radikalfreisetzung bei Makrophagen auch physiologisch sinnvoll.

Nachdem bei den Experimenten in simulierter Schwerelosigkeit selbst im wenig sensitiven NBT-Assay Einflüsse detektiert werden konnten, ist davon auszugehen, dass eine gleichzeitige Kinetikmessung während Klinorotation noch stärkere Einflüsse auf die Radikalproduktion nachweisen könnte. Das Luminolsystem für intra- und extrazelluläre ROS in Verbindung mit dem OxyBURST®-System für extrazelluläre ROS scheint ein geeignetes Testsystem zur Detektion von immuntoxischen Einflüssen bei PMN und Makrophagen zu sein. Die Auswertung der einzelnen Parameter lässt auch genauere Aussagen über den zeitlichen Verlauf des *oxidative burst* zu, wie beispielsweise veränderte *lag*-Phasen der beteiligten Enzyme, die bei einer Endpunktmessung nicht erkennbar wären. Die von Fäldt *et al.* (1999) sowie Faulkner und Fridovich (1993) geäußerten Bedenken, dass Luminol die Signaltransduktion von PMN beeinflussen könne bzw. Luminol autokatalytisch Superoxidanionen produziert, konnten bei den hier vorgestellten Experimenten ausgeräumt werden, indem ständig Negativkontrollen ohne Zymosan- bzw. PMA-Stimulation mitgeführt wurden und relative Vergleiche zwischen behandelten und unbehandelten Zellen angestellt wurden.

Für weiterführende Experimente und die Nutzung in der Umweltanalytik eignet sich besonders der Luminolassay, der bei phagozytierenden Zellen überwiegend zum Nachweis intrazellulärer Radikalbildung dient. Für die Detektion der extrazellulären ROS-Produktion kann das OxyBURST®-System zuverlässige und ergänzende Daten liefern. Die Bestimmung der Phagozytoseaktivität soll zukünftig durch FACS-Analyse erfolgen, da sie einfacher und objektiver ist als die mikroskopische Auswertung und zugleich zuverlässigere Daten liefert als die Auswertung im Mikrotiterplattenformat.

Auf Basis der verschiedenen Testsysteme:

- dem mikroskopisch ausgewerteten Phagozytoseindex,
- dem OxyBURST®-System für den Nachweis extrazellulärer Radikale,
- dem NBT-Assay für den Nachweis extrazellulärer ROS bei Makrophagen und RNS bei Mikrogliazellen sowie
- dem Luminolassay zum Nachweis überwiegend intrazellulär produzierter ROS

ergeben sich zusammenfassend und stark vereinfacht für alle getesteten Parameter und Substanzen die in Tabelle 11 dargestellten Ergebnisse.



**Tabelle 11** Vereinfachte Zusammenfassung aller Ergebnisse. rot: Hemmung, grün: Stimulation, →: keine Änderung; - nicht durchgeführt.

Behandlung	Zelltyp	Zeit	Phagozytose (mikroskopisch)			intrazelluläre ROS (Luminol) bzw. RNS			extrazelluläre ROS (Oxyburst, NBT)		
			Konzentration der Testsubstanz			Konzentration der Testsubstanz			Konzentration der Testsubstanz		
Cadmium	PMN		-			↓	↓	↓			
	Makrophagen		→	→	↓	↓	↓	↑	↑	↑	
Hydrocortison	PMN -PMA		-			↑	↑	→			
	PMN -Zym		-			↑	↑	↑			
	Makrophagen		→	→	→	↑	↑	↑	→	→	
	Mikroglia		-			↓	↓	↓			
17β-Östradiol	Makrophagen		→	→	→	→	→	→	→	→	
	Mikroglia		-			→	↓	↓			
Cyclosporin A	Makrophagen		→	→	→	→	→	↓	→	→	
Ethanol	Makrophagen		→	→	↓	→	↑	↓	→	→	
	Mikroglia		→	→	→	→	→	→			
Echinacea purpurea		kurzzeit	→	(↑)	→	↑	↑	↓	→	→	
	Makrophagen	2 Tage	-			→	↑	↓			
		5 Tage	-			↑	↑	↓			
QMH 5566	Makrophagen		→	→	→	↑	↑	↓	→	→	
	Mikroglia		→	→	→	↓	↓	↓	→	→	
Magnetische Levitation	Makrophagen		→			→		(↑)			
Klinorotation		kurzzeit	↓			→			→		
	Makrophagen		→			↓	↓	↓	↑	↑	
		langzeit	→			↓	↓	↓	→		
Parabelflug	Makrophagen		→			-					

## 6 Literatur

- Adams, D. O. und P. A. Marino (1984). Activation of mononuclear phagocytes for destruction of tumor cells as a model for study of macrophage development. *Contemporary Hematology and Oncology*. S. Gordon, J. Lobue und R. Silber. New York, Plenum Press: 69 - 136.
- Aderem, A. und D. M. Underhill (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17: 593-623.
- Akira, S. und T. Kishimoto (1996). Role of interleukin-6 in macrophage function. *Curr Opin Hematol* 3(1): 87-93.
- Allen, R. C. (1986). Phagocytic leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence: a kinetic approach to analysis. *Methods Enzymol* 133: 449-93.
- Anthony, P., C. Dijkstra, A. Catherall, R. J. A. Hill, R. Hampp, M. Martzivanou, M. R. Davey, J. B. Power und K. C. Lowe (2005). Magnetic levitation: experimental techniques for biological systems. *ELGRA Biennial Symposium and General Assembly*. Santorini, Greece.
- Aoyama, K., K. Matsubara und S. Kobayashi (2006). Aging and oxidative stress in progressive supranuclear palsy. *Eur J Neurol* 13(1): 89-92.
- Babior, B. M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood* 93(5): 1464-76.
- Babior, B. M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 109(1): 33-44.
- Banati, R. B., J. Gehrmann, P. Schubert und G. W. Kreutzberg (1993). Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7(1): 111-8.
- Beaugnon, E. und R. Tournier (1991). Levitation of Organic Materials. *Nature* 349: 470.
- Bekesi, G., R. Kakucs, S. Varbiro, K. Racz, D. Sprintz, J. Feher und B. Szekacs (2000). In vitro effects of different steroid hormones on superoxide anion production of human neutrophil granulocytes. *Steroids* 65(12): 889-94.
- Belgi, G. und P. S. Friedmann (2002). Traditional therapies: glucocorticoids, azathioprine, methotrexate, hydroxyurea. *Clin Exp Dermatol* 27(7): 546-54.
- Birk, K., C. Ford, S. Smeltzer, D. Ryan, R. Miller und R. A. Rudick (1990). The clinical course of multiple sclerosis during pregnancy and the puerperium. *Arch Neurol* 47(7): 738-42.
- Björkmann, T. (1992). Perception of gravity by plants. *Adv. Space Res.* 12: 195 - 201.
- Block, C., S. Freyermuth, D. Beyersmann und A. N. Malviya (1992). Role of cadmium in activating nuclear protein kinase C and the enzyme binding to nuclear protein. *J Biol Chem* 267(28): 19824-8.
- Bodel, P., G. M. Dillard, Jr., S. S. Kaplan und S. E. Malawista (1972). Anti-inflammatory effects of estradiol on human blood leukocytes. *J Lab Clin Med* 80(3): 373-84.
- Bogdan, C., M. Rollinghoff und A. Diefenbach (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 12(1): 64-76.

- Boonyaratanakornkit, J. B., A. Cogoli, C. F. Li, T. Schopper, P. Pippia, G. Galleri, M. A. Meloni und M. Hughes-Fulford (2005). Key gravity-sensitive signaling pathways drive T cell activation. *Faseb J* 19(14): 2020-2.
- Bräucker, R., A. Cogoli und R. Hemmersbach (2002). Graviperception and Graviresponse at the Cellular Level. *Astrobiology The Quest for the Conditions of Life*. G. Horneck und C. Baumstark-Khan. Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag: 287 - 333.
- Braun, M. (2002). Actomyosin-mediated statolith positioning and sedimentation in gravisensing plant cells studied in microgravity. *J Gravit Physiol* 9(1): P215-6.
- Briegleb, W. (1983). The clinostat - a tool for analysing the influence of acceleration on solid-liquid systems. *Proceedings of a Workshop on Space Biology*, Cologne. Paris, European Space Agency ESA SP-206. ESA SP-206: 97 - 101.
- Briegleb, W. (1992). Some Qualitative and Quantitative Aspects of the Fast-Rotating Clinostat as a Research Tool. *ASGSB Bulletin* 5(2): 23 - 30.
- Briegleb, W., J. Neubert und A. Schatz (1973). First results with a fast running clinostat microscope. *XXI International Congress of Aviation and Space Medicine - Reprints of Scientific Programme*. München: 113 - 114.
- Briegleb, W., A. Schatz und G. Teuchert (1971). Further theoretical and experiment contributions on the degree of acceleration dependencies of the organisms using 0-g simulation and hyper-g. *Proceedings of the XXI. International Astronautical Congress*. North Holland: 252 - 263.
- Brinckmann, E. (2003). New facilities and instruments for developmental biology research in space. *Adv Space Biol Med* 9: 253-80.
- Brinckmann, E. (2004). BIOLAB, EPU and EMCS for cell culture experiments on the ISS. *J Gravit Physiol* 11(1): 67-74.
- Brinckmann, E. und P. Schiller (2002). Experiments with small animals in BIOLAB and EMCS on the International Space Station. *Adv Space Res* 30(4): 809-14.
- Brovelli, E. A., D. Rua, H. Roh-Schmidt, A. Chandra, E. Lamont und G. D. Noratto (2005). Human gene expression as a tool to determine horticultural maturity in a bioactive plant (*Echinacea purpurea* L. Moench). *J Agric Food Chem* 53(21): 8156-61.
- Bruce-Keller, A. J., J. L. Keeling, J. N. Keller, F. F. Huang, S. Camondola und M. P. Mattson (2000). Antiinflammatory effects of estrogen on microglial activation. *Endocrinology* 141(10): 3646-56.
- Burchiel, S. W. (1999). The effects of environmental and other chemicals on the human immune system: the emergence of immunotoxicology. *Clin Immunol* 90(3): 285-6.
- Canova, S., F. Fiorasi, M. Mognato, M. Grifalconi, E. Reddi, A. Russo und L. Celotti (2005). "Modeled microgravity" affects cell response to ionizing radiation and increases genomic damage. *Radiat Res* 163(2): 191-9.
- Carlson, G. P. und J. J. Kaneko (1973). Isolation of leukocytes from bovine peripheral blood. *Proc Soc Exp Biol Med* 142(3): 853-6.

- Caruso, T. J. und J. M. Gwaltney, Jr. (2005). Treatment of the common cold with echinacea: a structured review. *Clin Infect Dis* 40(6): 807-10.
- Chen, S. Y., S. T. Liu, L. B. Hou und Z. L. Chen (1998). Effects of ciclosporin on whole blood chemiluminescence of renal transplant patients. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 19(4): 372-5.
- Cherian, M. G. und P. J. Ferguson (1997). Metallothionein in cytotoxicity and genotoxicity of metals. *Cytotoxic, Mutagenic and Carcinogenic Potential of Heavy Metals Related to Human Environment*. N. D. Hadjiliadis. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 217-229.
- Cogoli-Greuter, M., P. Lovis und S. Vadrucchi (2004). Signal transduction in T cells: an overview. *J Gravit Physiol* 11(2): P53-6.
- Cogoli-Greuter, M., A. Spano, L. Sciola, P. Pippia und A. Cogoli (1998). Influence of microgravity on mitogen binding, motility and cytoskeleton patterns of T lymphocytes and Jurkat cells – experiments on sounding rocket. *Jpn J Aerospace Environ Med* 35 27–39.
- Cogoli, A. (1993). The effect of hypogravity and hypergravity on cells of the immune system. *J Leukoc Biol* 54(3): 259-68.
- Cogoli, A. (1997). Signal transduction in T lymphocytes in microgravity. *Gravit Space Biol Bull* 10(2): 5-16.
- Cogoli, A. und M. Cogoli-Greuter (1997). Activation and proliferation of lymphocytes and other mammalian cells in microgravity. *Adv Space Biol Med* 6: 33-79.
- Cogoli, A., A. Tschopp und P. Fuchs-Bislin (1984). Cell sensitivity to gravity. *Science* 225(4658): 228-30.
- Confavreux, C., M. Hutchinson, M. M. Hours, P. Cortinovis-Tourniaire und T. Moreau (1998). Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. *Pregnancy in Multiple Sclerosis Group*. *N Engl J Med* 339(5): 285-91.
- Cox, G., J. Crossley und Z. Xing (1995). Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12(2): 232-7.
- Crabtree, G. R. (1999). Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca<sup>2+</sup>, calcineurin, and NF-AT. *Cell* 96(5): 611-4.
- Craven, N. (1986). Chemotactic factors for bovine neutrophils in relation to mastitis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 9(1): 29-36.
- Cubano, L. A. und M. L. Lewis (2000). Fas/APO-1 protein is increased in spaceflown lymphocytes (Jurkat). *Exp Gerontol* 35(3): 389-400.
- Dahlgren, C. und A. Karlsson (1999). Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods* 232(1-2): 3-14.
- Dahlgren, C. und O. Stendahl (1983). Role of myeloperoxidase in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 39(2): 736-41.

- Dalby-Brown, L., H. Barsett, A. K. Landbo, A. S. Meyer und P. Molgaard (2005). Synergistic antioxidative effects of alkamides, caffeic acid derivatives, and polysaccharide fractions from *Echinacea purpurea* on in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. *J Agric Food Chem* 53(24): 9413-23.
- Davenport, C. B. (1908). *Experimental Morphology*. 3rd edition. New York, Macmillan Publishing Co.
- de Groot, R. P., P. J. Rijken, J. den Hertog, J. Boonstra, A. J. Verkleij, S. W. de Laat und W. Kruijer (1990). Microgravity decreases c-fos induction and serum response element activity. *J Cell Sci* 97 ( Pt 1): 33-8.
- Decoursey, T. E. und E. Ligeti (2005). Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell Mol Life Sci* 62(19-20): 2173-93.
- Degan, P., M. Sancandi, A. Zunino, L. Ottaggio, S. Viaggi, F. Cesarone, P. Pippia, G. Galleri und A. Abbondandolo (2005). Exposure of human lymphocytes and lymphoblastoid cells to simulated microgravity strongly affects energy metabolism and DNA repair. *J Cell Biochem* 94(3): 460-9.
- Del Rio-Hortega, P. (1932). *Microglia. Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*. W. Penfield. New York, Paul P Hocker. 2: 481-534.
- Deme, S., I. Apathy, T. Pazmandi, E. R. Benton, G. Reitz und Y. Akatov (2006). On-board TLD measurements on MIR and ISS. *Radiat Prot Dosimetry* 120(1-4): 438-41.
- Denegre, J. M., J. M. Valles, Jr., K. Lin, W. B. Jordan und K. L. Mowry (1998). Cleavage planes in frog eggs are altered by strong magnetic fields. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(25): 14729-32.
- Descotes, J. (2000). Autoimmunity and toxicity testing. *Toxicol Lett* 112-113: 461-5.
- DeYulia, G. J., Jr., J. M. Carcamo, O. Borquez-Ojeda, C. C. Shelton und D. W. Golde (2005). Hydrogen peroxide generated extracellularly by receptor-ligand interaction facilitates cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(14): 5044-9.
- Dhondt, A., R. Vanholder, M. A. Waterloos, G. Glorieux, R. De Smet und S. Ringoir (1998). In vitro effect of cefodizime, imipenem/cilastatin and co-trimoxazole on dexamethasone and cyclosporin A depressed phagocytosis. *Infection* 26(2): 120-5.
- Dillard, G. M. und P. Bodel (1970). Studies on steroid fever. II. Pyrogenic and anti-pyrogenic activity in vitro of some endogenous steroids of man. *J Clin Invest* 49(12): 2418-26.
- Dobrovolskaia, M. A. und S. N. Vogel (2002). Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect* 4(9): 903-14.
- Dore, M., D. O. Slauson und N. R. Neilsen (1990). Membrane NADPH oxidase activity and cell size in bovine neonatal and adult neutrophils. *Pediatr Res* 28(4): 327-31.
- el-Hag, A., P. E. Lipsky, M. Bennett und R. A. Clark (1986). Immunomodulation by neutrophil myeloperoxidase and hydrogen peroxide: differential susceptibility of human lymphocyte functions. *J Immunol* 136(9): 3420-6.

- Elstner, E. F. (1990). *Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin*. Mannheim-Wien-Zürich, BI Verlagsgesellschaft.
- Faldt, J., M. Ridell, A. Karlsson und C. Dahlgren (1999). The phagocyte chemiluminescence paradox: luminol can act as an inhibitor of neutrophil NADPH-oxidase activity. *Luminescence* 14(3): 153-60.
- Faulkner, K. und I. Fridovich (1993). Luminol and lucigenin as detectors for O<sub>2</sub>. *Free Radic Biol Med* 15(4): 447-51.
- FDA (1999). Immunotoxicity Testing Guidance. Guidance for Industry and FDA Reviewers <http://www.fda.gov/cdrh/ost/ostggp/immunotox.html>.
- Fellenberg, G. (1990). *Chemie der Umweltbelastung*. Stuttgart, Teubner Studienbücher.
- Fildes, J., S. Fisher, C. M. Sheaff und J. A. Barrett (1998). Effects of short heat exposure on human red and white blood cells. *J Trauma* 45(3): 479-84.
- Finkel, T. (1998). Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 10(2): 248-53.
- Fleming, S. D., L. S. Edelman und S. K. Chapes (1991). Effects of corticosterone and microgravity on inflammatory cell production of superoxide. *J Leukoc Biol* 50(1): 69-76.
- Fontayne, A., P. M. Dang, M. A. Gougerot-Pocidalo und J. El-Benna (2002). Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry* 41(24): 7743-50.
- Forman, H. J. und M. Torres (2002). Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med* 166(12 Pt 2): S4-8.
- Formigli, L., E. Meacci, C. Sassoli, R. Squecco, D. Nosi, F. Chellini, F. Naro, F. Francini und S. Zecchi-Orlandini (2007). Cytoskeleton/stretch-activated ion channel interaction regulates myogenic differentiation of skeletal myoblasts. *J Cell Physiol* 211(2): 296-306.
- Franchimont, D., H. Martens, M. T. Hagelstein, E. Louis, W. Dewe, G. P. Chrousos, J. Belaiche und V. Geenen (1999). Tumor necrosis factor alpha decreases, and interleukin-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone: potential regulation of the glucocorticoid receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 84(8): 2834-9.
- Fraser, I. P., H. Koziel und R. A. Ezekowitz (1998). The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin Immunol* 10(5): 363-72.
- Freeman, M. P., K. W. Smith, S. A. Freeman, S. L. McElroy, G. E. Kmetz, R. Wright und P. E. Keck, Jr. (2002). The impact of reproductive events on the course of bipolar disorder in women. *J Clin Psychiatry* 63(4): 284-7.
- Fujishima, S. und N. Aikawa (1995). Neutrophil-mediated tissue injury and its modulation. *Intensive Care Med* 21(3): 277-85.
- Gallagher, K. E. und I. Gray (1981). Cadmium inhibition of RNA metabolism in murine lymphocytes. *J Immunopharmacol* 3(3-4): 339-61.

- Galleri, G., M. A. Meloni, M. G. Camboni, M. Deligios, A. Cogoli und P. Pippia (2002). Signal transduction in T lymphocytes under simulated microgravity conditions: involvement of PKC isoforms. *J Gravit Physiol* 9(1): P289-90.
- Gao, D. und J. K. Critser (2000). Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells. *ILAR Journal* V41.
- Gebicke-Haerter, P. J., K. Lieb, P. Illes und M. Berger (1998). [Microglia: mechanisms of activation and significance in pathogenesis of neuropsychiatric illnesses]. *Nervenarzt* 69(9): 752-62.
- Gehrmann, J., Y. Matsumoto und G. W. Kreutzberg (1995). Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 20(3): 269-87.
- Greenwood, N. N. und A. Earnshaw (1990). *Chemie der Elemente*. Weinheim, VCH.
- Gertsch, J., R. Schoop, U. Kuenzle und A. Suter (2004). Echinacea alkylamides modulate TNF-alpha gene expression via cannabinoid receptor CB2 and multiple signal transduction pathways. *FEBS Lett* 577(3): 563-9.
- Gerzer, R., R. Hemmersbach und G. Horneck (2006). *Life Sciences. Utilization of Space. Today and Tomorrow*. B. Feuerbacher und H. Stoewer. Berlin Heidelberg New York, Springer: 341-373.
- Gmunder, F. K., M. Kiess, G. Sonnenfeld, J. Lee und A. Cogoli (1992). Reduced lymphocyte activation in space: role of cell-substratum interactions. *Adv Space Res* 12(1): 55-61.
- Goel, H. L. und C. S. Dey (2002). PKC-regulated myogenesis is associated with increased tyrosine phosphorylation of FAK, Cas, and paxillin, formation of Cas-CRK complex, and JNK activation. *Differentiation* 70(6): 257-71.
- Goel, V., R. Lovlin, C. Chang, J. V. Slama, R. Barton, R. Gahler, R. Bauer, L. Goonewardene und T. K. Basu (2005). A proprietary extract from the echinacea plant (*Echinacea purpurea*) enhances systemic immune response during a common cold. *Phytother Res* 19(8): 689-94.
- Gross, O., A. Gewies, K. Finger, M. Schafer, T. Sparwasser, C. Peschel, I. Forster und J. Ruland (2006). Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* 442(7103): 651-6.
- Grzeskowiak, M., V. Della Bianca, P. De Togni, E. Papini und F. Rossi (1985). Independence with respect to Ca<sup>2+</sup> changes of the neutrophil respiratory and secretory response to exogenous phospholipase C and possible involvement of diacylglycerol and protein kinase C. *Biochim Biophys Acta* 844(1): 81-90.
- Häder, D. P., R. Hemmersbach und M. Lebert (2005). *Gravity and the behaviour of unicellular organisms*. Cambridge, New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, São Paul, Cambridge University Press.
- Halliwell, B. und J. M. C. Gutteridge (1999). *Free radicals in biology and medicine*. Third Edition. Oxford, Oxford University Press.
- Hampton, M. B., A. J. Kettle und C. C. Winterbourn (1998). Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92(9): 3007-17.

- Haslett, C., A. Lee, J. S. Savill, L. Meagher und M. K. Whyte (1991). Apoptosis (programmed cell death) and functional changes in aging neutrophils. Modulation by inflammatory mediators. *Chest* 99(3 Suppl): 6S.
- Haslett, C., J. S. Savill, M. K. Whyte, M. Stern, I. Dransfield und L. C. Meagher (1994). Granulocyte apoptosis and the control of inflammation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 345(1313): 327-33.
- Hatton, J. P., F. Gaubert, J. P. Cazenave und D. Schmitt (2002). Microgravity modifies protein kinase C isoform translocation in the human monocytic cell line U937 and human peripheral blood T-cells. *J Cell Biochem* 87(1): 39-50.
- Helmke, R. J., V. F. German und J. A. Mangos (1989). A continuous alveolar macrophage cell line: comparisons with freshly derived alveolar macrophages. *In Vitro Cell Dev Biol* 25(1): 44-8.
- Hemmersbach, R., M. von der Wiesche und D. Seibt (2006). Ground-based experimental platforms in gravitational biology and human physiology. *Signal Transduction* 6: 381 - 387.
- Henderson, L. M., J. B. Chappell und O. T. Jones (1988). Internal pH changes associated with the activity of NADPH oxidase of human neutrophils. Further evidence for the presence of an H<sup>+</sup> conducting channel. *Biochem J* 251(2): 563-7.
- Hildebrandt, G., M. P. Seed, C. N. Freemantle, C. A. Alam, P. R. Colville-Nash und K. R. Trott (1998). Mechanisms of the anti-inflammatory activity of low-dose radiation therapy. *Int J Radiat Biol* 74(3): 367-78.
- Hock, B. und D. P. Häder (2006). Graviresponses in fungi and slime molds. *Signal Transduction* 6: 443 - 448.
- Holmes, B., A. R. Page und R. A. Good (1967). Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function. *J Clin Invest* 46(9): 1422-32.
- Horneck, G., P. Rettberg, C. Baumstark-Khan, H. Rink, S. Kozubek, M. Schafer und C. Schmitz (1996). DNA repair in microgravity: studies on bacteria and mammalian cells in the experiments REPAIR and KINETICS. *J Biotechnol* 47(2-3): 99-112.
- Horneck, G., P. Rettberg, S. Kozubek, C. Baumstark-Khan, H. Rink, M. Schafer und C. Schmitz (1997). The influence of microgravity on repair of radiation-induced DNA damage in bacteria and human fibroblasts. *Radiat Res* 147(3): 376-84.
- Howard, S. A., S. M. Brooke und R. M. Sapolsky (2001). Mechanisms of estrogenic protection against gp120-induced neurotoxicity. *Exp Neurol* 168(2): 385-91.
- Huber, K., M. Krotz-Fahning und B. Hock (2006). Respiratory burst as a biomarker for stress responses. *Protoplasma* 229(2-4): 221-4.
- Huber, K., M. Krötz-Fahning und B. Hock (2005). Phagocytosis as a biomarker for stress responses. *J. Gravit. Physiol* 12(1): 265-266
- Huber, T. J., J. Rollnik, J. Wilhelms, A. von zur Muhlen, H. M. Emrich und U. Schneider (2001). Estradiol levels in psychotic disorders. *Psychoneuroendocrinology* 26(1): 27-35.



- Husemann, J., J. D. Loike, R. Anankov, M. Febbraio und S. C. Silverstein (2002). Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia* 40(2): 195-205.
- Infanger, M., P. Kossmehl, M. Shakibaei, J. Bauer, S. Kossmehl-Zorn, A. Cogoli, F. Curcio, A. Oksche, M. Wehland, R. Kreutz, M. Paul und D. Grimm (2006). Simulated weightlessness changes the cytoskeleton and extracellular matrix proteins in papillary thyroid carcinoma cells. *Cell Tissue Res* 324(2): 267-77.
- Ingber, D. (1999). How cells (might) sense microgravity. *Faseb J* 13 Suppl: S3-15.
- Irato, P., G. Santovito, E. Piccinni und V. Albergoni (2001). Oxidative burst and metallothionein as a scavenger in macrophages. *Immunol Cell Biol* 79(3): 251-4.
- Iwasaka, M., J. Miyakoshi und S. Ueno (2003). Magnetic field effects on assembly pattern of smooth muscle cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 39(3-4): 120-3.
- Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport und S. M. (2002). *Immunologie*. 5. Auflage. Heidelberg Berlin, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Jareo, P. W., L. C. Preheim und M. J. Gentry (1996). Ethanol ingestion impairs neutrophil bactericidal mechanisms against *Streptococcus pneumoniae*. *Alcohol Clin Exp Res* 20(9): 1646-52.
- Johansson, A. und C. Dahlgren (1989). Characterization of the luminol-amplified light-generating reaction induced in human monocytes. *J Leukoc Biol* 45(5): 444-51.
- Johnson, T. M., Z. X. Yu, V. J. Ferrans, R. A. Lowenstein und T. Finkel (1996). Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(21): 11848-52.
- Jokinen, E. I., H. M. Salo, S. E. Markkula, T. M. Aaltonen und A. K. Immonen (2000). Effects of ultraviolet light on immune parameters of the roach. *Toxicol Lett* 112-113: 303-10.
- Jurcic, K., D. Melchart, M. Holzmann, P. Martin, R. Bauer, A. Doenecke und H. Wagner (1989). Zwei Probandenstudien zur Stimulierung der Granulozytenphagozytose durch Echinacea-Extrakt-haltige Präparate. *Zeitschrift für Phytotherapie* 10: 67 - 70.
- Kass, G. H. (1955). Hypothermia following cortisone administration. *Amer. J. Med.* 18: 146.
- Kaur, I., E. R. Simons, V. A. Castro, C. Mark Ott und D. L. Pierson (2004). Changes in neutrophil functions in astronauts. *Brain Behav Immun* 18(5): 443-50.
- Kaur, I., E. R. Simons, V. A. Castro, C. M. Ott und D. L. Pierson (2005). Changes in monocyte functions of astronauts. *Brain Behav Immun* 19(6): 547-54.
- Khurana, A. und C. S. Dey (2003). p38 MAPK interacts with actin and modulates filament assembly during skeletal muscle differentiation. *Differentiation* 71(1): 42-50.
- Kim, S. U. und J. de Vellis (2005). Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 81(3): 302-13.

- Kipnis, T. L., S. L. James, A. Sher und J. R. David (1981). Cell-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. II. Antibody-dependent killing of bloodstream forms by mouse eosinophils and neutrophils. *Am J Trop Med Hyg* 30(1): 47-53.
- Klaus, D., S. Simske, P. Todd und L. Stodieck (1997). Investigation of space flight effects on *Escherichia coli* and a proposed model of underlying physical mechanisms. *Microbiology* 143 (Pt 2): 449-55.
- Klebanoff, S. J. (1991). Myeloperoxidase: occurrence and biological function. *Peroxidases in Chemistry and Biology*. J. Everse, K. E. Everse und M. B. Grishan. Boca Ranton, FL, CRC Press: 1 - 35.
- Kleinert, H., P. M. Schwarz und U. Forstermann (2003). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem* 384(10-11): 1343-64.
- Koller, L. D. (1973). Immunosuppression produced by lead, cadmium, and mercury. *Am J Vet Res* 34(11): 1457-8.
- Kondepudi, D. K. (1989). State selection dynamics in symmetry-breaking transitions. *Noise in Nonlinear Dynamical Systems*. F. Moss und P. V. E. McClintock, Cambridge University Press. 2: 251 - 267.
- Kondepudi, D. K. (1991). Detection of gravity through nonequilibrium mechanisms. *ASGSB Bull* 4(2): 119-24.
- Kono, H., I. Rusyn, B. U. Bradford, H. D. Connor, R. P. Mason und R. G. Thurman (2000). Allopurinol prevents early alcohol-induced liver injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 293(1): 296-303.
- Kono, H., I. Rusyn, M. Yin, E. Gabele, S. Yamashina, A. Dikalova, M. B. Kadiiska, H. D. Connor, R. P. Mason, B. H. Segal, B. U. Bradford, S. M. Holland und R. G. Thurman (2000). NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. *J Clin Invest* 106(7): 867-72.
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19(8): 312-8.
- Krutmann, J. (2001). Die Verwendung von topisch appliziertem DNS-Reparaturenzymen zum Schutz der menschlichen Haut gegen UVB-induzierte Schäden. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* 44: 480 - 483.
- Kurokawa, T., T. Nonami, H. Kobayashi, W. Kishimoto, K. Uchida, H. Takagi, S. Sugiyama und T. Ozawa (1992). Inhibition by cyclosporine of the production of superoxide radicals. *N Engl J Med* 326(12): 840.
- Leach Huntoon, C., N. Cintron und P. A. Whitson (1994). Endocrine and Biochemical Functions. *Space Physiology and Medicine*. A. E. Nicogossian, C. E. Leach Huntoon und S. L. Pool. Philadelphia, Lea & Febiger - a Waverly Company: 334 - 350.
- Lefkowitz, D. L., J. A. Lincoln, K. R. Howard, R. Stuart, S. S. Lefkowitz und R. C. Allen (1997). Macrophage-mediated candidacidal activity is augmented by exposure to eosinophil peroxidase: a paradigm for eosinophil-macrophage interaction. *Inflammation* 21(2): 159-72.

- Lewis, M. L. (2002). The cytoskeleton, apoptosis, and gene expression in T lymphocytes and other mammalian cells exposed to altered gravity. *Adv Space Biol Med* 8: 77-128.
- Lewis, M. L., J. L. Reynolds, L. A. Cubano, J. P. Hatton, B. D. Lawless und E. H. Piepmeier (1998). Spaceflight alters microtubules and increases apoptosis in human lymphocytes (Jurkat). *Faseb J* 12(11): 1007-18.
- Lieb, K., S. Engels und B. L. Fiebich (2003). Inhibition of LPS-induced iNOS and NO synthesis in primary rat microglial cells. *Neurochem Int* 42(2): 131-7.
- Limouse, M., S. Manie, I. Konstantinova, B. Ferrua und L. Schaffar (1991). Inhibition of phorbol ester-induced cell activation in microgravity. *Exp Cell Res* 197(1): 82-6.
- Lincoln, J. A., D. L. Lefkowitz, T. Cain, A. Castro, K. C. Mills, S. S. Lefkowitz, N. Moguilevsky und A. Bollen (1995). Exogenous myeloperoxidase enhances bacterial phagocytosis and intracellular killing by macrophages. *Infect Immun* 63(8): 3042-7.
- Longdon, N. und V. David (1988). Biorack on D1. ESA SP 1091.
- Lundqvist, H., L. J. Kricka, R. A. Stott, G. H. Thorpe und C. Dahlgren (1995). Influence of different luminols on the characteristics of the chemiluminescence reaction in human neutrophils. *J Biolumin Chemilumin* 10(6): 353-9.
- Luster, M. I., N. Kerkvliet und G. J. Rosenthal (1995). Immunotoxicity. Screening and Testing Chemicals in Commerce. OTA-BP-ENV-166, U.S. Congress, Office of Technology Assessment.
- MacMicking, J., Q. W. Xie und C. Nathan (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15: 323-50.
- Maianski, N. A., A. N. Maianski, T. W. Kuijpers und D. Roos (2004). Apoptosis of neutrophils. *Acta Haematol* 111(1-2): 56-66.
- Mazur, P., S. P. Leibo und E. H. Chu (1972). A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Res* 71(2): 345-55.
- Medzhitov, R. und C. Janeway, Jr. (2000). Innate immunity. *N Engl J Med* 343(5): 338-44.
- Meloni, M. A., G. Galleri, S. Carta, R. Negri, G. Costanzo, V. De Sanctis, A. Cogoli und P. Pippia (2002). Preliminary study of gene expression levels in human T-cells exposed to cosmic radiations. *J Gravit Physiol* 9(1): P291-2.
- Meloni, M. A., G. Galleri, P. Pippia und M. Cogoli-Greuter (2006). Cytoskeleton changes and impaired motility of monocytes at modelled low gravity. *Protoplasma* 229(2-4): 243-9.
- Mesland, D. A. (1992). Mechanisms of gravity effects on cells: are there gravity-sensitive windows? *Adv Space Biol Med* 2: 211-28.
- Mills, P. J., J. V. Meck, W. W. Waters, D. D'Aunno und M. G. Ziegler (2001). Peripheral leukocyte subpopulations and catecholamine levels in astronauts as a function of mission duration. *Psychosom Med* 63(6): 886-90.

- Morel, F., J. Doussiere und P. V. Vignais (1991). The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur J Biochem* 201(3): 523-46.
- Morisaki, H. (1989). [Inhibition of neutrophil function by solvent of injectable sedatives--effects of propylene glycol, ethanol and benzyl alcohol]. *Masui* 38(12): 1588-96.
- Morrow, M. A. (2006). Clinorotation differentially inhibits T-lymphocyte transcription factor activation. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 42(5-6): 153-8.
- Mouithys-Mickalad, A., G. Deby-Dupont, M. Mathy-Hartert, Y. Habraken, M. Nys, Y. Henrotin, M. Lamy und C. Deby (2004). Effects of glucocorticoids on the respiratory burst of Chlamydia-primed THP-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 318(4): 941-8.
- Nakajima, K. und S. Kohsaka (2001). Microglia: activation and their significance in the central nervous system. *J Biochem (Tokyo)* 130(2): 169-75.
- Nakamura, Y. (2002). Regulating factors for microglial activation. *Biol Pharm Bull* 25(8): 945-53.
- Nguyen, N. S., S. M. Pulido und U. T. Ruegg (1998). Biphasic effects of cyclosporin A on formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine stimulated responses in HL-60 cells differentiated into neutrophils. *Br J Pharmacol* 124(8): 1774-80.
- Norimatsu, M., J. Harris, V. Chance, G. Dougan, C. J. Howard und B. Villarreal-Ramos (2003). Differential response of bovine monocyte-derived macrophages and dendritic cells to infection with *Salmonella typhimurium* in a low-dose model in vitro. *Immunology* 108(1): 55-61.
- NTP (1994). Immunotoxicity of Atrazine (CAS No. 1912-24-9) in Female B6C3F1 Mice. National Toxicology Program Report Number IMM94002.
- Obe, G., I. Johannes, C. Johannes, K. Hallman, G. Reitz und R. Facius (1997). Chromosomal aberrations in blood lymphocytes of astronauts after long-term space flights. *Int J Radiat Biol* 72(6): 727-34.
- Ohmann, H. B., M. Campos, L. McDougall, M. J. Lawman und L. A. Babiuk (1990). Expression of tumor necrosis factor-alpha receptors on bovine macrophages, lymphocytes and polymorphonuclear leukocytes, internalization of receptor-bound ligand, and some functional effects. *Lymphokine Res* 9(1): 43-58.
- Pallardy, M., S. Kerdine und H. Lebrech (1998). Testing strategies in immunotoxicology. *Toxicol Lett* 102-103: 257-60.
- Papaseit, C., N. Pochon und J. Tabony (2000). Microtubule self-organization is gravity-dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(15): 8364-8.
- Pease, B. (1991) Immunotoxicity definitions. <http://purplehaze.4mg.com/glossary.html>, DOI:
- Pfeffer, W. (1897). Locomotorische Richtungsbewegungen durch chemische Reize. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 15: 524 - 533.
- Polyak, K., Y. Xia, J. L. Zweier, K. W. Kinzler und B. Vogelstein (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389(6648): 300-5.

- Pontarollo, R. A., R. Rankin, L. A. Babiuk, D. L. Godson, P. J. Griebel, R. Hecker, A. M. Krieg und S. van Drunen Littel-van den Hurk (2002). Monocytes are required for optimum in vitro stimulation of bovine peripheral blood mononuclear cells by non-methylated CpG motifs. *Vet Immunol Immunopathol* 84(1-2): 43-59.
- Pryor, W. A. und G. L. Squadrito (1995). The chemistry of peroxyne: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 268(5 Pt 1): L699-722.
- Pugh, N. D., P. Balachandran, H. Lata, F. E. Dayan, V. Joshi, E. Bedir, T. Makino, R. Moraes, I. Khan und D. S. Pasco (2005). Melanin: dietary mucosal immune modulator from Echinacea and other botanical supplements. *Int Immunopharmacol* 5(4): 637-47.
- Rabbow, E., P. Rettberg, C. Baumstark-Khan und G. Horneck (2003). The SOS-LUX-LAC-FLUORO-Toxicity-test on the International Space Station (ISS). *Adv Space Res* 31(6): 1513-24.
- Rabbow, E., N. Stojicic, D. Walrafen, C. Baumstark-Khan, P. Rettberg, D. Schulze-Varnholt, M. Franz und G. Reitz (2006). The SOS-LUX-TOXICITY-Test on the International Space Station. *Res Microbiol* 157(1): 30-6.
- Raduner, S., A. Majewska, J. Z. Chen, X. Q. Xie, J. Hamon, B. Faller, K. H. Altmann und J. Gertsch (2006). Alkylamides from Echinacea are a new class of cannabinomimetics. Cannabinoid type 2 receptor-dependent and -independent immunomodulatory effects. *J Biol Chem* 281(20): 14192-206.
- Reitz, G. und T. Berger (2006). The MATROSHKA facility--dose determination during an EVA. *Radiat Prot Dosimetry* 120(1-4): 442-5.
- Roesler, J., C. Steinmuller, A. Kiderlen, A. Emmendorffer, H. Wagner und M. L. Lohmann-Matthes (1991). Application of purified polysaccharides from cell cultures of the plant Echinacea purpurea to mice mediates protection against systemic infections with *Listeria monocytogenes* and *Candida albicans*. *Int J Immunopharmacol* 13(1): 27-37.
- Roilides, E., T. Robinson, T. Sein, P. A. Pizzo und T. J. Walsh (1994). In vitro and ex vivo effects of cyclosporin A on phagocytic host defenses against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 38(12): 2883-8.
- Ross, G. D., J. A. Cain und P. J. Lachmann (1985). Membrane complement receptor type three (CR3) has lectin-like properties analogous to bovine conglutinin as functions as a receptor for zymosan and rabbit erythrocytes as well as a receptor for iC3b. *J Immunol* 134(5): 3307-15.
- Sachs, L. (2004). *Angewandte Statistik*. 11. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag.
- Sanlioglu, S., C. M. Williams, L. Samavati, N. S. Butler, G. Wang, P. B. McCray, Jr., T. C. Ritchie, G. W. Hunninghake, E. Zandi und J. F. Engelhardt (2001). Lipopolysaccharide induces Rac1-dependent reactive oxygen species formation and coordinates tumor necrosis factor- $\alpha$  secretion through IKK regulation of NF- $\kappa$ B. *J Biol Chem* 276(32): 30188-98.
- Savill, J. S., A. H. Wyllie, J. E. Henson, M. J. Walport, P. M. Henson und C. Haslett (1989). Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* 83(3): 865-75.

- Schatten, H., M. L. Lewis und A. Chakrabarti (2001). Spaceflight and clinorotation cause cytoskeleton and mitochondria changes and increases in apoptosis in cultured cells. *Acta Astronaut* 49(3-10): 399-418.
- Schatz, A., W. Briegleb und J. Neubert (1973). 0-g conditions in laboratory experiments - The important parameters and limitations. XXI International Congress of Aviation and Space Medicine - Reprints of Scientific Programme. München: 111 - 112.
- Schenck, J. F. (2000). Safety of strong, static magnetic fields. *J Magn Reson Imaging* 12(1): 2-19.
- Schneider, T., D. van Velzen, R. Moqbel und A. C. Issekutz (1997). Kinetics and quantitation of eosinophil and neutrophil recruitment to allergic lung inflammation in a brown Norway rat model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17(6): 702-12.
- Schoenwaelder, S. M. und K. Burridge (1999). Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol* 11(2): 274-86.
- Sciola, L., M. Cogoli-Greuter, A. Cogoli, A. Spano und P. Pippia (1999). Influence of microgravity on mitogen binding and cytoskeleton in Jurkat cells. *Adv Space Res* 24(6): 801-5.
- Senchina, D. S., D. A. McCann, J. M. Asp, J. A. Johnson, J. E. Cunnick, M. S. Kaiser und M. L. Kohut (2005). Changes in immunomodulatory properties of Echinacea spp. root infusions and tinctures stored at 4 degrees C for four days. *Clin Chim Acta* 355(1-2): 67-82.
- Shalabi, E. A. und A. S. al-Tuwaijri (1996). The thermal potentiation of acetaminophen-inhibited PMN oxidative metabolism in vitro. *Biopharm Drug Dispos* 17(6): 501-9.
- Sherwin, B. B. (2002). Estrogen and cognitive aging in women. *Trends Pharmacol Sci* 23(11): 527-34.
- Shibuya, T., K. Izuchi, A. Kuroiwa, H. Harada, A. Kumamoto und K. Shirakawa (1991). Study on nonspecific immunity in pregnant women: II. Effect of hormones on chemiluminescence response of peripheral blood phagocytes. *Am J Reprod Immunol* 26(2): 76-81.
- Sierra, C., R. Lascurain, A. Pereyra, J. Guevara, G. Martinez, C. Agundis, E. Zenteno und L. Vazquez (2005). Participation of serum and membrane lectins on the oxidative burst regulation in *Macrobrachium rosenbergii* hemocytes. *Dev Comp Immunol* 29(2): 113-21.
- Silverstein, A. M. (1979). History of immunology. *Cell Immunol* 42(1): 1-2.
- Smith, D., E. K. Lee, P. Saloupis, J. K. Davis und D. L. Hatchell (1994). Role of neutrophils in breakdown of the blood-retinal barrier following intravitreal injection of platelet-activating factor. *Exp Eye Res* 59(4): 425-32.
- Sovcikova, A., J. Tulinska, J. Kubova, A. Liskova, D. Syrova und K. Horakova (2002). Effect of cyclosporin A in Lewis rats in vivo and HeLa cells in vitro. *J Appl Toxicol* 22(3): 153-60.
- Stahl, M., K. Reifenberg, S. Okpanyi und U. Losch (1990). Porcine granulocyte functions: evaluation and modulation. *Zentralbl Veterinarmed B* 37(4): 261-7.

- Steinbeck, M. J., A. U. Khan und M. J. Karnovsky (1992). Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *J Biol Chem* 267(19): 13425-33.
- Stimpel, M., A. Proksch, H. Wagner und M. L. Lohmann-Matthes (1984). Macrophage activation and induction of macrophage cytotoxicity by purified polysaccharide fractions from the plant *Echinacea purpurea*. *Infect Immun* 46(3): 845-9.
- Streit, W. J. (2002). Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40(2): 133-9.
- Stryer, L. (1995). *Biochemie*. 4. Auflage. Heidelberg Berlin Oxford, Spektrum Akademischer Verlag.
- Strzemienski, P. J., R. M. Dyer und R. M. Kenney (1987). Effect of estradiol and progesterone on antistaphylococcal activity of neutrophils from ovariectomized mares. *Am J Vet Res* 48(11): 1638-41.
- Stuehr, D. J. (1999). Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1411(2-3): 217-30.
- Suzuki, Y. J., H. J. Forman und A. Sevanian (1997). Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med* 22(1-2): 269-85.
- Tabony, J. und D. Job (1992). Gravitational symmetry breaking in microtubular dissipative structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(15): 6948-52.
- Tauber, A. I. (1987). Protein kinase C and the activation of the human neutrophil NADPH-oxidase. *Blood* 69(3): 711-20.
- Thorat, S. P., U. M. Thatte, N. Pai und S. A. Dahanukar (1994). Inhibition of phagocytes by cyclosporin in vitro. *Q J Med* 87(5): 311-4.
- Titheradge, M. A. (1999). Nitric oxide in septic shock. *Biochim Biophys Acta* 1411(2-3): 437-55.
- Todd, P. und D. M. Klaus (1996). Theories and models on the biology of cells in space. *Adv Space Res* 17(6-7): 3-10.
- Tsangaris, G. T. und F. Tzortzatou-Stathopoulou (1998). Cadmium induces apoptosis differentially on immune system cell lines. *Toxicology* 128(2): 143-50.
- Turner, R. B., R. Bauer, K. Woelkart, T. C. Hulsey und J. D. Gangemi (2005). An evaluation of *Echinacea angustifolia* in experimental rhinovirus infections. *N Engl J Med* 353(4): 341-8.
- Ullrich, O., A. Diestel, I. Bechmann, M. Homberg, T. Grune, R. Hass und R. Nitsch (2001). Turnover of oxidatively damaged nuclear proteins in BV-2 microglial cells is linked to their activation state by poly-ADP-ribose polymerase. *Faseb J* 15(8): 1460-2.
- Unanue, E. R. (1976). Secretory function of mononuclear phagocytes: a review. *Am J Pathol* 83(2): 396-417.

- Underhill, D. M., A. Ozinsky, A. M. Hajjar, A. Stevens, C. B. Wilson, M. Bassetti und A. Aderem (1999). The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401(6755): 811-5.
- United States Congress, O. o. T. A. (1991). Identifying and Controlling immunotoxic Substances - Background Paper. OTA-BP-BA-75. Washington, DC, U.S. Government Printing Office.
- Valles, J. M., Jr., K. Lin, J. M. Denegre und K. L. Mowry (1997). Stable magnetic field gradient levitation of *Xenopus laevis*: toward low-gravity simulation. *Biophys J* 73(2): 1130-3.
- Valles, J. M., Jr., H. J. Maris, G. M. Seidel, J. Tang und W. Yao (2005). Magnetic levitation-based Martian and Lunar gravity simulator. *Adv Space Res* 36(1): 114-8.
- Van Dyke, K., S. Patel und V. Vallyathan (2003). Lucigenin chemiluminescence assay as an adjunctive tool for assessment of various stages of inflammation: a study of quiescent inflammatory cells. *J Biosci* 28(1): 115-9.
- van Rossum, D. und U. K. Hanisch (2004). Microglia. *Metab Brain Dis* 19(3-4): 393-411.
- Venuprasad, K., P. P. Banerjee, S. Chattopadhyay, S. Sharma, S. Pal, P. B. Parab, D. Mitra und B. Saha (2002). Human neutrophil-expressed CD28 interacts with macrophage B7 to induce phosphatidylinositol 3-kinase-dependent IFN-gamma secretion and restriction of *Leishmania* growth. *J Immunol* 169(2): 920-8.
- Vilhardt, F. (2005). Microglia: phagocyte and glia cell. *Int J Biochem Cell Biol* 37(1): 17-21.
- von Knethen, A., A. Tautenhahn, H. Link, D. Lindemann und B. Brune (2005). Activation-induced depletion of protein kinase C alpha provokes desensitization of monocytes/macrophages in sepsis. *J Immunol* 174(8): 4960-5.
- Watson, F. und S. W. Edwards (1996). Stimulation of primed neutrophils by soluble immune complexes. *Biologicals* 24(4): 307-11.
- Werling, D. und T. W. Jungi (2003). TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol* 91(1): 1-12.
- Wessendorf, G., P. Scheibl und P. S. Zerbe (1998). [Effect of estrogens on the immune system with regard to bovine placental retention]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 105(1): 32-4.
- Weyts, F. A., G. Flik und B. M. Verburg-van Kemenade (1998). Cortisol inhibits apoptosis in carp neutrophilic granulocytes. *Dev Comp Immunol* 22(5-6): 563-72.
- Winters, K. R., E. Meyer, V. M. Van Merris, W. L. Van Den Broeck, L. Duchateau und C. Burvenich (2003). Sex steroid hormones do not influence the oxidative burst activity of polymorphonuclear leukocytes from ovariectomized cows in vitro. *Steroids* 68(5): 397-406.
- Woelkart, K., W. Xu, Y. Pei, A. Makriyannis, R. P. Picone und R. Bauer (2005). The endocannabinoid system as a target for alkaloids from *Echinacea angustifolia* roots. *Planta Med* 71(8): 701-5.
- Woodward, T. E., H. E. Hall, R. Dias-Rivera, J. A. Hightower, E. Martinez und R. T. Parker (1951). Treatment of typhoid fever. II. Control of clinical manifestations with cortisone. *Ann. Intern. Med.* 34: 10.



- Xu, X., J. Zhao, D. Jiang, J. Kong, B. Liu und J. Deng (2002). TiO<sub>2</sub> sol-gel derived amperometric biosensor for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the electropolymerized phenazine methosulfate modified electrode. *Anal Bioanal Chem* 374(7-8): 1261-6.
- Yu, C. F., M. A. Sanders und M. D. Basson (2000). Human caco-2 motility redistributes FAK and paxillin and activates p38 MAPK in a matrix-dependent manner. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278(6): G952-66.
- Zbinden, L. (1987). A toxicologist's view of immunotoxicology. *Immunotoxicology*. A. Berlin, J. Dean, M. H. Draper, E. M. B. Smith und F. Spreafico. Dordrecht, Boston, Lancaster, Martinus Nijhoff Publishers.
- Zelikoff, J. T. und M. D. Cohen (1996). *Immunotoxicology of Inorganic Metal Compounds. Experimental Immunotoxicology*. R. J. Smialowicz und M. P. Holsapple, CRC Press.
- Zeller, J. M. und B. L. Sullivan (1992). C-reactive protein selectively enhances the intracellular generation of reactive oxygen products by IgG-stimulated monocytes and neutrophils. *J Leukoc Biol* 52(4): 449-55.
- Zhang, F. L., H. W. Fu, P. J. Casey und W. R. Bishop (1996). Substitution of cadmium for zinc in farnesyl:protein transferase alters its substrate specificity. *Biochemistry* 35(25): 8166-71.
- Zimmermann, H. *Molekulare Prozesse beim Einfrieren von Zellen*. Kryoforschungsbank & Zentrum für Kryobiotechnologie. G. R. Fuhr, Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik: 24 - 26.

## 7 Anhang

**Tabelle 12** Einfluss verschiedener Zellkonzentrationen auf die Radikalbildung der Zelllinie NR8383, ermittelt im Luminoltest. Aufgelistet sind Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler (MW±SE).

NR8383		Radikalbildung				
		Luminol				
Zellzahlen		AUC	max.Peakhöhe	Zeit bei Peak [min]	Steigung [RLU/min]	lag time [min]
$1 \times 10^5$	MW	1730247,50	51728,00	26,50	4179,82	11,38
	± SE	99024,87	3719,95	0,96	346,24	0,53
	n	4	4	4	4	4
$5 \times 10^4$	MW	865503,00	23780,50	24,50	1949,47	12,73
	± SE	29923,99	721,54	0,96	39,33	0,68
	n	4	4	4	4	4
$2,5 \times 10^4$	MW	554661,25	14267,25	17,00	1479,36	10,60
	± SE	26867,68	869,24	1,87	247,89	3,02
	n	4	4	4	4	4

**Tabelle 13** Einfluss von Cadmium auf die Radikalbildung bei PMN nach PMA-Stimulation, ermittelt im Luminoltest. Aufgelistet sind Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler (MW±SE).

PMN stimuliert mit PMA		Radikalbildung				
		Luminol				
CdCl <sub>2</sub>		AUC	max.Peakhöhe	Zeit bei Peak [min]	Steigung [RLU/min]	lag time [min]
Kontrolle	MW	3036105,00	61728,99	22,34	3951,48	0,00
	± SE	185217,09	3684,38	0,91	69,90	0,00
	n	4	4	4	4	4
100 nM	MW	2431747,50 **	49007,27 **	29,04	2775,12	2,12
	± SE	53416,62	1395,01	0,91	114,21	0,91
	n	4	4	4	4	4
1 µM	MW	2450707,50 *	50399,24 *	27,92	3228,99	1,50
	± SE	41396,82	1627,01	2,14	545,83	1,19
	n	4	4	4	4	4
10 µM	MW	1959885,00 ***	37604,70 ***	26,81	2715,55 *	1,37
	± SE	88828,21	1579,75	1,58	228,17	0,54
	n	4	4	4	4	4
100 µM	MW	3348815,00 ***zu allen	45336,80 ***	37,42 ***	1926,36 ***	0,00
	± SE	99496,36 ausser	1332,71	2,11	106,50	0,00
	n	4 Kontrolle	4	4	4	4

**Tabelle 14** Einfluss von Cadmium auf die Radikalbildung bei PMN nach Zymosan-Stimulation, ermittelt im Luminoltest. Aufgelistet sind Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler (MW±SE).

PMN stimuliert mit Zymosan		Radikalbildung				
		Luminol				
CdCl <sub>2</sub>		AUC	max.Peakhöhe	Zeit bei Peak [min]	Steigung [RLU/min]	lag time [min]
<b>Kontrolle</b>	MW	629473,39	9155,75	28,00	792,50	9,75
	± SE	9357,60	198,73	0,00	240,67	0,48
	n	4	4	4	4	4
<b>100 nM</b>	MW	595964,66	8701,00	27,25	925,00	10,25
	± SE	14675,19	243,76	0,48	82,92	0,48
	n	4	4	4	4	4
<b>1 µM</b>	MW	552743,94 *	8004,00 **	26,75 *	917,50	9,75
	± SE	13742,16	249,04	0,25	112,80	0,48
	n	4	4	4	4	4
<b>10 µM</b>	MW	462239,96 ***	7093,50 ***	24,00 ***	912,50	9,25
	± SE	25422,09	106,55	0,00	64,21	0,25
	n	4	4	4	4	4
<b>100 µM</b>	MW	316574,71 ***	4800,00 ***	22,00 ***	518,75	10,25
	± SE	7381,64	136,40	0,00	20,04	0,48
	n	4	4	4	4	4

**Tabelle 15** Einfluss von Hydrocortison auf die Radikalbildung bei PMN nach PMA-Stimulation, ermittelt im Luminoltest. Aufgelistet sind Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler (MW±SE).

PMN stimuliert mit PMA		Radikalbildung				
		Luminol				
Hydrocortison		AUC	max.Peakhöhe	Zeit bei Peak [min]	Steigung [RLU/min]	lag time [min]
<b>Kontrolle</b>	MW	711034,45	24246,09	29,88	1974,36	10,41
	± SE	106747,99	4322,20	2,30	384,93	2,23
	n	4	4	4	4	4
<b>1 nM</b>	MW	1076930,51 **	38214,87 *	28,96	3161,28 *	8,87
	± SE	60150,69	2388,15	0,46	189,71	0,30
	n	4	4	4	4	4
<b>10 nM</b>	MW	1355965,00 ***	47906,26 ***	30,80	3919,17 ***	9,76
	± SE	72044,65	2803,67	0,46	289,60	0,53
	n	4	4	4	4	4
<b>100 nM</b>	MW	1019214,26 *	34886,42 *zu	29,88	2773,13 *zu	9,21
	± SE	46536,43	1812,98 10 nM	0,88	134,10 10 nM	0,66
	n	4	4	4	4	4
<b>1 µM</b>	MW	965084,01 **zu	32565,68 **zu	31,26	2532,75 **zu	10,03
	± SE	47546,25 10 nM	1678,07 10 nM	0,75	156,93 10 nM	0,36
	n	4	4	4	4	4
<b>10 µM</b>	MW	975099,25 **zu	33109,49 **zu	28,04	2686,41 *zu	8,56
	± SE	26435,95 10 nM	734,18 10 nM	0,88	65,06 10 nM	0,43
	n	4	4	4	4	4
<b>100 µM</b>	MW	960979,14 **zu	31705,29 **zu	29,42	2507,28 **zu	9,19
	± SE	58454,32 10 nM	2278,76 10 nM	0,00	217,83 10 nM	0,00
	n	4	4	4	4	4

**Tabelle 16** Einfluss von Hydrocortison auf die Radikalbildung bei PMN nach Zymosan-Stimulation, ermittelt im Luminoltest. Aufgelistet sind Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler (MW±SE).

PMN stimuliert mit Zymosan		Radikalbildung				
		Luminol				
Hydrocortison		AUC	max.Peakhöhe	Zeit bei Peak [min]	Steigung [RLU/min]	lag time [min]
<b>Kontrolle</b>	MW	226239,00	3025,00	63,25	98,25	23,25
	± SE	3948,55	32,27	3,04	11,02	1,25
	n	4	4	4	4	4
<b>1 nM</b>	MW	220727,00	2925,00	63,00	85,25	20,00
	± SE	5088,92	43,30	0,71	6,64	0,41
	n	4	4	4	4	4
<b>10 nM</b>	MW	275244,25 ***	3425,00 *	40,50 ***	316,25 ***	17,50 ***
	± SE	13335,56	118,15	2,36	50,39	1,32
	n	4	4	4	4	4
<b>100 nM</b>	MW	293792,25 ***	3662,50 ***	37,00 ***	238,75 *	9,50 ***
	± SE	3086,01	74,65	0,82	15,33	0,50
	n	4	4	4	4	4
<b>1 µM</b>	MW	292183,75 ***	3662,50 ***	39,75 ***	247,50 *	12,25 ***
	± SE	3774,19	37,50	0,48	21,36	0,48
	n	4	4	4	4	4
<b>10 µM</b>	MW	320173,50 ***	4000,00 ***	39,00 ***	336,25 ***	10,25 ***
	± SE	6365,14	91,29	1,00	25,85	0,48
	n	4	4	4	4	4
<b>100 µM</b>	MW	392101,00 ***	4750,00 ***	30,25 ***	416,25 ***	4,50 ***
	± SE	5498,90	95,74	0,75	35,79	0,29
	n	4	4	4	4	4

**Tabelle 17** Einfluss von Cadmium auf die Phagozytose der Zelllinie NR8383. Aufgelistet sind Mittelwerte mit dazugehörigem Standardfehler (MW±SE).

NR8383		Phagozytose		
		mikroskopische Auswertung		fluorimetrisch
CdCl <sub>2</sub>		% Phagozytose	Anzahl Partikel	RFU
<b>Kontrolle</b>	MW	47,90	3,89	4710,50
	± SE	3,51	0,09	400,02
	n	3	3	4
<b>100 nM</b>	MW	43,24	3,57	4718,75
	± SE	5,32	0,45	627,85
	n	3	3	4
<b>1 µM</b>	MW	41,63	3,54	5483,75
	± SE	6,23	0,23	419,96
	n	3	3	4
<b>10 µM</b>	MW	43,88	3,34	8073,25 *
	± SE	10,75	0,29	1251,53
	n	3	3	4
<b>100 µM</b>	MW	9,66 ***	2,42 *	6615,75
	± SE	2,18	0,23	712,86
	n	3	3	4

**Tabelle 18** Einfluss von Cadmium auf die Radikalbildung der Zelllinie NR8383 nach Zymosan-Stimulation. Die Absorptions- und RFU-Werte sowie die quantifizierten Kurven aus dem Luminoltest sind als Mittelwerte mit dazugehörigem Standardfehler (MW±SE) aufgelistet.

NR8383		Radikalbildung						
		NBT-Zymosan		FcOxyburst®		Luminol		
CdCl <sub>2</sub>		Absorption 630	RFU	AUC	max.Peakhöhe	Zeit bei Peak [min]	Steigung [RLU/min]	lag time [min]
<b>Kontrolle</b>	MW	0,94	44590,50	153468,32	7701,32	13,61	1414,00	6,43
	± SE	0,03	303,63	17144,97	828,80	0,27	113,91	0,52
	n	4	4	4	4	4	4	4
<b>100 nM</b>	MW	0,97	43376,25	249840,20 **	12514,34 **	13,35	1734,50	1,25 ***
	± SE	0,07	76,81	25603,82	1169,82	0,31	125,99	0,26
	n	4	4	4	4	4	4	4
<b>1 µM</b>	MW	1,09	44383,25	209662,17	10068,00	14,42	1300,00	2,30 ***
	± SE	0,02	251,39	15540,37	760,75	0,31	127,61	0,38
	n	4	4	4	4	4	4	4
<b>10 µM</b>	MW	0,95	44094,25	97042,36	5215,61	12,81	796,67 *	4,43 *
	± SE	0,03	697,60	7737,44	289,23	0,62	40,55	0,57
	n	4	4	3	3	3	3	3
<b>100 µM</b>	MW	1,17 *	52404,00 ***	81154,45	4798,68	13,88	740,00 **	6,60
	± SE	0,07	465,42	1657,41	149,57	0,00	20,82	0,00
	n	4	4	3	3	3	3	3

**Tabelle 19** Einfluss von Hydrocortison auf die Phagozytose der Zelllinie NR8383. Aufgelistet sind Mittelwerte mit dazugehörigem Standardfehler (MW±SE).

NR8383		Phagozytose		
		mikroskopische Auswertung		fluorimetrisch
Hydrocortison		% Phagozytose	Anzahl Partikel	RFU
<b>Kontrolle</b>	MW	41,92	3,28	7061,00
	± SE	2,85	0,07	725,68
	n	3	3	4
<b>1 nM</b>	MW	44,94	3,35	7632,50
	± SE	2,77	0,11	1790,61
	n	3	3	4
<b>10 nM</b>	MW	44,77	3,21	4851,50
	± SE	6,92	0,09	625,57
	n	3	3	4
<b>100 nM</b>	MW	42,56	2,99	5087,75
	± SE	3,46	0,13	717,82
	n	3	3	4
<b>1 µM</b>	MW	44,24	3,23	2650,00
	± SE	2,02	0,03	1108,51
	n	3	3	4
<b>10 µM</b>	MW	42,53	3,34	2873,50
	± SE	3,41	0,19	450,78
	n	3	3	4
<b>100 µM</b>	MW	40,32	3,43	5610,50
	± SE	3,04	0,12	1891,30
	n	3	3	4

**Tabelle 20** Einfluss von Hydrocortison auf die Radikalbildung der Zelllinie NR8383 nach Zymosan-Stimulation. Die Absorptions- und RFU-Werte sowie die quantifizierten Kurven aus dem Luminoltest sind als Mittelwerte mit dazugehörigem Standardfehler (MW±SE) aufgelistet.

NR8383		Radikalbildung						
		NBT-Zymosan FcOxyburst®			Luminol			
Hydrocortison		Absorption 630	RFU	AUC	max.Peakhöhe	Zeit bei Peak [min]	Steigung [RLU/min]	lag time [min]
<b>Kontrolle</b>	MW	0,80	30644,75	813532,00	32471,33	17,87	3728,93	5,60
	± SE	0,02	386,95	31932,50	977,22	0,00	85,10	0,00
	n	4	4	3	3	3	3	3
<b>1 nM</b>	MW	0,79	30448,25	1271370,00 ***	49709,25 ***	13,11 ***	7244,03 ***	4,50 **
	± SE	0,04	172,28	73010,52	3076,83	0,00	480,60	0,00
	n	4	4	4	4	4	4	4
<b>10 nM</b>	MW	0,86	30962,75	1330340,00 ***	51710,50 ***	14,30 ***	7339,54 ***	5,33
	± SE	0,02	23,22	55443,54	2082,74	0,85	387,31	0,28
	n	4	4	4	4	4	4	4
<b>100 nM</b>	MW	0,79	30438,75	1104317,25 *	42924,75 *	12,81 ***	6201,03 **	5,05
	± SE	0,04	412,28	71011,95	2848,10	0,30	481,65	0,32
	n	4	4	4	4	4	4	4
<b>1 µM</b>	MW	0,85	30698,75	1171407,50 **	46743,75 **	14,00 ***	6524,79 ***	5,60
	± SE	0,02	134,45	37556,35	1466,81	0,30	186,11	0,00
	n	4	4	4	4	4	4	4
<b>10 µM</b>	MW	0,85	30848,50	1084700,00 *	44780,75 *	13,40 ***	6514,03 ***	5,60
	± SE	0,03	243,29	19783,27	1434,56	0,30	242,83	0,00
	n	4	4	4	4	4	4	4
<b>100 µM</b>	MW	0,89	30817,75	1263056,67 ***	52512,00 ***	13,11 ***	7659,36 ***	5,60
	± SE	0,01	418,56	35352,58	1132,14	0,00	212,26	0,00
	n	4	4	3	3	3	3	3

**Tabelle 21** Einfluss von 17 $\beta$ -Östradiol auf die Phagozytose und die Radikalbildung der Zelllinie NR8383. Die Absorptions- und RFU-Werte sowie die quantifizierten Kurven aus dem Luminoltest sind als Mittelwerte mit dazugehörigem Standardfehler (MW $\pm$ SE) aufgelistet.

NR8383		Phagozytose				Radikalbildung			
		fluorimetrisch	NBT-Zymosan	FcOxyburst®		Luminol			
17 $\beta$ -Östradiol		RFU	Absorption 630	RFU	AUC	max.Peakhöhe	Zeit bei Peak [min]	Steigung [RLU/min]	lag time [min]
<b>Kontrolle</b>	MW	7061,00	2,04	15388,75	236300,06	9740,98	16,47	1325,77	5,55
	$\pm$ SE	725,68	0,15	52,36	10496,21	353,39	0,52	35,41	0,13
	n	4	4	4	4	4,00	4	4	4
<b>0,5 ng/ml</b>	MW	1525,25	2,15	15337,75	259055,79	10347,28	16,15	1392,50	5,2
	$\pm$ SE	380,32	0,11	266,11	8877,22	319,38	0,32	10,73	0,14
	n	4	4	4	4	4,00	4	4	4
<b>1 ng/ml</b>	MW	4784,75	2,29	15305,00	284943,80 *	11488,58	17,43	1474,41	5
	$\pm$ SE	284,36	0,10	83,18	6550,83	453,61	0,32	43,51	0,00
	n	4	4	4	4	4,00	4	4	4
<b>5 ng/ml</b>	MW	5885,75	2,11	15351,75	291541,01 **	11558,37	17,75	1464,90	5,35
	$\pm$ SE	2929,69	0,05	89,59	7342,73	409,00	0,00	45,89	0,15
	n	4	4	4	4	4,00	4	4	4
<b>10 ng/ml</b>	MW	4756	2,22	15119,33	301134,78 **	12239,47 **	18,06	1594,31	5,2
	$\pm$ SE	1213,82	0,25	50,09	13239,37	598,97	0,32	101,73	0,14
	n	4	4	3	4	4,00	4	4	4



**Tabelle 22** Einfluss hoher EtOH-Konzentrationen auf die Phagozytose und die Radikalbildung der Zelllinie NR8383. Die RFU- bzw. Absorptionswerte sind als Mittelwerte mit dazugehörigem Standardfehler (MW±SE) aufgelistet.

NR8383		Phagozytose			Radikalbildung	
		fluorimetrisch	NBT-Zymosan	FCOxyburst®	FCOxyburst®	
Ethanol		RFU	Absorption 630	RFU		
<b>Kontrolle</b>	MW	18515,00	1,06	48016,25		
	± SE	802,02	0,02	572,73		
	n	4	4	4		
<b>10<sup>-1</sup> ‰</b>	MW	18594,25	1,03	47890,75		
	± SE	394,18	0,05	421,60		
	n	4	4	4		
<b>1 ‰</b>	MW	18807,75	1,15	48126,00		
	± SE	149,87	0,03	365,87		
	n	4	4	4		
<b>1%</b>	MW	15350,00 ***	0,66 ***	49903,50 *		
	± SE	488,29	0,02	394,03 (zu		
	n	4	4	4	0,1 ‰)	

**Tabelle 23** Einfluss von Cyclosporin A auf die Phagozytose der Zelllinie NR8383. Aufgelistet sind Mittelwerte mit dazugehörigem Standardfehler (MW±SE).

NR8383		Phagozytose		
		mikroskopische Auswertung		fluorimetrisch
Cyclosporin A		% Phagozytose	Anzahl Partikel	RFU
<b>Kontrolle</b>	MW	47,68	3,02	10257,00
	± SE	7,06	0,05	225,16
	n	3	3	4
<b>100ng/ml</b>	MW	41,99	3,04	11537,25
	± SE	2,98	0,13	357,73
	n	3	3	4
<b>250ng/ml</b>	MW	40,54	2,95	11831,50
	± SE	3,77	0,10	485,24
	n	3	3	4
<b>500ng/ml</b>	MW	42,45	3,00	10999,75
	± SE	0,96	0,09	59,57
	n	3	3	4
<b>1µg/ml</b>	MW	44,79	3,37	16004,50 ***
	± SE	7,72	0,25	1179,55
	n	3	3	4

**Tabelle 24** Einfluss von Cyclosporin A auf die Radikalbildung der Zelllinie NR8383 nach Zymosan-Stimulation. Die Absorptions- und RFU-Werte sowie die quantifizierten Kurven aus dem Luminoltest sind als Mittelwerte mit dazugehörigem Standardfehler (MW±SE) aufgelistet.

NR8383		Radikalbildung						
		NBT-Zymosan		FcOxyburst®	Luminol			
Cyclosporin A		Absorption 630	RFU	AUC	max.Peakhöhe	Zeit bei Peak [min]	Steigung [RLU/min]	lag time [min]
<b>Kontrolle</b>	MW	1,02	37104,00	162188,93	9644,77	14,28	1525,00	5,40
	± SE	0,04	184,32	7568,27	373,87	0,28	59,51	0,23
	n	4	4	4	4	4	4	4
<b>100ng/ml</b>	MW	1,08	36886,00	144677,76	8620,55	13,54	1395,00	5,00
	± SE	0,04	434,07	16108,27	952,70	0,25	147,56	0,33
	n	4	4	4	4	4	4	4
<b>250ng/ml</b>	MW	1,01	37358,25	143376,53	8622,23	14,53	1350,00	5,80
	± SE	0,04	266,71	7492,96	368,86	0,25	45,64	0,00
	n	4	4	4	4	4	4	4
<b>500ng/ml</b>	MW	1,03	37407,50	121141,24	7461,91	12,80 *	1262,50	5,20
	± SE	0,04	315,69	7611,70	356,33	0,40	57,50	0,20
	n	4	4	4	4	4	4	4
<b>1µg/ml</b>	MW	0,95	37733,00	120643,09	7306,50 *	13,29	1201,25	5,80
	± SE	0,02	265,52	7134,05	342,04	0,28	40,74	0,00
	n	4	4	4	4	4	4	4

**Tabelle 25** Einfluss des vergorenen *Echinacea*-Extrakts auf die Phagozytose und die Radikalbildung der Zelllinie NR8383. Die Zugabe erfolgte unmittelbar vor den Tests. Absorptions- und RFU-Werte sowie die quantifizierten Kurven aus dem Luminoltest sind als Mittelwerte mit dazugehörigem Standardfehler (MW±SE) aufgelistet.

NR8383 Echinacea in milchsäure- vergorener Lösung		Phagozytose			Radikalbildung					
		fluorimetrisch	NBT-Zymosan	FcOxyburst®	Luminol					
		RFU	Absorption 630	RFU	AUC	max.Peakhöhe	Zeit bei Peak [min]	Steigung [RLU/min]	lag time [min]	
<b>Kontrolle</b>	MW	4710,50	1,68	37166,50	192825,61	9196,26	18,21	1190,56	4,60	
	± SE	400,02	0,04	281,91	14371,02	750,36	0,59	111,96	0,23	
	n	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-8</sup> Echinacea</b>	MW	5076,25	1,79	37091,25	267809,35 **	12317,38 **	18,79	1494,42 *	4,20	
	± SE	412,95	0,10	119,98	7658,03	274,39	0,00	35,63	0,00	
	n	4	4	4	3	3	3	3	3	3
<b>10<sup>-7</sup> Echinacea</b>	MW	5428,25	1,69	36857,00	245824,33	11663,27 *	18,50	1475,98 *	4,20	
	± SE	797,75	0,03	218,86	13578,23	423,78	0,74	65,16	0,00	
	n	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-6</sup> Echinacea</b>	MW	6529,25	1,64	37252,25	251734,25 *	11683,83 *	17,91	1477,78 *	3,75 *	
	± SE	481,45	0,08	188,62	15139,69	673,52	0,56	62,67	0,26	
	n	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-5</sup> Echinacea</b>	MW	8113,00	1,48	36977,75	239139,75	11136,59	18,50	1393,42	4,20	
	± SE	1608,05	0,03	105,62	14146,52	291,19	0,74	34,19	0,00	
	n	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-4</sup> Echinacea</b>	MW	4611,00 * zu	1,46	** zu	35120,25 ***	148254,57 ***	6642,06 *	17,91	828,77 **	3,98
	± SE	80,79 10 <sup>-5</sup> E	0,01	10 <sup>-8</sup> E	211,65	6007,29	ausser 153,27	0,56	11,41	0,22
	n	4	4	4	4	4	Kontr. 4	4	4	4
<b>10<sup>-3</sup> Echinacea</b>	MW	5276,25	1,48	* zu	43323,25 ***	44603,95 ***	1492,82 ***	20,85	* zu	145,38 ***
	± SE	299,23	0,05	10 <sup>-8</sup> E	165,49	2660,14	79,88	0,56	10 <sup>-4</sup> E	4,16
	n	4	4	4	4	4	4	4	und 10 <sup>-6</sup> E	4

**Tabelle 26** Einfluss des alkoholischen *Echinacea*-Extrakts auf die Phagozytose und die Radikalbildung der Zelllinie NR8383. Die Zugabe erfolgte unmittelbar vor den Tests. Absorptions- und RFU-Werte sowie die quantifizierten Kurven aus dem Luminoltest sind als Mittelwerte mit dazugehörigem Standardfehler (MW±SE) aufgelistet.

NR8383 Echinacea		Phagozytose				Radikalbildung			
		fluorimetrisch	NBT-Zymosan	FcOxyburst®		Luminol			
in alkoholischer Lösung		RFU	Absorption 630	RFU	AUC	max.Peakhöhe	Zeit bei Peak [min]	Steigung [RLU/min]	lag time [min]
<b>Kontrolle</b>	MW	2359,50	0,97	39054,50	101429,70	5162,87	16,56	813,46	6,28
	± SE	838,65	0,02	312,45	5599,84	200,02	0,78	40,08	0,32
	n	4	4	4	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-8</sup> Echinacea</b>	MW	4093,25	1,04	38178,25	127531,68 *	6162,37 **	17,45	899,84	6,60
	± SE	880,70	0,02	507,27	6066,89	213,60	0,45	14,11	0,00
	n	4	4	4	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-7</sup> Echinacea</b>	MW	2558,50	1,01	38394,25	141868,30 ***	6726,21 ***	17,90	1012,40	6,28
	± SE	751,69	0,02	228,68	7082,96	333,64	0,37	35,77	0,32
	n	4	4	4	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-6</sup> Echinacea</b>	MW	3922,25	0,94	38261,25	137557,04 ***	6411,00 ***	18,35	895,03	5,95
	± SE	539,12	0,03	459,01	4335,54	168,81	0,45	11,65	0,38
	n	4	4	4	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-5</sup> Echinacea</b>	MW	2835,00	0,91	39076,00	133781,20 **	6177,87 **	18,12	870,16	5,63
	± SE	507,13	0,02	457,27	3947,98	82,25	0,43	28,77	0,33
	n	4	4	4	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-4</sup> Echinacea</b>	MW	2298,00	0,90	40894,50 ***	78484,46	3360,26 ***	19,02	385,69 ***	6,60
	± SE	500,91	0,01	372,58	3170,84	98,85	0,67	5,12	0,00
	n	4	4	4	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-3</sup> Echinacea</b>	MW	10220,50 ***	1,02	47503,25 ***	27614,67 ***	988,86 ***	23,04 ***	85,06 ***	8,23
	± SE	1954,79	0,10	732,83	1521,76	52,20	0,56	5,58	0,32
	n	4	4	4	4	4	4	4	4

**Tabelle 27** Einfluss von Ethanol (entsprechend dem Restalkohol des *Echinacea*-Extrakts) auf die Phagozytose und die Radikalbildung der Zelllinie NR8383. Die Zugabe erfolgte unmittelbar vor den Tests. Absorptions- und RFU-Werte sowie die quantifizierten Kurven aus dem Luminoltest sind als Mittelwerte mit dazugehörigem Standardfehler (MW±SE) aufgelistet.

NR8383		Phagozytose				Radikalbildung				
		fluorimetrisch		NBT-Zymosan	FcOxyburst®	Luminol				
Echinacea	Ethanol-Kontrollen	RFU	Absorption 630	RFU	AUC	max.Peakhöhe	Zeit bei Peak [min]	Steigung [RLU/min]	lag time [min]	
<b>Kontrolle</b>	MW	2359,50	0,97	39054,50	101429,70	5162,87	16,56	813,46	6,28	
	± SE	838,65	0,02	312,45	5599,84	200,02	0,78	40,08	0,32	
	n	4	4	4	4	4	4	4	4	
<b>2 x 10<sup>-6</sup> ‰</b>	MW	4772,25	1,06	37352,75	133118,19 **	6453,89 ***	16,78	921,19	5,95	
	± SE	758,11	0,03	377,60	2831,41	73,78	0,56	42,70	0,38	
	n	4	4	4	4	4	4	4	4	
<b>2 x 10<sup>-5</sup> ‰</b>	MW	3955,00	0,95	37642,75	139838,59 ***	6738,14 ***	17,00	1127,55 **	5,95	
	± SE	1107,70	0,04	205,80	5914,37	115,02	0,63	140,69	0,38	
	n	4	4	4	4	4	4	4	4	
<b>2 x 10<sup>-4</sup> ‰</b>	MW	3020,25	0,91	37107,25	141530,41 ***	6519,94 ***	17,45	879,59	5,95	
	± SE	494,40	0,01	563,03	3926,47	109,99	0,45	20,46	0,38	
	n	4	4	4	4	4	4	4	4	
<b>2 x 10<sup>-3</sup> ‰</b>	MW	3415,25	0,95	38126,75	144740,21 ***	6828,77 ***	17,00	1019,86	4,98	
	± SE	483,24	0,03	475,05	5851,00	167,52	0,63	18,55	0,33	
	n	4	4	4	4	4	4	4	4	
<b>2 x 10<sup>-2</sup> ‰</b>	MW	4317,25	0,93	38202,25	142443,14 ***	6490,17 ***	17,23	885,52	5,30	
	± SE	707,66	0,04	521,49	5163,48	121,01	0,67	41,55	0,53	
	n	4	4	4	4	4	4	4	4	
<b>2 x 10<sup>-1</sup> ‰</b>	MW	2963,00	0,90	38453,50	124036,95	5974,10	15,66	954,88	5,30	
	± SE	1063,75	0,01	562,17	3901,73	180,58	0,26	71,80	0,00	
	n	4	4	4	4	4	4	4	4	

**Tabelle 28** Einfluss des vergorenen *Echinacea*-Extrakts auf die Radikalbildung der Zelllinie NR8383. Die Zellen wurden für 2 Tage mit Zusatz des Extrakts kultiviert. Die quantifizierten Kurven aus dem Luminoltest sind als Mittelwerte mit dazugehörigem Standardfehler (MW±SE) aufgelistet.

NR8383 Echinacea in milchsäure- vergorener Lösung 2 Tage		Radikalbildung				
		AUC	max.Peakhöhe	Luminol Zeit bei Peak [min]	Steigung [RLU/min]	lag time [min]
<b>Kontrolle</b>	MW	345099,79	8678,03	21,90	823,47	5,38
	± SE	11337,05	239,67	0,69	25,01	0,19
	n	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-8</sup> Echinacea</b>	MW	443343,50	10351,35	25,27	842,88	6,32
	± SE	23526,80	929,12	0,97	30,55	0,42
	n	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-7</sup> Echinacea</b>	MW	445688,22	10249,77	24,01	920,77	6,38
	± SE	22077,54	962,23	0,81	106,05	0,45
	n	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-6</sup> Echinacea</b>	MW	540704,41 ***	276844,17 *	25,27	1079,46	6,32
	± SE	43597,72	1469,61	0,97	107,29	0,42
	n	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-5</sup> Echinacea</b>	MW	516474,03 **	12635,35	26,39 *	1015,27	6,74
	± SE	10550,33	434,88	0,56	48,59	0,00
	n	3	3	3	3	3
<b>10<sup>-4</sup> Echinacea</b>	MW	382248,01 ** zu 10 <sup>-6</sup>	8424,26 * zu 10 <sup>-5</sup>	21,90 * zu 10 <sup>-5</sup>	791,36	5,05
	± SE	13600,60 * zu 10 <sup>-5</sup>	725,18 und 10 <sup>-6</sup>	0,69	80,31	0,00
	n	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-3</sup> Echinacea</b>	MW	205802,13 **	3905,98 **	21,48 * zu 10 <sup>-5</sup>	364,53 **	5,90
	± SE	6259,50	189,01	0,81 10 <sup>-6</sup> , 10 <sup>-8</sup>	43,08 *** zu 10 <sup>-5</sup>	0,49
	n	4	4	4	4 10 <sup>-6</sup> , 10 <sup>-7</sup>	4

**Tabelle 29** Einfluss des vergorenen *Echinacea*-Extrakts auf die Radikalbildung der Zelllinie NR8383. Die Zellen wurden für 5 Tage mit Zusatz des Extrakts kultiviert. Die quantifizierten Kurven aus dem Luminoltest sind als Mittelwerte mit dazugehörigem Standardfehler (MW±SE) aufgelistet.

NR8383 Echinacea in milchsäure- vergorener Lösung 5 Tage		Radikalbildung				
		Luminol				
		AUC	max.Peakhöhe	Zeit bei Peak [min]	Steigung [RLU/min]	lag time [min]
<b>Kontrolle</b>	MW	520054,40	8694,74	50,59	nd	7,53
	± SE	74190,93	1347,32	11,85	nd	0,83
	n	3	3	3		3
<b>10<sup>-8</sup> Echinacea</b>	MW	1958156,67 ***	35144,70 ***	48,38	nd	6,43
	± SE	246628,07	4295,92	10,72	nd	1,02
	n	3	3	3		3
<b>10<sup>-7</sup> Echinacea</b>	MW	1433923,33 ***	25831,11 ***	44,97	nd	8,10
	± SE	51953,24	923,23	2,97	nd	0,30
	n	3	3	3		3
<b>10<sup>-6</sup> Echinacea</b>	MW	908042,49 ***zu 10 <sup>-8</sup>	15349,50 ***zu 10 <sup>-8</sup>	64,08	nd	8,63
	± SE	64097,19	1163,20	8,76	nd	0,57
	n	3	3	3		3
<b>10<sup>-5</sup> Echinacea</b>	MW	720464,60 ***zu 10 <sup>-8</sup>	12367,27 ***zu 10 <sup>-8</sup>	44,97	nd	7,53
	± SE	13057,06	587,02	7,18	nd	0,83
	n	3	3	3		3
<b>10<sup>-4</sup> Echinacea</b>	MW	645452,24 ***zu 10 <sup>-8</sup>	10950,73 ***zu 10 <sup>-7</sup>	37,66	nd	6,43
	± SE	9623,67	593,15 und 10 <sup>-8</sup>	0,56	nd	0,53
	n	3	3	3		3
<b>10<sup>-3</sup> Echinacea</b>	MW	201611,05 ***zu 10 <sup>-7</sup>	3120,98 ***zu 10 <sup>-7</sup>	42,87	nd	11,43
	± SE	5157,58 und 10 <sup>-8</sup>	108,02 und 10 <sup>-8</sup>	0,71	nd	0,27
	n	3	3	3		3

**Tabelle 30** Einfluss des alkoholischen *Echinacea*-Extrakts auf die Radikalbildung der Zelllinie NR8383. Die Zellen wurden für 2 Tage mit Zusatz des Extrakts kultiviert. Die quantifizierten Kurven aus dem Luminoltest sind als Mittelwerte mit dazugehörigem Standardfehler (MW±SE) aufgelistet.

NR8383 Echinacea in alkoholischer Lösung 2 Tage		Radikalbildung				
		Luminol				
		AUC	max.Peakhöhe	Zeit bei Peak [min]	Steigung [RLU/min]	lag time [min]
<b>Kontrolle</b>	MW	192771,87	4343,97	24,01	362,85	6,74
	± SE	6153,40	229,29	0,42	20,73	0,00
	n	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-8</sup> Echinacea</b>	MW	431833,18 ***	11164,63 ***	24,01	1037,13 ***	7,31
	± SE	29452,51	1137,33	0,81	88,94	0,24
	n	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-7</sup> Echinacea</b>	MW	336558,93 ***	9160,51 ***	24,43	802,17 ***	7,45
	± SE	19830,78	659,87	0,49	36,75	0,03
	n	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-6</sup> Echinacea</b>	MW	281594,35 *	7066,26 ** zu	24,01	597,56 *	6,87
	± SE	19865,18	556,87 10 <sup>-8</sup> E	0,81	33,37	0,08
	n	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-5</sup> Echinacea</b>	MW	306318,99 **	7725,71 *	24,85	625,44 *	6,74
	± SE	17753,21	621,27	1,06	22,99	0,00
	n	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-4</sup> Echinacea</b>	MW	213769,86 *** zu	4737,63 *** zu	24,01	443,23 ** zu	8,00
	± SE	16774,55 10 <sup>-8</sup> E	373,80 10 <sup>-7</sup> , 10 <sup>-8</sup>	2,70	51,62 10 <sup>-7</sup> und	2,42
	n	4 **zu 10 <sup>-7</sup> , *zu 10 <sup>-5</sup>	4 *zu 10 <sup>-5</sup>	4	4 10 <sup>-8</sup> E	4
<b>10<sup>-3</sup> Echinacea</b>	MW	166564,02 *** zu 10 <sup>-5</sup> ,	3617,15 *** zu	23,17	291,58 *** zu	6,74
	± SE	10030,58 10 <sup>-7</sup> , 10 <sup>-8</sup>	252,64 10 <sup>-7</sup> , 10 <sup>-8</sup>	0,42	37,73 10 <sup>-5</sup> , 10 <sup>-7</sup> , 10 <sup>-8</sup>	0,00
	n	4 *zu 10 <sup>-6</sup>	4 **zu 10 <sup>-5</sup> , *zu 10 <sup>-6</sup>	4	4 **zu 10 <sup>-6</sup>	4



**Tabelle 31** Einfluss des alkoholischen *Echinacea*-Extrakts auf die Radikalbildung der Zelllinie NR8383. Die Zellen wurden für 5 Tage mit Zusatz des Extrakts kultiviert. Die quantifizierten Kurven aus dem Luminoltest sind als Mittelwerte mit dazugehörigem Standardfehler (MW±SE) aufgelistet.

NR8383 Echinacea in alkoholischer Lösung 5 Tage		Radikalbildung				
		Luminol				
		AUC	max.Peakhöhe	Zeit bei Peak [min]	Steigung [RLU/min]	lag time [min]
<b>Kontrolle</b>	MW	324638,02	4693,92	32,89	305,84	6,93
	± SE	16737,33	189,29	1,29	13,23	0,44
	n	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-8</sup> Echinacea</b>	MW	914426,86 ***	14995,99 ***	30,89	1220,92 ***	9,53
	± SE	21756,77	435,23	0,58	37,30	0,52
	n	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-7</sup> Echinacea</b>	MW	943057,70 ***	15247,25 ***	32,39	1064,46 ***	7,88
	± SE	9296,12	360,36	1,25	97,51	0,77
	n	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-6</sup> Echinacea</b>	MW	903984,10 ***	15401,36 ***	31,39	1063,92 ***	7,32
	± SE	42522,82	1196,10	1,70	152,90	1,34
	n	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-5</sup> Echinacea</b>	MW	947234,31 ***	17299,69 ***	29,65	1165,35 ***	7,17
	± SE	48845,26	1130,75	0,85	80,35	0,42
	n	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-4</sup> Echinacea</b>	MW	710572,80 ***	12123,17 ***	29,40	859,59 **	6,48
	± SE	23996,16	580,58	1,70	73,00	0,50
	n	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-3</sup> Echinacea</b>	MW	563977,84 ***	8211,22 *	32,39	627,59 ***zu	9,97 ***zu
	± SE	27691,72	410,48	0,95	41,55 10 <sup>-3</sup> E	0,00 10 <sup>-4</sup> E
	n	4	4	4	4 **zu 10 <sup>-5</sup> , *zu Rest	4

**Tabelle 32** Einfluss von Ethanol (entsprechend dem Restalkohol des *Echinacea*-Extrakts) auf die Radikalbildung der Zelllinie NR8383. Die Zellen wurden für 2 Tage mit Zusatz von EtOH kultiviert. Die quantifizierten Kurven aus dem Luminoltest sind als Mittelwerte mit dazugehörigem Standardfehler (MW±SE) aufgelistet.

NR8383		Radikalbildung				
		Luminol				
Ethanol 2 Tage		AUC	max.Peakhöhe	Zeit bei Peak [min]	Steigung [RLU/min]	lag time [min]
<b>Kontrolle</b>	MW	206216,62	5457,67	22,74	476,13	5,84
	± SE	9507,03	427,42	0,49	40,59	0,26
	n	4	4	4	4	4
<b>2 x 10<sup>-6</sup> ‰</b>	MW	521098,40 ***	12920,88 ***	25,69	979,43 ***	5,90
	± SE	22139,60	720,13	0,81	24,53	0,49
	n	4	4	4	4	4
<b>2 x 10<sup>-5</sup> ‰</b>	MW	433359,50 ***	11355,66 ***	24,85	929,47 ***	6,21
	± SE	22735,02	1017,28	1,26	57,76	0,50
	n	4	4	4	4	4
<b>2 x 10<sup>-4</sup> ‰</b>	MW	585699,43 ***	14617,40 ***	25,27	1145,51 ***	4,81
	± SE	29378,32	982,81	1,19	37,12	0,44
	n	4	4	4	4	4
<b>2 x 10<sup>-3</sup> ‰</b>	MW	408833,88 ***	10643,68 ***	24,01	863,43 ***	5,66
	± SE	20252,90	817,89	0,81	41,78	0,21
	n	4	4	4	4	4
<b>2 x 10<sup>-2</sup> ‰</b>	MW	332796,79 **	8167,70 *** zu 10 <sup>-6</sup> E	22,32	687,15 **	4,68
	± SE	13565,96	267,44 ** zu 10 <sup>-8</sup>	1,06	7,43	0,25
	n	4	4	4	4	4
<b>2 x 10<sup>-1</sup> ‰</b>	MW	313727,03 *	8058,69 *** zu 10 <sup>-6</sup> E	22,74	682,66 **	5,05
	± SE	16180,02	560,87 ** zu 10 <sup>-8</sup>	1,09	20,47	0,00
	n	4	4	4	4	4

**Tabelle 33** Einfluss von Ethanol (entsprechend dem Restalkohol des *Echinacea*-Extrakts) auf die Radikalbildung der Zelllinie NR8383. Die Zellen wurden für 5 Tage mit Zusatz von EtOH kultiviert Die quantifizierten Kurven aus dem Luminoltest sind als Mittelwerte mit dazugehörigem Standardfehler (MW±SE) aufgelistet.

Ethanol 5 Tage		Radikalbildung				
		Luminol				
		AUC	max.Peakhöhe	Zeit bei Peak [min]	Steigung [RLU/min]	lag time [min]
<b>Kontrolle</b>	MW	344690,31	5777,75	32,67	360,41	8,91
	± SE	22792,08	394,54	1,51	42,84	0,67
	n	4	4	4	4	4
<b>2 x 10<sup>-6</sup> ‰</b>	MW	559234,12 ***	9379,94 ***	30,66	734,60 ***	9,20
	± SE	35197,24	643,82	0,50	62,65	0,42
	n	4	4	4	4	4
<b>2 x 10<sup>-5</sup> ‰</b>	MW	191919,36 **	2890,88 **	49,25 **	158,60 **	19,47 ***
	± SE	23147,91	392,45	1,74	27,04	0,62
	n	4	4	4	4	4
<b>2 x 10<sup>-4</sup> ‰</b>	MW	345049,83 ***zu	5047,86 ***zu	39,70 **	296,98 ***zu	11,18 ***zu
	± SE	10859,64 10 <sup>-8</sup> E	180,60 10 <sup>-8</sup> E	0,50	10,05 10 <sup>-8</sup> E	0,58 10 <sup>-7</sup> E
	n	4 **zu 10 <sup>-7</sup>	4 *zu 10 <sup>-7</sup>	4	4	4
<b>2 x 10<sup>-3</sup> ‰</b>	MW	421108,00 ***zu	6737,95 ***zu	32,67 ***zu	485,06 ***zu	10,06 ***zu
	± SE	14143,85 10 <sup>-7</sup> E	378,49 10 <sup>-7</sup> E	0,50 10 <sup>-7</sup> E	37,09 10 <sup>-7</sup> , 10 <sup>-8</sup>	0,41 10 <sup>-7</sup> E
	n	4 *zu 10 <sup>-8</sup>	4 **zu 10 <sup>-8</sup>	4 **zu 10 <sup>-6</sup>	4 **zu 10 <sup>-6</sup>	4
<b>2 x 10<sup>-2</sup> ‰</b>	MW	428527,78 ***zu	6502,32 ***zu	35,68 ***zu	398,32 ***zu	9,79 ***zu
	± SE	25109,73 10 <sup>-7</sup> E	332,54 10 <sup>-7</sup> E	1,26 10 <sup>-7</sup> E	10,54 10 <sup>-8</sup> E	0,26 10 <sup>-7</sup> E
	n	4 *zu 10 <sup>-8</sup>	4 **zu 10 <sup>-8</sup>	4	4 **zu 10 <sup>-7</sup>	4
<b>2 x 10<sup>-1</sup> ‰</b>	MW	637790,66 ***	10730,93 ***	30,66 ***zu	682,11 ***	6,42 *
	± SE	38508,86	619,81	0,96 10 <sup>-6</sup> , 10 <sup>-7</sup>	11,79	0,56
	n	4	4	4	4	4

**Tabelle 34** Einfluss des Pflanzenextrakts auf die Phagozytose und die Radikalbildung der Zelllinie NR8383. Die Absorptions- und RFU-Werte sowie die quantifizierten Kurven aus dem Luminoltest sind als Mittelwerte mit dazugehörigem Standardfehler (MW±SE) aufgelistet.

NR8383		Phagozytose			Radikalbildung				
		fluorimetrisch	NBT-Zymosan	FcOxyburst®	Luminol				
Feuchtgewicht		RFU	Absorption 630	RFU	AUC	max.Peakhöhe	Zeit bei Peak [min]	Steigung [RLU/min]	lag time [min]
Pflanzenextrakt		RFU	Absorption 630	RFU	AUC	max.Peakhöhe	Zeit bei Peak [min]	Steigung [RLU/min]	lag time [min]
<b>Kontrolle</b>	MW	18515,00	1,06	48016,25	761972,89	27103,98	15,00	4147,77	2,65
	± SE	802,02	0,02	572,73	20518,49	775,07	0,00	125,52	0,78
	n	4	4	4	4	4	4	4	4
<b>330 ng/ml</b>	MW	17160,50	1,11	48430,75	973040,90 ***	35748,87 ***	13,93 *	6077,23 ***	4,00
	± SE	367,32	0,04	547,96	20258,03	993,04	0,00	272,40	0,00
	n	4	4	4	4	4	4	4	4
<b>3,3 µg/ml</b>	MW	18303,50	1,12	49831,50	983120,08 ***	36372,99 ***	13,93 *	6299,29 ***	3,65
	± SE	348,64	0,02	211,12	23543,74	798,08	0,00	119,99	0,35
	n	4	4	4	4	4	4	4	4
<b>33 µg/ml</b>	MW	16994,00	1,15	50638,00 **	855108,81 *	30584,65 *	14,73	4997,71 **	2,63
	± SE	49,85	0,02	406,14	11482,48	301,05	0,27	85,07	0,55
	n	4	4	4	4	4	4	4	4

**Tabelle 35** Einfluss von Ethanol (entsprechend dem Restalkohol des Pflanzenextrakts) auf die Radikalbildung der Zelllinie NR8383. Die quantifizierten Kurven aus dem Luminoltest sind als Mittelwerte mit dazugehörigem Standardfehler (MW±SE) aufgelistet.

NR8383 Pflanzenextrakt		Radikalbildung				
		Luminol				
EtOH-Kontrollen		AUC	max.Peakhöhe	Zeit bei Peak [min]	Steigung [RLU/min]	lag time [min]
<b>Kontrolle</b>	MW	761972,89	27103,98	15,00	4147,77	2,65
	± SE	20518,49	775,07	0,00	125,52	0,78
	n	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-3</sup> ‰</b>	MW	801287,10	30104,91	14,46	4941,18 *	5,30 **
	± SE	12963,34	250,88	0,31	69,95	0,00
	n	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-2</sup> ‰</b>	MW	893485,55 ***	33223,65 ***	14,73	5295,64 ***	4,98 **
	± SE	25780,82	845,02	0,27	125,28	0,33
	n	4	4	4	4	4
<b>10<sup>-1</sup> ‰</b>	MW	927406,57 ***	34421,73 ***	14,19	5800,95 ***	4,00
	± SE	8307,56	296,82	0,27	88,01	0,00
	n	4	4	4	4	4

**Tabelle 36** Einfluss von Hydrocortison auf die Radikalbildung der Zelllinie BV-2, ermittelt über NBT-Zymosan. Die Absorptionswerte sind als Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler (MW±SE) aufgelistet.

BV-2		Radikalbildung	
Hydrocortison		NBT-Zymosan	
Kontrolle		Absorption 630	
	MW	2,18	
	± SE	0,06	
	n	4	
<b>10 nM</b>	MW	1,75 ***	
	± SE	0,02	
	n	4	
<b>1 µM</b>	MW	1,57 ***	
	± SE	0,53	
	n	4	
<b>100 µM</b>	MW	1,70 ***	
	± SE	0,03	
	n	4	

**Tabelle 37** Einfluss von 17 $\beta$ -Östradiol auf die Radikalbildung der Zelllinie BV-2, ermittelt über NBT-Zymosan. Die Absorptionswerte sind als Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler (MW $\pm$ SE) aufgelistet.

<b>BV-2</b>		<b>Radikalbildung</b>	
		NBT-Zymosan	
<b>17<math>\beta</math>-Östradiol</b>		Absorption 630	
<b>Kontrolle</b>	MW	1,87	
	$\pm$ SE	0,17	
	n	4	
<b>1 ng/ml</b>	MW	1,71	
	$\pm$ SE	0,03	
	n	4	
<b>5 ng/ml</b>	MW	1,70	*
	$\pm$ SE	0,37	
	n	4	
<b>10 ng/ml</b>	MW	1,29	**
	$\pm$ SE	0,02	
	n	4	

**Tabelle 38** Einfluss des Pflanzenextrakts auf die Phagozytose und die Radikalbildung der Zelllinie BV-2. Alle Werte sind als Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler (MW $\pm$ SE) aufgelistet.

<b>BV-2</b>		<b>Phagozytose</b>		<b>Radikalbildung</b>	
		mikroskopische Auswertung		NBT-Zymosan	FcOxyburst®
<b>Feuchtgewicht Pflanzenextrakt</b>		% Phagozytose	Anzahl Partikel	Absorption 630	RFU
<b>Kontrolle</b>	MW	17,93	4,47	1,55	10243,33
	$\pm$ SE	0,43	0,21	0,09	53,20
	n	4	4	4	4
<b>330 ng/ml</b>	MW	25,98	5,15	1,13	10045,67
	$\pm$ SE	6,42	0,22	0,02	1503,82
	n	4	4	4	4
<b>3,3 <math>\mu</math>g/ml</b>	MW	28,32	5,48	1,07	9423,67
	$\pm$ SE	5,67	0,15	0,04	394,68
	n	4	4	4	4
<b>33 <math>\mu</math>g/ml</b>	MW	21,72	4,53	1,17	8733,33
	$\pm$ SE	7,38	0,47	0,06	317,52
	n	4	4	4	4

**Tabelle 39** Einfluss von Ethanol (entsprechend dem Restalkohol des Pflanzenextrakts) auf die Phagozytose und die Radikalbildung der Zelllinie BV-2. Alle Werte sind als Mittelwerte mit zu gehörigem Standardfehler (MW±SE) aufgelistet.

BV-2 Pflanzenextrakt		Phagozytose		Radikalbildung
		mikroskopische Auswertung		NBT-Zxmosan
EtOH-Kontrollen		% Phagozytose	Anzahl Partikel	Absorption 630
<b>Kontrolle</b>	MW	17,93	4,47	2,28
	± SE	0,43	0,21	0,15
	n	4	4	4
<b>10<sup>-3</sup> ‰</b>	MW	25,16	4,81	1,95
	± SE	3,24	0,13	0,13
	n	4	4	4
<b>10<sup>-2</sup> ‰</b>	MW	20,77	5,80	2,08
	± SE	5,04	0,09	0,10
	n	4	4	4
<b>10<sup>-1</sup> ‰</b>	MW	22,96	5,12	2,13
	± SE	2,36	0,21	0,08
	n	4	4	4

**Tabelle 40** Einfluss von Klinorotation auf die Phagozytose und die Radikalbildung der Zelllinie NR8383. Aufgelistet sind normalisierte Ergebnisse der Phagozytoserate (RFU) sowie der Radikalbildung (Absorption bei 630 nm) bei Phagozytose-vermitteltem sowie bei stressbedingtem *oxidative burst*. Alle Werte sind als Mittelwerte mit zu gehörigem Standardfehler (MW±SE) aufgelistet.

NR8383		Phagozytose		Radikalbildung	
		fluorimetrisch	NBT-Zymosan	NBT-PBS	NBT-PBS
Klinorotation		RFU	Absorption 630	Absorption 630	Absorption 630
<b>Kontrolle</b>	MW†	1,00	0,99	1,00	
	± SE	0,07	0,01	0,07	
	n	20	36	17	
<b>30 min</b>	MW	0,18 *	1,21	1,12	
	± SE	0,21	0,28	0,34	
	n	4	6	4	
<b>60 min</b>	MW	0,51	0,40 ***	1,94 ***	
	± SE	0,20	0,06	0,04	
	n	4	8	4	
<b>180 min</b>	MW	1,00	0,70 **	1,11	
	± SE	0,30	0,05	0,04	
	n	4	4	4	
<b>60 min Methylzellulose</b>	MW	0,58	0,74 **	nd	
	± SE	0,12	0,04		
	n	4	4		
<b>60 min Cadmium (10 µM)</b>	MW	8,88	0,82 *	1,42 *	
	± SE	6,74	0,01	0,14	
	n	4	5	4	
<b>60 min Hydrocortison (100 µM)</b>	MW	0,53	0,84	1,27	
	± SE	0,15	0,04	0,58	
	n	4	6	3	
<b>60 min kryokonservierte Zellen</b>	MW	0,68	0,65 **	nd	
	± SE	0,12	0,05		
	n	4	4		

† Die Mittelwerte sind bereits normalisiert.

Die Mittelwerte zweier 1g Kontrollen aller Einzelerperimente wurden dafür jeweils gleich 1 gesetzt.



**Tabelle 41** Einfluss von 90minütiger magnetischer Levitation auf die Phagozytose und die Radikalbildung der Zelllinie NR8383. Aufgelistet sind normalisierte Ergebnisse der Phagozytoserate (in % phagozytischer Zellen und die Anzahl aufgenommener Zymosanpartikel) sowie der Radikalbildung (Absorption bei 630 nm) bei Phagozytose-vermitteltem und bei stressbedingtem *oxidative burst*. Alle Werte sind als Mittelwerte mit zu gehörigem Standardfehler (MW±SE) aufgelistet.

NR8383		Phagozytose		Radikalbildung	
		mikroskopische Auswertung		NBT-Zymosan	NBT-PBS
Magnetische Levitation		% Phagozytose	Anzahl Partikel	Absorption 630	Absorption 630
<b>1g Kontrolle</b>	MW	46,17	4,18	1,00	1,00
	± SE	8,84	0,30	0,01	0,06
	n	5	5	6	9
<b>0g Magnet</b>	MW	51,97	3,95	0,96	1,14
	± SE	7,93	0,20	0,03	0,07
	n	5	5	6	4
<b>1g Magnet</b>	MW	47,36	4,14	0,91	1,02
	± SE	7,71	0,30	0,02	0,10
	n	5	5	6	4
<b>2g Magnet</b>	MW	50,54	3,81	0,93	0,95
	± SE	9,64	0,23	0,02	0,07
	n	5	5	5	4

† Die Mittelwerte sind bereits normalisiert.

Die Mittelwerte zweier 1g Kontrollen aller Einzelexperimente wurden dafür jeweils gleich 1 gesetzt.

**Tabelle 42** Einfluss von 90minütiger magnetischer Levitation auf die Phagozytose und die Radikalbildung der Zelllinie NR8383. Die Inkubation erfolgte in mit 0,3 % Methylzellulose supplementiertem Medium. Aufgelistet sind normalisierte Ergebnisse der Phagozytoserate (in % phagozytischer Zellen und die Anzahl aufgenommener Zymosanpartikel) sowie der Radikalbildung (Absorption bei 630 nm) bei Phagozytose-vermitteltem und bei stressbedingtem *oxidative burst*. Alle Werte sind als Mittelwerte mit zu gehörigem Standardfehler (MW±SE) aufgelistet.

NR8383		Phagozytose		Radikalbildung	
		mikroskopische Auswertung		NBT-Zymosan†	NBT-PBS†
Magnetische Levitation		% Phagozytose	Anzahl Partikel	Absorption 630	Absorption 630
<b>1g Kontrolle</b>	MW	34,56	3,28	1,00	1,00
	± SE	4,79	0,20	0,02	0,01
	n	5	5	4	8
<b>0g Magnet</b>	MW	34,04	3,73	1,04	1,21 ***
	± SE	5,23	0,08	0,03	0,04
	n	5	5	4	4
<b>1g Magnet</b>	MW	33,46	3,77	0,99	1,07
	± SE	5,93	0,20	0,04	0,04
	n	5	5	4	4
<b>2g Magnet</b>	MW	37,74	3,59	1,05	1,02
	± SE	6,35	0,25	0,03	0,02
	n	5	5	4	4

† Die Mittelwerte sind bereits normalisiert.

Die Mittelwerte zweier 1g Kontrollen aller Einzelexperimente wurden dafür jeweils gleich 1 gesetzt.

## **Eigene Veröffentlichungen und Posterbeiträge**

Huber K, Krötz-Fahning M, Hock B (2005) Phagocytosis as a biomarker for stress responses. *J. Gravit. Physiol.* 12 (1): 265-266

Huber K, Krötz-Fahning M, Hock B (2006) Respiratory burst as a biomarker for stress responses. *Protoplasma* 229: 221 – 224

Huber K, Krötz-Fahning M, Hock B (2006) Respiratory burst as a biomarker for immunomodulatory effects of space-flight conditions, Abstracts from the Fifth European Workshop on Astrobiology EANA, European Astrobiology Network Association 10-12 Okt. 2005, Budapest

Huber K, Krötz-Fahning M, Hock B: Respiratory burst as a biomarker for stress responses. 9<sup>th</sup> European Symposium on Life Sciences in Space, 26<sup>th</sup> Annual International Gravitational Physiology Meeting, Köln 26. Juni – Juli 2005, Vortrag.

Huber K, Krötz-Fahning M, Hock B: Respiratory burst as a biomarker for immunomodulatory effects of space-flight conditions. 5<sup>th</sup> EANA Workshop on Astrobiology, Budapest, 10.-12.Okt. 2005, Posterbeitrag.

Huber K, Krötz-Fahning M, Hock B: Respiratory burst as a biomarker for immune modulating effects. 9<sup>th</sup> meeting of the Ecosystem Health Network, Potsdam 15. Nov. 2005, Vortrag

## Danksagung

Meinen allerherzlichsten Dank an meinen Doktorvater **Herrn Prof. Dr. B. Hock** für die Unterstützung dieser Arbeit am Lehrstuhl für Zellbiologie der TU München, für die fachliche Hilfestellung, die jederzeitige Bereitschaft zum Gespräch und die Freiheit, meinen Ideen zu folgen.

Meiner guten Fee **Michaela Krötz-Fahning** möchte ich besonders danken. Ohne sie hätte ich die Unmengen an Experimenten niemals durchführen können. Außerdem war die Zusammenarbeit mit ihr mit sehr viel Spaß verbunden.

Die finanzielle Unterstützung dieses Projektes lieferte das Deutsche Zentrum für Luft und Raumfahrt (**DLR**, herzlichen Dank an **Dr. Otfried Joop**), außerdem wird das TRIPLE LUX Projekt getragen durch die Europäische Weltraumagentur (**ESA**). Bei **EADS Astrium GmbH** bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit bei der Entwicklung der hardware.

Der gesamten Arbeitsgruppe des Lehrstuhls für Zellbiologie (oder zwischenzeitlich Bioanalytik) danke ich vor allem für die unterhaltsamen und anregenden Kaffeepausen und Brezn-Frühstücke.

Ohne die zahlreichen Kooperationen wäre diese Arbeit für mich niemals so interessant gewesen: Bei **Prof. Dr. Dr. Oliver Ullrich** (Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg) möchte ich mich besonders für die Möglichkeit bedanken, wahnsinnig schöne und aufregende schwerelose Minuten im Parabelflug erlebt zu haben, sowie natürlich auch für die fruchtbare wissenschaftliche Zusammenarbeit. **PD Dr. Ruth Hemmersbach** (BSSC, DLR, Köln) danke ich ganz herzlich für die kompetente und unkomplizierte Unterstützung bei den Simulationsveruchen. Besten Dank auch an **Dr. Mike Davey** (University of Nottingham) für die Unterstützung der Experimente im supraleitfähigen Magneten, besonders an **Camelia Dijkstra** für die „Levitations-Hilfe“. **Dr. Barbara Böhmer** (Lehrstuhl für Tierernährung und Leistungsphysiologie, TUM) danke ich für die Überlassung der *Echinacea*-Extrakte, **Dr. Silvia Roser** (Lehrstuhl für Biofunktionalität der Lebensmittel, TUM) besten Dank für die Hilfe beim FACS und **Dr. Harald Schempp** (Lehrstuhl für Phytopathologie, TUM) für den entscheidenden Peroxidase-Tip.

Vielen Dank an **Marco**, dass er mich auch in den stressigen Phasen ertragen und immer unterstützt hat und mir sehr viele neue und spannende Anregungen aus anderer Perspektive gegeben hat. Und natürlich auch meiner Familie und meinen Freunden herzlichen Dank für die Unterstützung (besonders meinen lieben Schwestern **Monika** und **Marianne** sowie **Bettina**, die sich durch diesen Text gekämpft haben).

## Curriculum vitae

<b>Persönliche Daten</b>	Name:	Kathrin Huber
	Geburtsdatum:	25. November 1978
	Geburtsort:	Rosenheim
<b>Schulbildung</b>	09/86 – 06/95	Grundschule Elbach Gunetzhainer Realschule Miesbach Abschluss: Mittlere Reife
	09/95 – 08/96	Sophie-Scholl-Gymnasium München
	09/96 – 05/98	Gymnasium Miesbach Abschluss: Abitur
<b>Studium</b>	10/98 – 03/04	Ludwig-Maximilians-Universität München Diplomstudiengang Biologie
	09/04 – 07/07	Technische Universität München Promotion
<b>Praktische Tätigkeiten</b>	09/04 – heute	Wissenschaftliche Angestellte am Lehrstuhl für Zellbiologie der Technischen Universität München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan
	08/01 – 09/04	Werkstudentin im Labor für Medizinische Genetik, Dr. Klein, Martinsried
	03/04 – 04/04	Praktikum bei QIT Madagascar Minerals S.A., Fort Dauphin, Madagaskar