

Lehrstuhl für Hydrogeologie, Hydrochemie und Umweltanalytik der TU München,
Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie
und
GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Neuherberg,
Institut für Inhalationsbiologie
Klinische Kooperationsgruppe Aerosolmedizin

Wirkung von partikulären Umweltnoxen auf die Immunabwehr monozytärer Zellen

Thomas Hofer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. R. Nießner
2. apl. Prof. Dr. J. Heyder,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 02.11.2000 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 12.12.2000 angenommen.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen Juni 1997 und September 2000 als Gemeinschaftsprojekt des Lehrstuhls für Hydrogeologie, Hydrochemie und Umweltanalytik der TU München, Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie und des Instituts für Inhalationsbiologie, Klinische Kooperationsgruppe Aerosolmedizin, GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit.

Herrn Professor Dr. R. Nießner und Herrn Prof. Dr. Heyder danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, für die großzügige Unterstützung, das stete Interesse an der Arbeit und ihre ständige Diskussionsbereitschaft. Dieser Dank geht auch an den Leiter der Klinischen Kooperationsgruppe, Herrn Prof. Dr. H.W.L. Ziegler-Heitbrock sowie besonders an Herrn Dr. W. Möller und Dr. K. Maier für die gute Betreuung und die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Bei Herrn A. Ziesenis vom Institut für Inhalationsbiologie bedanke ich mich für die Bereitstellung der Beagle- und Ratten-Alveolarmakrophagen. Für die tatkräftige Einarbeitung am konfokalen Laser Scanning Mikroskop danke ich Herrn E. Mannweiler von der Arbeitsgruppe Cytometrie am Institut für Pathologie der GSF.

Ein besonderer Dank geht an Frau Dr. Frankenberger, die mir bei der Erlernung neuer Methoden und im Laboralltag jederzeit freundlich und tatkräftig zur Seite stand.

An dieser Stelle danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Inhalationsbiologie und insbesondere denen an der Klinischen Kooperationsgruppe Aerosolmedizin für die freundliche Aufnahme und stete Hilfsbereitschaft.

„Leben ist das Einatmen der Zukunft“

Pierre Laroux (1797 - 1871)
franz. Politiker und Philosoph

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Partikeln in der Atemluft | 1 |
| 1.2 Der Respirationstrakt des Menschen | 2 |
| 1.2.1 Morphologie und Funktion | 2 |
| 1.2.2 Partikeldeposition im Respirationstrakt | 2 |
| 1.3 Abwehrmechanismen | 4 |
| 1.3.1 Abwehrzellen | 5 |
| 1.3.2 Immunologische Funktionen der Alveolarmakrophage in der Lunge | 8 |
| 1.4 Abwehrstrategien von Makrophagen und Monozyten | 9 |
| 1.4.1 Zytoskelett | 9 |
| 1.4.2 Phagozytose | 10 |
| 1.4.3 Oxidativer Burst | 11 |
| 1.4.4 Genexpression | 13 |
| 1.5 Zielsetzung der Arbeit | 15 |
| | |
| 2. Ergebnisse | 16 |
| 2.1 Das Zytoskelett der J774A.1 Mausmakrophagen | 16 |
| 2.2 Phagozytose | 19 |
| 2.2.1 Kinetik der Phagozytose | 19 |
| 2.2.2 Bedeutung des Zytoskeletts für die Phagozytose | 21 |
| 2.2.3 Bedeutung der Oberflächenrezeptoren für die Phagozytose | 27 |
| 2.3 Oxidativer Burst | 34 |
| 2.4 Wirkung feiner und ultrafeiner Partikel auf das Zytoskelett von Makrophagen - Zytomagnetometrische Untersuchungen | 40 |
| 2.5 Wirkung von Zytoskelettnoxen sowie feiner und ultrafeiner Partikeln auf die Genexpression | 54 |
| 2.5.1 Einfluß von Cytochalasin D, Colchicin und EC90 auf die Expression von Zytokinen | 54 |
| 2.5.2 Screening von Genen, deren Expression durch Zytoskelettnoxen und Partikel verändert ist, mit Hilfe der Expressionsarray-Technik | 55 |
| 3. Diskussion | 67 |
| 3.1 Modell des Alveolarmakrophagen | 67 |
| 3.2 Zytoskelett und Phagozytose | 67 |
| 3.2.1 Untersuchungen mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM) | 67 |
| 3.2.2 Untersuchungen mit dem Durchflußzytometer | 70 |
| 3.3 Oxidativer Burst | 73 |
| 3.4 Zytomagnetometrische Untersuchungen zur Wirkung von feinen und ultrafeinen Partikeln auf das Zytoskelett | 77 |
| 3.5 cDNA Expressions Array Technik | 82 |
| | |
| 4. Zusammenfassung | 89 |

| | |
|--|-----|
| 5. Experimenteller Teil | 92 |
| 5.1 Material | 92 |
| 5.1.1 Reagenzien | 92 |
| 5.1.2 Lösungen und Medien | 94 |
| 5.1.3 Lösungsgemische für die Polymerasekettenreaktion | 97 |
| 5.1.4 Zellkulturmaterial und Reagenzgefäße | 98 |
| 5.1.5 Antikörper und fluoreszenzmarkierte Antikörper | 98 |
| 5.1.6 Partikeln | 98 |
| 5.1.7 Geräte | 100 |
| 5.2 Zellkultur | 101 |
| 5.2.1 Separation von peripheren monozytären Zellen aus dem Blut (PBMC) | 101 |
| 5.2.2 Gewinnung von Alveolarmakrophagen vom Menschen und vom Hund | 101 |
| 5.2.3 Gewinnung von Pleuramakrophagen vom Menschen | 101 |
| 5.2.4 J774A.1 Mausmakrophagen | 102 |
| 5.2.5 Mono Mac 6 (MM6) | 102 |
| 5.2.6 Instillationsexperimente bei WKY-Ratten | 102 |
| 5.2.7 Vitalitätstest mit Trypanblau | 103 |
| 5.3 Zytoskelettmarkierung | 103 |
| 5.3.1 Kultivierung J774A.1 auf Deckgläsern | 103 |
| 5.3.2 Herstellung frischer Formaldehydlösung | 103 |
| 5.3.3 Markierung von Aktin (Mikrofilamente) | 103 |
| 5.3.4 Markierung von Tubulin (Mikrotubuli) | 104 |
| 5.3.5 Doppelmarkierung von Aktin (Mikrofilamente) und Tubulin (Mikrotubuli) | 104 |
| 5.4 Partikeln | 105 |
| 5.4.1 Bakterien | 105 |
| 5.4.2 Fluoreszenzmarkierung und Opsonierung von Schaferythrozyten | 105 |
| 5.4.3 Polystyrolatex-Partikeln | 105 |
| 5.4.4 Opsonierung von Zymosan | 106 |
| 5.5 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie | 106 |
| 5.6 Durchflußzytometrie | 107 |
| 5.7 Phagozytosemessung | 108 |
| 5.7.1 Phagozytosemessung mit dem Fluoreszenzmikroskop und dem CLSM | 108 |
| 5.7.2 Phagozytosemessung mit Hilfe des Durchflußzytometers | 108 |
| 5.8 Messung des Oxidativen Bursts im Durchflußzytometer | 108 |
| 5.9 Zytomagnetometrie | 109 |
| 5.9.1 Herstellung und Charakterisierung der sphärischen ferromagnetischen Fe ₃ O ₄ -Partikeln | 110 |
| 5.9.2 Vorbehandlung der Zellen | 110 |
| 5.9.3 Zytomagnetometer | 110 |
| 5.9.4 Meßprinzip | 111 |
| 5.9.5 Rotation der ferromagnetischen Fe ₃ O ₄ -Partikeln und damit der Phagosomen .. | 113 |
| 5.10 Reverse Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) | 114 |
| 5.10.1 Isolierung der Gesamt-RNA | 115 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 5.10.2 | Reverse Transkription | 115 |
| 5.10.3 | PCR | 116 |
| 5.10.4 | Gel-Elektrophorese | 116 |
| 5.10.5 | Primer | 116 |
| 5.11 | Genexpressions-Arrays | 117 |
| 5.11.1 | RNA-Isolierung und Aufreinigung | 118 |
| 5.11.2 | Reinheitsbestimmung im Agarosegel | 118 |
| 5.11.3 | DNaseI-Verdau | 118 |
| 5.11.4 | RNA-Isolierung und Aufreinigung nach dem DNaseI-Verdau | 119 |
| 5.11.5 | Prüfung der RNA auf DNA-Kontamination durch PCR | 119 |
| 5.11.6 | Reverse Transkription in cDNA mit radioaktiver Markierung | 120 |
| 5.11.7 | Hybridisierung auf die Atlas cDNA Membran | 121 |
| 5.11.8 | Versuchsauswertung | 121 |
| 5.12 | Statistik | 122 |
| 6. | Abkürzungen | 123 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 124 |
| 8. | Anhang zu den Ergebnissen | 134 |
| 8.1 | cDNA Expressions Array (Clontech) | 134 |
| 8.1.1 | Atlas cDNA Expressions Array Human, 588 Gene Cytochalasin D und Colchicin | 134 |
| 8.1.2 | Atlas cDNA Expressions Array Human 1.2, 1.176 Gene P90, EC90 und SDR | 139 |

1. Einleitung

1.1 Partikeln in der Atemluft

Verbrennungsprozesse sind in den modernen Industriestaaten Europas allorts zu finden, sei es in Industrieanlagen, im Autoverkehr oder bei der Wohnungsheizung. Durch Steigerung der Produktion und des Verkehrs finden sich immer mehr Partikeln in der Atemluft. Abhängig vom Verbrennungsprozeß und einer immer feiner entwickelten (Verbrennungs-) Technik, steigt der Anteil ultrafeiner Partikeln (Durchmesser unter $0,1 \mu\text{m}$) an, obwohl der gesamte Massenausstoß zurückgeht. Bis vor wenigen Jahren hat man den ultrafeinen Partikeln wenig Beachtung geschenkt, denn, gemessen an ihrer Masse, ist ihr Anteil unter den partikulären Bestandteilen der Luft verschwindend gering. Betrachtet man aber ihre Anzahl oder ihre spezifische Oberfläche, ist ihr Anteil groß.

Warum ist gerade die Fraktion der feinen und ultrafeinen Partikeln so interessant? Es ist noch weitgehend unklar, ob von diesen Partikeln ein gesundheitliches Risiko ausgeht. Wenn die Inhalation ultrafeiner Partikeln eine gesundheitsschädliche Wirkung hat, dann sollte die biologisch wirksame Dosis nicht durch die Masse der Teilchen, sondern durch ihre Anzahl oder ihre Oberfläche bestimmt sein.

Mehrere Studien unterstützen die Hypothese, daß ultrafeine Partikeln eine Toxizität auf die Lunge besitzen [1, 2]. Eine Schlüsselstudie dazu lieferten Ferin et al. [2], die Ratten feines (250 nm Durchmesser) und ultrafeines (20 nm Durchmesser) Titandioxid in die Lunge instillierten. Nur bei ultrafeinem Titandioxid kam es zu einer Entzündungsreaktion, bei feinem Titandioxid kaum. Die Ergebnisse der Studie von Ferin et al. wurden von Lie et al. [3] für die Partikeln „Carbon Black“ (Kohlenstoff) bestätigt. Die Mechanismen, die den beobachteten Effekten zugrunde liegen, sind weitgehend unbekannt. Es wird angenommen, daß Umweltaerosole physiologische Reaktionen des Atemtrakts modulieren können, wobei unklar ist, ob und wann irreversible pathogenetische Veränderungen oder aber reversible Reaktionen in Form einer Adaptation stattfinden.

In epidemiologischen Studien in Europa, Nord- und Südamerika sowie in Asien wurde ein Zusammenhang zwischen Massenkonzentration feiner Aerosolpartikeln (aerodynamischer Durchmesser kleiner als $2,5 \mu\text{m}$) in der bodennahen Atmosphäre und der Krankheits- bzw. Sterberate gefunden [4, 5]. Tierexperimentelle Untersuchungen von Nikula und Koautoren [6] zeigten zudem bei vergleichenden Untersuchungen mit Dieselruß-Partikeln und elementarem Kohlenstoff, daß nicht nur die aus Motoren freigesetzte komplexe Mischung aus Ruß und den daran angelagerten organischen Komponenten und Gasen, sondern bereits die reinen Kohlenstoff-Partikeln Lungentumore auslösen können.

Dies wurde als Hinweis auf die Existenz einer Toxizität interpretiert, die von der chemischen Zusammensetzung eines Materials unabhängig ist. Diese Hypothese, die bis heute sehr kontrovers diskutiert wird und für die es noch keine zweifelsfreien Belege gibt, wurde 1995 durch eine weitere Beobachtung unterstützt. Gesunde Ratten starben nach 30-minütiger Inhalation von sogenannten ultrafeinen Teilchen (Durchmesser $< 0,1 \mu\text{m}$) an einer akuten hämorrhagischen Lungenentzündung, obwohl die Massenkonzentration der in diesem Experiment verwendeten Teflon-Aerosolpartikeln bei deren Produktion entstandener Gase relativ

gering war ($< 60 \mu\text{g}/\text{m}^3$) [7, 8]. Instillation von ultrafeinen TiO_2 -Partikeln führte zu starken Entzündungen in der Lunge [8].

Umweltaerosole setzen sich aus Partikeln unterschiedlicher Größe zusammen. Der Größenbereich von Partikeln, die beim Einatmen und der Deposition in der Lunge eine Rolle spielen, liegt zwischen $0,01$ und $10\mu\text{m}$. In der Literatur gibt es unterschiedliche Klassifikationen der Partikelgröße. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Klassifikationen kann der folgenden Tabelle entnommen werden (Tab. 1.1).

| Klassifikation | Durchmesser |
|----------------|------------------------------------|
| ultrafein | $< 0,1 \mu\text{m}$ |
| fein | $0,1 \text{ bis } 1,0 \mu\text{m}$ |
| grob | $> 1 \mu\text{m}$ |

Tab. 1.1 Klassifizierung von Aerosol-Partikeln gemäß ihrer Teilchengröße. Modifiziert nach [9].

1.2 Der Respirationstrakt des Menschen

1.2.1 Morphologie und Funktion

Die Lunge dient dem Gasaustausch, wobei Sauerstoff ins Blut aufgenommen und Kohlendioxid abgegeben wird. Dazu muß ein enger Kontakt zwischen Blut und Luft hergestellt werden.

Anatomisch kann man ein luftleitendes Röhrensystem und ein Alveolarsystem unterscheiden. Das luftleitende System gliedert sich in obere Atemwege (Nase, Nasennebenhöhlen und Kehlkopf) und die unteren Atemwege (Trachea und Bronchien). Die Bronchien verzweigen sich baumförmig dichotom in bis zu 16 Generationen, an die sich mit einer Übergangszone der Alveolarbereich anschließt, der mit Generation 23 in den Alveolarsäcken endet [10].

Die gesamten Atemwege sind mit einer Schleimhaut ausgekleidet, die in den einzelnen Bereichen des oberen Atemtraktes ihrer Funktion entsprechend unterschiedlich aufgebaut ist. Trachea und Bronchien sind von einem Flimmerepithel ausgekleidet, welches von einer Schleimschicht bedeckt ist, die von im Epithel liegenden schleimbildenden Zellen (Becherzellen) gebildet wird.

Im Alveolarbereich erfolgt der Gasaustausch zwischen Luft und dem Blut mittels Konvektion und Diffusion. Für einen effizienten Gasaustausch müssen die Oberfläche möglichst groß und die Diffusionswege für die Atemgase möglichst kurz sein. Es sind ca. 300 bis 600 Millionen Alveolen [10] mit einer Gesamtoberfläche von ca. 140 m^2 [11] ausgebildet. In engem Kontakt zu den Alveolen steht ein dichtes Netz an Blutkapillaren. Die Wand zwischen Alveolarraum und Blutgefäß besteht aus drei Schichten: dem einschichtigen Alveolarepithel, der darunter liegenden Basalmembran und dem Endothel der Blutgefäße, und ist mit $0,5 \mu\text{m}$ Dicke sehr dünn (Abb. 1.1). Die ganze Struktur ist in ein Gerüst elastischer und kollagener

Fasern eingelagert, um die Elastizität und mechanische Stabilität des Lungengewebes zu gewährleisten.

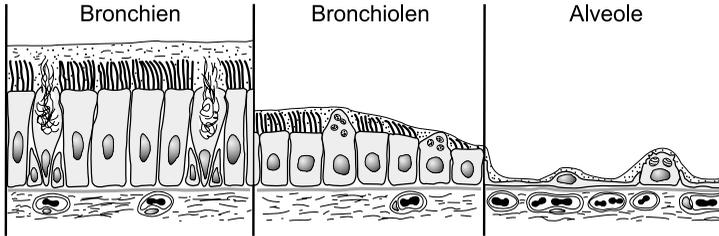


Abb. 1.1 Vergleich der Wandstärken im respiratorischen Trakt. Je tiefer ein Partikel in die Lunge eindringt, desto dünner ist die Barriere, die es von den Blutgefäßen trennt. Im Bronchus ist diese Barriere bis $20\ \mu\text{m}$ dick, in den peripheren Atemwegen nur noch die Hälfte, und in den Alveolen ist sie bis zu $0,5\ \mu\text{m}$ dünn. Nach [9].

1.2.2 Partikeldeposition im Respirationstrakt

Beim Einatmen von Aerosolpartikeln hat ihre Größe einen entscheidenden Einfluß auf ihr Schicksal im Atemtrakt (Abb. 1.2). Partikeln mit $10\ \mu\text{m}$ Durchmesser werden weitgehend im Nasen- und Rachenraum zurückgehalten. Partikeln im Größenbereich zwischen $0,1$ und $1\ \mu\text{m}$ gelangen zwar bis in den Alveolarraum, werden aber größtenteils wieder ausgeatmet. Partikeln mit einem Durchmesser $< 0,1\ \mu\text{m}$ werden jedoch besonders effektiv im Alveolarraum abgeschieden.

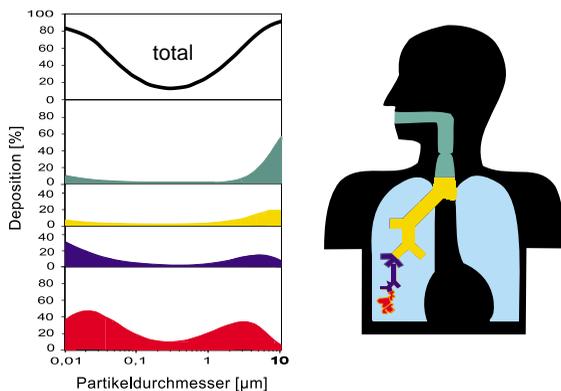


Abb. 1.2 Partikeldeposition im Atemtrakt des Menschen in Abhängigkeit vom Durchmesser der eingeatmeten Partikeln. Atmung in Ruhe ($300\ \text{cm}^3$ pro sec; Dauer des Ein- und Ausatmungsvorgangs: $2,5\ \text{sec}$). Nach [12, 13].

Die Ablagerung von Partikeln in den Alveolen kann zu funktionellen und nicht selten irreversiblen Schäden führen. Die Alveolen sind sehr fragile Gebilde (Abb. 1.1). Hier erfolgt der lebenswichtige Gasaustausch über die nur etwa 0,5 µm dicke Schicht aus Alveolarepithel und Blutgefäßwand (Endothel). Diese dünne Schicht verhindert, daß ein offener Kontakt zwischen Außen (Luft in den Alveolen) und dem Körperinneren (z.B. Blut) zustandekommt. Die Barriere schützt vor dem Eindringen von Verunreinigungen der Atemluft (z.B. Bakterien) in den Körper als auch vor dem Ausströmen von Blutbestandteilen in die Lunge.

Es gibt experimentelle Hinweise, daß sich anorganische, ultrafeine Partikeln direkt in das Lungengewebe eindringen können. Hohe Konzentration und lange Verweildauer erhöht die Penetration von Partikeln in Epithelzellen, ins Interstitium, in Blut und Lymphe [9]. Betroffene Epithelzellen werden hypertroph und hyperplastisch, zuweilen auch metaplastisch. Oft ist das Epithel so überstimuliert, daß morphologisch der Eindruck entsteht, als sei das Alveolarepithel durch das Bronchialepithel ersetzt worden [14, 15].

1.3 Abwehrmechanismen

Die Abwehrmechanismen der Lunge lassen sich in eine unspezifische mechanische Abwehr (mechanische Filterung, mukoziliärer Abtransport und Husten) sowie eine unspezifische bzw. spezifische immunologische Abwehr (Phagozytose, T-Zell-Aktivierung, Antikörperbildung) einteilen und grob der anatomischen Unterteilung der Lunge in obere und untere Atemwege (Nase, Rachen, Kehlkopf, Trachea, Bronchien) und dem Alveolarraum zuordnen.

Durch das Atemmanöver wird der Lunge Frischluft zu- und verbrauchte Luft abgeführt. Dabei wirken Nase, Kehlkopf und Bronchialbaum als hintereinandergeschaltete Filter, die zur Abscheidung großer Teilchen führt [16]. Haare im Raum der äußeren Nase filtern grobe Verunreinigungen aus der Atemluft. Durch den anatomisch nicht geradlinigen Bau (Nasenschnecken, Rachen, Kehlkopf, Bronchialbaum) werden Fremdstoffe auf dem Schleim (Mucus), der die Epidermis bedeckt, abgelagert.

Im Nasen-Rachen-Bereich triggern die Partikeln den Sekretfluß. Der Schleim sowie darin haftende Fremdstoffe werden durch das mukoziliäre System abtransportiert. Durch koordinierten Zilienschlag der zilienbewehrten Epithelzellen wird der Schleim und die Verunreinigungen, die sich darauf und darin befinden, mit einer Geschwindigkeit von 4 bis 10 mm pro min oralwärts transportiert und verschluckt. Der Hustenmechanismus, eine reflektorisch gesteuerte explosive Form des Ausatmens, unterstützt die Elimination von Sekret und Fremdstoffen. Im Schleim selbst befinden sich antibakteriell und antiviral wirkende Proteine, die von epidermalen Zellen und Alveolarmakrophagen gebildet und sekretiert, oder zum Teil aus tieferen Regionen mit dem Zilienschlag in höhere transloziert werden. Vertreter dieser Proteine sind z.B. Lysozym, Proteine aus dem Komplementsystem (C3a, C5a), Zytokine, Immunglobuline (IgA, IgM, IgE) und andere.

Tiefer, d.h. in den Alveolarraum eingedrungene Fremdstoffe, können nicht mehr mechanisch abtransportiert werden, weil ein Flimmerepithel fehlt. Hier kommt den Phagozyten im Abwehrsystem der Lunge eine Schlüsselrolle zu. Partikeln in den Alveolen werden hauptsächlich durch Alveolarmakrophagen phagozytiert. Dieser Vorgang hängt auch von den Eigenschaften der Partikeln ab.

Die primäre Freßzelle ist der Alveolarmakrophage sowie, in geringerem Umfang, der Neutrophile Granulozyt. Die Effektivität der Phagozytose kann beim (Alveolar-) Makrophagen durch die Opsonierung der Fremdkörper (z.B. Bakterien), d.h. die Markierung mit Proteinen, die eine immunologische Wirkung besitzen, gesteigert werden. Intrazellulär wird durch Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (O_2^- , H_2O_2 , OCl^-) die Abtötung des aufgenommenen Materials erreicht. Neben diesen Aufgaben der unspezifischen Immunabwehr kommt dem Alveolarmakrophagen auch eine wichtige Rolle in der spezifischen Immunantwort zu. Neben der Phagozytose, Abtötung und Verdauung des aufgenommenen Materials, ist er auch für die Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Lymphozyten zuständig. Durch Bildung und Sekretion einer Vielzahl von Zytokinen und anderer Entzündungsmediatoren (Tab. 1.2) ist der Makrophage maßgeblich bei der Initiation, Modulation und Terminierung der Entzündungsreaktion und der anschließenden Einleitung der Reparaturphase beteiligt [10].

Sekretorische Produkte des Alveolarmakrophagen

1. Zytokine und Chemokine
Interleukin, Tumornekrosefaktor, Interferone, Wachstumsfaktoren,
2. Komplement
C1, C4, C2, C3, C5, C3a, C5a
3. Gerinnungsfaktoren
Prothrombin, Faktor V, VII, IX, X
4. Proteinasen
Kollagenase, Elastase
5. Proteinase-Inhibitoren
Alpha-1-Proteinase, Alpha-1-Chymotrypsin, Alpha-2-Makroglobulin
6. Chemotaktische Faktoren
neutrophiler chemotaktischer Faktor, Monozyten-chemotaktischer Faktor, LTB_4
7. bioaktive Lipide
Zyklooxygenase-Produkte, Lipoxigenase-Produkte, PAF
8. Oxidantien
Superoxid-Anion, Peroxide, Hydroxylradikal

Tab. 1.2 Übersicht über sekretorische Produkte des Alveolarmakrophagen, die im Entzündungsprozeß eine wichtige Rolle spielen. Nach [10].

1.3.1 Abwehrzellen

Um die Sterilität der Lunge zu gewährleisten, sind spezialisierte Zellen des Immunsystems vorhanden. Dies sind hauptsächlich Makrophagen, deren direkte Vorläufer die Monozyten sind, aber auch Neutrophile Granulozyten, sowie T- und B-Lymphozyten. Alle diese Zellen haben ihren Ursprung im Knochenmark. Dort befindet sich die pluripotente Stammzelle, aus der sich durch Reifung und Differenzierung Lymphozyten, Granulozyten, Monozy-

ten, Erythrozyten und Blutplättchen entwickeln. Abb. 1.3 zeigt die Abstammungsverhältnisse der einzelnen Zellen.

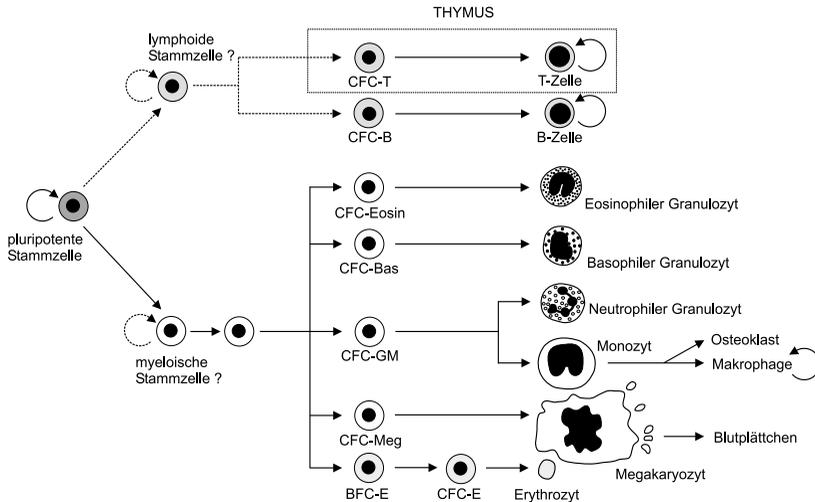


Abb. 1.3 Das postulierte Schema der Abstammungsverhältnisse der Blutzellen von der pluripotenten Stammzelle. Die Stammzelle teilt sich und erzeugt entweder eine weitere Stammzelle (Selbsterneuerung) oder eine Vorläuferzelle (Colony-Forming Cell). Die pluripotente Stammzellen differenzieren, angeregt durch spezifische Wachstumsfaktoren, zu den unterschiedlichen Typen von Blutzellen. Abkürzungen: CFC-T = Kolonie-bildende Zelle-T-lymphozytär, entsprechend -B = B-lymphozytär, -Eosin = eosinophiler Granulozytär, -BAS = basophile-Granulozytär, -GM = Granulozytär-monozytär, MEG = megakaryozytär, BFC-E = burst forming cell - erythrocyte, CFC-E = colony forming cell - erythrocyte. Nach [19].

In der bronchoalveolären Lavage (BAL) gesunder Nichtraucher sind 90,3 % der immun-kompetenten Zellen Makrophagen, 7,8 % Lymphozyten und 1,2 % Neutrophile Granulozyten [17]. Kommt es zu einer immunologischen Reaktion (akute Entzündung), erhöht sich die Gesamtzellzahl signifikant und ihr Verhältnis zueinander verschiebt sich zugunsten der Neutrophilen Granulozyten. Bei Patienten mit akuter Bronchitis sind 23,5 % Makrophagen, 68,3 % Neutrophile Granulozyten und 7,4 % Lymphozyten in der Lavageflüssigkeit enthalten [17, 18].

Neutrophile Granulozyten

Makrophagen und Epithelzellen sezernieren Entzündungsmediatoren, die Neutrophile Granulozyten zum Entzündungsherd locken. Die Neutrophilen Granulozyten besitzen zahlreiche Lysosomen, die reich an Hydrolasen, Lysozym und Myeloperoxidase sind. Sie können gut und effektiv phagozytieren und produzieren große Mengen an Sauerstoffradikalen (Oxidativer Burst). Die Lysosomen verschmelzen mit den Phagosomen, um die darin aufgenommenen Fremdstoffe durch enzymatischen Verdau zu vernichten. Ihre Zellmembran trägt Rezeptoren für Immunglobulin (Fc-Rezeptoren) und Komplement (C3b, C5a). Im Blut stel-

len die Neutrophilen Granulozyten die zahlenmäßig größte Population innerhalb der weißen Blutkörperchen dar [20].

Lymphozyten

Es lassen sich zwei Hauptgruppen, nämlich die B- und T-Lymphozyten untergliedern. Die B-Lymphozyten werden im Knochenmark gebildet, zirkulieren in Blut und sind in den lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten) zu finden. Sie besitzen Antikörper, die sie in ihre Zytoplasmamembran verankert haben und nach außen ragen. So ausgerüstet warten die B-Lymphozyten, bis ein fremdes Antigen bindet und differenzieren daraufhin zu Plasmazellen, um große Mengen von Antikörpern, die spezifisch für das gebundene Antigen sind, zu bilden und zu sezernieren. Die T-Lymphozyten stammen ebenfalls aus dem Knochenmark, benötigen jedoch zur Reifung den Thymus. Auch die T-Zellen tragen in ihrer Membran verankerte, nach außen gerichtete T-Zell-Rezeptoren. Von den T-Lymphozyten gibt es zwei Hauptklassen, die T-Helfer-Zellen und die zytotoxischen T-Zellen. Die Funktion der T-Helfer-Zellen besteht darin, nach ihrer eigenen Aktivierung durch Synthese und Sekretion von Zytokinen die Aktivität anderer weißer Blutkörperchen (z.B. B-Lymphozyten) zu verstärken. Die zytotoxischen T-Zellen erlangen nach ihrer Aktivierung die Fähigkeit, durch Abgabe zytotoxischer Stoffe Zielzellen (z.B. virusinfizierte Zellen) abzutöten [20].

Monozyten

Die Monozyten entstehen im Knochenmark und wandern dann ins Blut, in dem sie etwa drei Tage lang zirkulieren. Etwa 1 bis 6 % der weißen Blutkörperchen im Blut sind Monozyten. Etwa 1 % der zirkulierenden Monozyten proliferieren. Alle Monozyten sind zur Phagozytose befähigt. Viele der Monozyten lagern sich in Organen an die Wand der Blutgefäße an und fangen hier Pathogene ab, die in die Organe eindringen wollen. Sie verlassen auch den Kreislauf und emigrieren in die Organe. Die Emigration kann durch Verletzungen oder Infektion des Gewebes gesteigert werden. Während die Monozyten in die Organe wandern, differenzieren sie sich zu Makrophagen. Sie wachsen um das bis zu zehnfache ihrer ursprünglichen Größe, sie besitzen mehr Mitochondrien, haben einen größeren Golgi-Apparat, mehr Lysosomen, einen höheren Gehalt an hydrolytischen Enzymen und eine gesteigerte Phagozytosefähigkeit [20].

Makrophagen

Die Makrophagen bleiben entweder in dem Gewebe, in das sie emigriert sind (fixierte Makrophagen) oder sie werden zu wandernden Zellen. Die fixierten Makrophagen bilden kleine Zellfortsätze (Dendriten), um Halt in den Geweben zu finden. Sie haben in den verschiedenen Geweben unterschiedliche Namen, z.B. Kupffer-Zellen (Leber), Mikroglia (Gehirn), Histiozyten (Haut) oder Alveolarmakrophagen (Lunge). Die freien Makrophagen sind große Zellen von 15 bis 25 µm Durchmesser mit großen Zellfortsätzen, den Lamellipodien und vielen, sehr kleinen Membranausstülpungen, den Mikrovilli, die ihre Oberfläche vergrößern. Sie wandern durch die Gewebe und halten nach phagozytierbarem Material Ausschau. Dieses wird aufgenommen und mit Hilfe der hydrolytischen Enzyme in den Lysosomen ver-

daut. Makrophagen sind „Allesfresser“, insbesondere im Hinblick auf Partikeln, die sie aufnehmen und zu verdauen versuchen. Dabei sind die Partikeln nicht immer von fremder Herkunft, sondern auch körpereigen. Gealterte Erythrozyten, apoptotische Zellen und Zelltrümmer werden auf diese Art entsorgt.

Makrophagen kommen in drei Aktivierungszuständen vor, von reaktiv über aktiviert bis zu hyperaktiviert. Verschiedene Stimuli regulieren den Übergang der verschiedenen Aktivierungsstadien. Ruhende Makrophagen werden von Interferon- γ , anderen Zytokinen, Hormonen, Entzündungsmediatoren und von exogenen Substanzen aktiviert. Den Schritt zu hyperaktivierten Makrophagen leitet der Kontakt mit bakteriellen Zellwandbestandteilen, z.B. Lipopolysaccharide, ein. Die Hyperaktivierung befähigt die Makrophagen, aufgenommene Mikroorganismen und solche, die für die Aufnahme ins Zellinnere zu groß sind, durch Ausschüttung von lysierenden Enzymen zu zerstören. Zudem können sie toxische Moleküle wie Sauerstoffradikale freisetzen. Morphologisch und biochemisch ist die Hyperaktivierung durch eine größere Anzahl an Mitochondrien, Lysosomen und Ribosomen, einen ausgedehnteren Golgi-Apparat, einen erhöhten Proteinumsatz, erhöhten ATP-Spiegel, höhere Enzymaktivität und einen erhöhten Sauerstoffbedarf charakterisiert.

Eine Vielzahl von Substanzen werden von den Makrophagen gebildet. Sie dienen als Entzündungsmediatoren, zur Zerstörung von Fremdstoffen (toxische Moleküle), aber auch dem Wiederaufbau des Gewebes durch Wundheilung. Einige dieser Substanzen wirken auch als chemotaktisches Signal zur Anlockung weiterer Entzündungszellen (Makrophagen, Neutrophile, Lymphozyten). Die chemotaktisch wirksame Substanz diffundiert ins Gewebe und verdünnt sich dabei. Es entsteht ein Konzentrationsgradient, der am Ort der Substanz-Ausschüttung am größten ist. Patrouillierende Entzündungszellen erkennen das Signal und folgen dem steigenden Gradienten zum Entzündungsort (Chemotaxis) [20].

1.3.2 Immunologische Funktionen der Alveolarmakrophage in der Lunge

Für den allgemeinen Schutz der Lunge spielen die Alveolarmakrophagen eine herausragende Rolle. Während die Filterfunktion der Nase und das mukoziliäre System nur in den oberen Atemwegen sowie in der Trachea und den Bronchien für den Abtransport von Fremdstoffen sorgen, halten die Alveolarmakrophagen den alveolären Bereich der Lunge sauber und steril. Der Alveolarmakrophage ist ein wichtiges Glied in der immunologischen Abwehrkette. Der freie Makrophage, der auf dem alveolären Epithel aufsitzt [21], ist hauptsächlich mit Phagozytose und „Clearance“, d.h. Reinigung der Lunge von eingeatmeten partikulären Fremdstoffen (Partikelaerosole, Bakterien) beschäftigt. Dabei verhindert er, daß zu viele Partikeln durch die epitheliale Barriere ins Interstitium dringen, dort wachende Gewebemakrophagen und Lymphozyten mit Antigenen überladen und so eine ständige Entzündung verursachen würden.

Die Alveolarmakrophagen rekrutieren sich aus Monozyten, die aus dem Blut in die Lunge einwandern [22] und sich differenzieren (Abb. 1.4). Ein Teil von ihnen wandert in die Alveolen ein, der Rest bleibt als fixierte Makrophagen im Interstitium der Lunge und stellt

eine Art Reserverpool dar, von dem bei Bedarf schnell Makrophagen in die Alveolen nachgeliefert werden kann. Unter normalen Bedingungen sind 3 bis 5 % aller Zellen in der Alveolarregion Alveolarmakrophagen und sie stellen mit 60 % den größten Teil aller Makrophagen-Subpopulationen in der Lunge [23]. Ein weiterer Mechanismus, relativ rasch Zellen zur Verfügung zu stellen, ist die Fähigkeit zur Teilung, die die differenzierten Zellen noch nicht verloren haben [24].

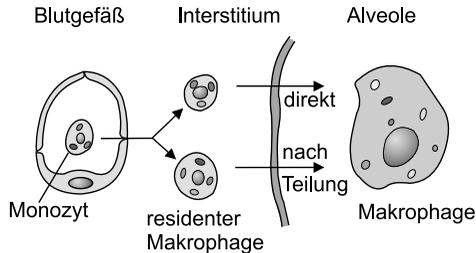


Abb. 1.4 Postulierte Herkunft der Alveolarmakrophagen nach Bowden und Adamson [24]. Erklärung im Text.

Die beiden vorgestellten Mechanismen, eine große Anzahl von Zellen zur Verfügung zu stellen, sind unterschiedlich effizient. Sofort nach Deposition von Partikeln in der Lunge strömen Monozyten aus dem Blut in die Lunge ein. Innerhalb eines Tages ist der Höchststand erreicht. Etwa nach zwei Tagen beginnen die interstitiell in der Lunge gelegenen Makrophagen zu proliferieren und erhöhen so weiter die Zahl der Alveolarmakrophagen in den Alveolen. Zeitgleich werden Neutrophile Granulozyten chemotaktisch angelockt, vor allem, wenn es sich um biotische Verunreinigungen, wie z.B. Bakterien handelt. Die Neutrophilen-Reaktion ist nur von kurzer Dauer, was mit der kurzen Lebensdauer der Zellen und ihrem aggressiven zytotoxischen Potential zusammenhängt. Die Alveolarmakrophagen verweilen bei der Maus unter normalen Bedingungen bis zu vier Tagen in den Alveolen [24]. Unter partikulärer Belastung kann diese Zeitspanne bis zu drei Monaten betragen [22].

Die Alveolarmakrophagen scheinen eine homogene und gut abgrenzbare Makrophagen-Subpopulation zu sein. Sie besitzen eine übereinstimmende Morphologie, haben alle die gleiche Lokalisation auf dem Epithel der Alveolen und besitzen nicht zuletzt ein spezifisches Set von Oberflächenantigenen („Marker“), die sie von Makrophagen in anderen Geweben unterscheiden [25]. Das darf aber nicht darüber hinwegtäuschen, daß Alveolarmakrophagen in weiten Bereichen ihrer biophysikalischen, biochemischen, funktionellen und morphologischen Charakteristik sowie auch im Muster ihrer Oberflächenantigene zueinander unterschiedlich sind [23, 26, 27]. Das ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß Zellen unterschiedlichen Reifungs- oder Differenzierungsgrades nebeneinander vorkommen und / oder daß die Alveolarmakrophagen von unterschiedlichen Monozytenpopulationen abstammen.

1.4 Abwehrstrategien von Makrophagen und Monozyten

1.4.1 Zytoskelett

Schlüsselfunktionen von immunkompetenten Zellen (z.B. Neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen) sind Phagozytose, Chemotaxis, Migration und Signalübertragung. Damit diese Prozesse koordiniert ablaufen, ist ein intaktes Zytoskelett notwendig.

Das Zytoskelett der Zelle ist ein komplexes Geflecht aus Proteinfilamenten und besteht aus drei Hauptkomponenten, den Aktin-, Mikrotubuli- und Intermediärfilamenten. Jeder Fasertyp setzt sich aus einzelnen Protein-Monomeren zusammen (Untereinheiten), die mit Hilfe von ATP zu Filamenten polymerisieren. Das Zytoskelett ist eine sehr dynamische Struktur, das sich ständig neu organisiert. Das ermöglicht der Zelle, sich zu teilen, ihre Form laufend zu verändern und auf Reize aus ihrer Umgebung zu reagieren. Für immunologisch wichtige Funktionen, wie die oben genannte Phagozytose oder die gerichtete Fortbewegung (Migration), sind die Aktin- und Mikrotubulifilamente von großer Wichtigkeit. Nur diese beiden Filamenttypen sind deshalb Gegenstand der Untersuchungen.

An die Zytoskelett-Filamente binden „Zubehör“-Proteine, die unterschiedliche Funktionen erfüllen. Einige dieser Proteine verknüpfen die Filamente untereinander, andere schaffen eine Verbindung zu anderen Zellbestandteilen wie z.B. die Zytoplasmamembran oder zu den zytoplasmatischen Domänen transmembraner Oberflächenrezeptoren. Es gibt spezielle Proteine, die die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Polymerisation steuern, und solche, die unter ATP-Verbrauch andere Zellorganellen (z.B. Phagosome) entlang der Filamente, die sie wie Schienen einer Eisenbahn nutzen, transportieren.

Das Zytoskelett ist kein starres Gebilde. Fortwährende Abbau- und Aufbauprozesse machen das Aktin- und Tubulin-Gerüst zu einer dynamischen Struktur. Für Funktionen der Zelle, die vom Zytoskelett direkt und indirekt abhängig sind, ist dies unerlässlich. Entzündungszellen wie Makrophagen oder Neutrophile müssen innerhalb des Körpers beweglich sein. Für sie reicht es nicht, sich mit dem Blutstrom passiv im Körper zu verteilen. Sie müssen, ange lockt durch einen chemischen Reiz, z.B. von Entzündungsmediatoren (Chemotaxis), gezielt zum Ort der Entzündung wandern und dabei Blutgefäßschranken überwinden und durch Gewebe hindurch permeieren (Rolling, Adhesion, Diapedese). Die (Fort-) Bewegung der Zellen wird als Migration bezeichnet und beruht hauptsächlich auf der Aktion der Aktin-Filamente. Durch Polymerisation von Aktin-Untereinheiten an der Front der Zelle wird die Zytoplasmamembran in Bewegungsrichtung vorgeschoben. Am entgegengesetzten Ende der Zelle findet Aktin-Depolymerisation statt. Das gesamte Zytoplasma wandert in die Bewegungsrichtung nach.

Die Integrität des Zytoskeletts, im besonderen der Aktin-Filamente, ist somit wichtig für zelluläre Prozesse wie Adhäsion, Motilität und Bildung der Pseudopodien [28, 29]. Um dieses komplexe System nicht-invasiv untersuchen zu können, wurden zytomagnetometrische Meßmethoden eingesetzt [30, 31].

1.4.2 Phagozytose

Phagozytose ist ein wichtiger Vorgang der Immunantwort bei der Säuberung und Bekämpfung eingedrungener Fremdstoffe. Er gehört zu den Hauptaufgaben der Makrophagen, aber auch anderen Zellen (Neutrophile, T-Zellen). Dadurch werden in den Körper eingedrungene Fremdstoffe aufgenommen und unschädlich gemacht. Für eine weiterführende Immunantwort muß das aufgenommene Antigen in seine Bestandteile zerlegt und geeignet aufbereitet werden („Processing“), um es anderen immunkompetenten Zellen präsentieren zu können. Nur in diesem verarbeiteten Zustand kann das Antigen erkannt und mit der Produktion von spezifischen Antikörpern begonnen werden. Bei den Verdauungsprozessen selbst spielt Tubulin eine wichtige Rolle, denn an seinen Röhren werden die Phagosomen mit dem aufgenommenen Fremdkörper transportiert und das Phagosom mit Verdauungsvakuolen (Lysosomen) verschmolzen.

An der Phagozytose beteiligte Strukturen sind die Aktin-Filamente und damit in Verbindung stehende membranständige Rezeptoren. Bevor ein Fremdkörper phagozytiert werden kann, muß er von der Zelle erkannt und gebunden werden. Dies geschieht über Rezeptoren, die in der Zytoplasmamembran verankert sind und bei Bindung mit einem Liganden ein Signal ins Zellinnere weitergeben, um die Phagozytose einzuleiten. Drei Gruppen von Rezeptoren, die die Phagozytose initiieren können, sind bekannt: die Fc γ -, Komplement- und Scavenger-Rezeptoren [32].

Der Fc γ -Rezeptor ist ein integrales Membranprotein auf Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen Granulozyten, Natürlichen Killerzellen sowie B- und T-Lymphozyten. Sie binden spezifisch Immunglobulin-Moleküle über deren Fc-Teil. Dabei gibt es Rezeptoren für IgG, IgA und IgE, die als Fc γ , Fc α bzw. Fc ϵ bezeichnet werden. Für den Phagozytoseprozeß ist der Fc γ -Rezeptor von Bedeutung. Die Rezeptor-Liganden-Interaktion kann neben der Phagozytose zahlreiche Prozesse auslösen, wie die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Oxidativer Burst), Freisetzung von TNF- α , Aktivierung der Arachidonsäure-Signalkette und andere [33]. Bei der Fc γ -vermittelten Phagozytose polymerisiert das Aktin unterhalb der Zytoplasmamembran derart, daß es die Membran nach oben um den zu phagozytierenden Partikel vorwölbt („Pseudopodien“) und ihn einschließt. Das Vorwölben und Umschließen wird durch weitere Fc γ -Rezeptoren unterstützt, die sukzessive an den Partikel binden und dadurch die Membran dem Partikel entlang führen [34].

Komplement-Rezeptoren (CR) sind ebenfalls integrale Membranproteine, von denen es verschiedene Subtypen gibt. Neben CR-1 (CD35) kommt CR-2 (CD21) vor allem auf B-Lymphozyten vor, CR-3 (CD11b/CD18) kommt auf Monozyten und Makrophagen und CR-4 (CD11c/CD18) hauptsächlich auf Gewebemakrophagen, aber auch auf Monozyten und Neutrophilen Granulozyten vor. Die Rezeptoren erkennen die Komplement-Komponente C3b, welches als Opsonin eingedrungene Fremdkörper markiert. Die Komplement-Kaskade besteht aus neun Proteinen, die mit dem Blutstrom zirkulieren und durch aggregierte Immunglobuline (Immunkomplexe) oder direkten Kontakt von C3b mit Fremdkörpern (Bakterien) aktiviert werden (klassischer und alternativer Weg). In der Mitte dieser Kaskade steht die

Markierung des Fremdkörpers mit C3b oder C4b-Proteinen. Markierte, d.h. opsonierte Fremdkörper werden von den Komplement-Rezeptoren erkannt und die Phagozytose wird eingeleitet. Die Komplement-Rezeptor-vermittelte Phagozytose scheint ein passiverer Prozeß als die Fc γ -vermittelte Phagozytose zu sein. Komplement-opsonierte Partikeln „sinken“ unter Mitwirkung von, wenn überhaupt, kurzen Membranfortsätzen (Pseudopodien) in die Zytoplasmamembran hinein [35].

Die Gruppe der Scavenger-Rezeptoren (SR) ist spezifisch für Liganden wie acetyliertes oder oxidiertes niedermolekulares Lipoprotein (LDL), einige Polysaccharide (z.B. Polyinosinsäure, Dextransulfat) und Lipoteichonsäuren. Daten von Kobzik [36] haben gezeigt, daß die Scavenger-Rezeptoren auch in der Lage sind, nicht opsonierte, urbane Umweltpartikeln, z.B. aus Verbrennungsprozessen, zu binden. Partikeln wie Titandioxid, Eisenoxid, Quarz und der Latex-Partikeln werden über diesen Rezeptor phagozytiert. Die Phagozytose von Titandioxid provoziert als Folgeprozeß einen Oxidativen Burst und die Bildung von TNF- α .

Makrophagen sind in der Lage, bis zum Dreifachen ihres Volumens zu phagozytieren [37]. Die Phagozytosekapazität ist abhängig vom beteiligten Rezeptor und von der Opsonierung des Liganden. Die Verfügbarkeit der Rezeptoren ist nicht limitierend. Das Limit scheint die Verfügbarkeit an Zytoplasmamembran zu sein, die zur Bildung der Phagosomen notwendig ist [37].

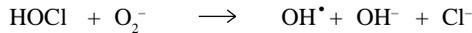
Für die Phagozytose wichtige intrazytoplasmatische Strukturen sind die Aktin- und Mikrotubuli-Filamente. Die Liganden-Rezeptor-Bindung triggert eine gerichtete Polymerisation von Aktin-Filamente, die für die Umschließung des Phagozytosegutes hauptverantwortlich ist. Werden die Aktin-Filamente durch Cytochalasin D zerstört, kann keine Phagozytose mehr stattfinden. In geringerem Umfang sind Mikrotubuli ebenfalls für die Phagozytose notwendig. Zerstörung derselben führt zu einer Reduktion der Phagozytosekapazität (bei Complement-Rezeptor getragener Phagozytose mehr als Fc-getragener) [37]. Dies deshalb, weil die Phagozytose auf eine Mikrotubuli-abhängige Organisation des Zytoplasmas angewiesen ist.

1.4.3 Oxidativer Burst

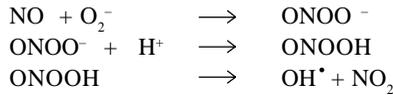
Einige Leukozyten (z.B. aktivierte Makrophagen oder Neutrophile Granulozyten) produzieren nach Stimulation große Mengen Superoxid (O_2^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Durch diese Reaktion werden von den Zellen große Mengen an Sauerstoff (O_2) verbraucht. Für die Bildung der Sauerstoffradikale ist ein Enzymsystem, die NADPH-Oxidase notwendig, die folgende Reaktion katalysiert (Reaktionsgleichungen schematisch):



Wasserstoffperoxid entsteht durch Dismutation von O_2^- . Weitere und reaktivere Sauerstoffradikale wie das Hydroxyl-Radikal (OH^\bullet) entstehen in Leukozyten durch die Reaktion von O_2^- mit hypochloriger Säure (HOCl)



oder Stickstoffoxid (NO).



Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) kann durch die Reaktion von hypochloriger Säure und Wasserstoffperoxid entstehen. Neben diesen kurzlebigen Produkten werden von den Leukozyten auch langlebigere Radikale gebildet [38].

Die NADPH-Oxidase (Abb. 1.5) ist ein Enzymkomplex aus mehreren Untereinheiten, die in ruhenden Zellen dissoziiert sind. Wird die Zelle aktiviert, werden zytoplasmatische Komponenten (p47, Rac-2) und zytoskeletal gebundene Komponenten (p67) mit einem membranständigen Cytochrom b_{558} zu einem funktionsfähigen Enzym zusammengesetzt.

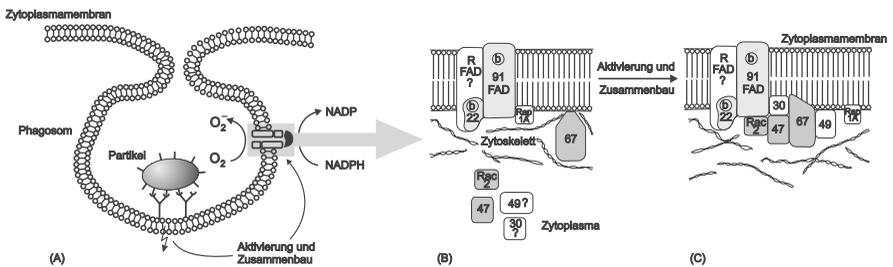


Abb. 1.5 (A) Schematische Darstellung der Zytosolmembran, die sich zu einem Phagosom einstülpt. Der Partikel bindet an mehrere Rezeptoren und verbindet sie dadurch. Dieser als „clustering“ bezeichnete Prozeß löst eine Signalkette aus. Über Aktivierung der Protein-Kinase, Aktivierung anderer Enzyme und Phosphorylierung bestimmter Proteine wird der Zusammenbau der NADPH-Oxidase aus den Untereinheiten ausgelöst. Nach: [32]. (B) In unstimulierten Zellen ist die NADPH-Oxidase nicht aktiv. Ihre Untereinheiten sind in der Zytosolmembran (Cytochrom b_{558} - p91-FAD/p22), dem Zytoplasma (P47/Rac-2) und am Zytoskelett (p67) lokalisiert. Nach [38]. (C) Auf die Stimulierung hin werden die zytoplasmatische und am Zytoskelett haftenden Untereinheiten zur Zytosolmembran verlagert und mit dem Cytochrom b_{558} zum funktionsfähigen Enzym zusammengebaut. Nach [38].

Das Cytochrom b_{558} ist ein Heterodimer aus zwei Untereinheiten mit zwei oder drei Häm-Komponenten und einer Bindekapazität für geringe Mengen an Flavin-adenin-dinucleotid (FAD). Am C-terminalen Ende, das dem Zytoplasma zugewandt ist, sitzt die Bindestelle für NADPH. Helikale Domänen im Protein, in deren Bereich wahrscheinlich die Häm-Gruppen gebunden sind, durchspannen die gesamte Zytosolmembran. Durch diesen transmembranen Kanal werden die vom Elektronendonator NADPH übernommenen Elektronen wahrscheinlich geleitet und auf der extra-zellulären Seite auf O_2 übertragen.

Obwohl Cytochrom b_{558} alle nötigen Bindungsstellen und Redoxsysteme besitzt, um die Elektronenübertragung auf Sauerstoff zu bewerkstelligen, findet keine Produktion von Sauerstoffradikalen statt, bevor nicht p47 und p67 an die Membran transloziert und die Komponenten zusammengesetzt wurden. Über die Rolle, die p47 und p67 bei der Bildung der Sauerstoffradikale spielen, ist noch wenig bekannt. Beide Proteine besitzen Regionen, die für die Bindung an das Zytoskelett verantwortlich sind (SH3-Regionen). p47 hat eine große Anzahl möglicher Phosphorylierungsstellen, u.a. für Proteinkinase C (ein wichtiges regulatorisches Enzym) und mikrotubuliassoziierte Protein-2-Kinase. Es ist sehr wahrscheinlich eine Schlüsselkomponente bei der Regulation des Enzymkomplexes und Anknüpfungspunkt für Signaltransduktionsprozesse [32, 38].

Aus diesen Betrachtungen geht hervor, daß das Zytoskelett eine wichtige Rolle in Abwehrprozessen spielt, die mit der Bildung von Sauerstoffradikalen einhergehen. Komponenten des Zytoskeletts sind wahrscheinlich dafür verantwortlich, daß der NADPH-Oxidase-Enzymkomplex zusammengesetzt und so erst funktionsfähig werden kann [39, 40].

Gerade der höhere Eintrag von Partikeln in die Lunge interferiert mit dem radikalbildenden System. Viele Partikeln, die eingeatmet werden können, sind in der Lage, oxidativen Streß zu induzieren [3, 41, 42]. Einige scheinen darüber hinaus die Fähigkeit zu besitzen, bereits im zellfreien System eine oxidative Eigenschaft zu entfalten [43 - 45], was wahrscheinlich von der Beschaffenheit der Oberfläche des Partikels und seiner Chemie abhängt [46]. Diese zusätzlich in das System eingebrachten Sauerstoffradikale verschieben die Balance zwischen der gewollten Bildung der Radikale im Rahmen einer immunologischen Strategie auf der einen Seite und deren Entgiftung auf der anderen Seite und können so zu einer Schädigung des eigenen Gewebes führen. Deswegen erscheint es notwendig, das oxidative Potential der Partikeln und ihre Wechselwirkung mit sauerstoffradikalbildenden Zellen der Lunge, den Makrophagen und Monozyten, zu untersuchen.

1.4.4 Genexpression

Eingeatmete Partikeln und ihre Folgeprodukte, wie z.B. Sauerstoffradikale (Oxidativer Streß) haben nicht nur einen direkten, oft toxischen Effekt auf die Zellen des Lungengewebes (z.B. Lipidperoxidation), sondern sie greifen auch in intrazelluläre Regulationsmechanismen ein und können die Induktion oder Repression von Genen beeinflussen.

Eine Reihe von Untersuchungen belegen den Zusammenhang von Partikelbelastung der Lunge und Expression von Genen. Driscoll [47] berichtet von einer erhöhten Transkription von TNF- α , einem proinflammatorischen Zytokin, und MIP-2, einem proinflammatorischen chemotaktischen Protein, bei Makrophagen und Bronchial-Epithelzellen der Ratte nach Einwirkung von Quarz und Titandioxid. Dai und Koautoren [48] finden nach Inkubation mit Eisenoxid (Hematit, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) bei Ratten-Tracheal-Explantaten eine erhöhte Genexpression für Proteine, die bei der Differenzierung immunkompetenter Zellen eine Rolle spielen wie „Platelet-derived Growth Factor-A“ (PDGF-A) und „Transforming Growth Factor β_1 “ (TGF β_1). Feines Titandioxid erhöht zudem die Expression der Gene für PDGF-B und „Transforming

Growth Factor α “ (TGF- α). In Alveolarmakrophagen und Neutrophilen Granulozyten von Ratten wird das Gen für die NO-Synthase durch Siliziumdioxid (Silica) und Titandioxid vermehrt exprimiert, bei Neutrophilen Granulozyten zudem nach Einwirken von Kohlenstoffpartikeln.

Neben der chemischen Zusammensetzung des Partikels spielt die Partikelgröße eine wichtige Rolle beim Einfluß auf die Genexpression. Churg und Koautoren [49] verglichen die Wirkung von feinem und ultrafeinem Titandioxid (Durchmesser 120 nm bzw. 20 nm) auf die Induktion von Genexpression bei Ratten-Explantaten. Sie fanden neben einer erhöhten Expression von PDGF-Rezeptor α und β sowie PDGF-A, die beide Partikeln gleichermaßen induzierten, eine erhöhte Induktion des Gens für PDGF und TGF α und β , welche nur das feine TiO₂ induzierte und das Gen Prokollagen, das nur von ultrafeinem TiO₂ induziert wurde.

Die Beeinflussung der Genexpression kann auch indirekt über die Induktion von Sauerstoffradikalen erfolgen. Ein Beispiel für die Induktion von Genen durch Sauerstoffradikale sind proinflammatorisch wirkende Zytokine oder Zell-Adhäsions-Moleküle, deren Expression über redoxsensitive Transkriptionsfaktoren gesteuert werden [50]. Beim Menschen wurden erhöhte Expressionen von TNF- α und Interleukin-6, beides proinflammatorische Zytokine, bei Kohlegrubenarbeitern gefunden, die an einer für diese Berufsgruppe typischen Pneumokoniose erkrankt waren [51].

In der Umwelt kommen keine reinen Partikeln vor. Urbane Partikeln stammen vor allem aus Verbrennungsprozessen (Industrie, Automobile) und sind daher mit Nebenprodukten aus dem Verbrennungsprozeß verunreinigt. Diese Nebenprodukte sind hauptsächlich organische Verbindungen wie aromatische Kohlenwasserstoffe, aber auch Schwermetalle. Zusätzlich zur Genexpression, die reine Partikeln induzieren, zeigen auch die aufgelagerten Stoffe Effekte. Vincent und Mitarbeiter [52] untersuchten mehrere Umweltpartikel aus mehreren Großstädten wie Washington, St. Louis und Ottawa. Da es sich um standardisiertes Referenzmaterial des „National Institute of Standards and Technology“, Washington, USA, handelt, ist bekannt, welche Stoffe, darunter viele polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) und Metallverbindungen, auf deren Oberfläche angelagert sind. Nach Behandlung von humanen Leberzell-Linie HepG2 mit den Partikeln stellten die Autoren eine Expression von Genen fest (z.B. XRE, GSTYa, CYP1A1, HSp70 und HMTIIA), wie sie für PAHs und Schwermetalle wie Kupfer und Cadmium bereits bekannt und typisch sind. Die menschliche Epithelzell-Linie (BEAS-2B) zeigt nach Behandlung mit wäßrigen Extrakten von in der Umgebung einer Stahlhütte gesammelter Partikeln eine erhöhte Expression von IL-6 und IL-8 [53]. Proben aus bestimmten Zeitperioden erwiesen sich als zytotoxisch. Die gemessenen Effekte waren auf den Gehalt an Schwermetallen auf den Partikeln (vor allem Eisen-, Kupfer- und Zink-Ionen) zurückzuführen.

Diese Einzeluntersuchungen zeigen, wie wichtig es ist, eine Vorstellung davon zu bekommen, in welchem Ausmaß die Genexpression durch Umweltpartikel beeinflusst wird. cDNA-Expressions-Arrays bieten die Möglichkeit, eine große Anzahl von Genen auf eine veränderte Expression nach Einwirken von Umweltpartikeln zu untersuchen. Eingetamete

Partikeln kommen in der Lunge mit Alveolarmakrophagen in engen Kontakt, denn sie werden von ihnen phagozytiert. Als Modell für dieses System diente die Mono Mac 6 Zell-Linie. Die getesteten Partikeln (Standard-Diesel-Ruß SRM 1650, SDR; Printex 90, P90; elementarer Kohlenstoff, EC90) sind von hoher Relevanz, denn sie kommen alle in der Umwelt vor und sind in der Literatur gut charakterisiert.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein Beitrag zur Abschätzung des Gefahrenpotentials geleistet werden, das nach dem Einatmen von feinen und ultrafeinen Partikeln in der Lunge ausgeht.

Als *in vitro* Testsystem dienten Zell-Linien (J774A.1 Makrophagen der Maus und humane monozytäre MM6-Zellen) sowie primäre Zellen. Primäre Alveolarmakrophagen vom Menschen, vom Hund und der Ratte wurden durch Bronchoalveoläre Lavage gewonnen. Humane Pleuramakrophagen wurden bei Lungenoperationen durch Pleura-Lavage isoliert. Als direkte Vorläuferzellen der Makrophagen, wurden primäre Monozyten („Peripheral Blood Monocyte Cells“; PBMC) untersucht, die sich leicht aus peripherem Blut isolieren lassen.

Um die in der Natur vorkommenden Partikeln zu simulieren, wurden als Modellpartikeln mit weitgehend bekannten und in der Literatur gut belegten Eigenschaften wie Latex-Partikeln (Polystyrol) und, als biotische Teilchen, das inaktivierte Bakterium *Staphylococcus aureus*, eingesetzt. Als Modell für luftgetragene, feine und ultrafeine Umweltpartikeln kamen folgende Partikeln zum Einsatz: 1. Elementarer, ultrafeiner Kohlenstoff mit (EC90B) und ohne (EC90) Benzo[a]pyren-Belegung, 2. Printex 90 (P90), ein als Toner für Laserdrucker und Kopierer kommerziell vertriebener ultrafeiner Kohlenstoff, 3. Titandioxid (TiO₂) fein und ultrafein, 4. Standard-Diesel-Ruß (SDR), ein vom National Institute of Standards and Technology, USA, zertifiziertem Ruß, der mit bekannten Mengen an organischen Verunreinigungen aus dem Verbrennungsprozeß, wie z.B. Benzo[a]pyren, Benzanthracenen, Pyrenen u.a. belegt ist.

Untersucht wurde die Phagozytose (mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop und dem Durchflußzytometer), der Oxidative Burst (mit durchflußzytometrischen Methoden), die Beeinflussung des Zytoskeletts (mit zytomagnetometrischen Methoden) und die Beeinflussung der Genexpression der Zellen (mit cDNA Expressions-Arrays) nach Inkubation mit den Partikeln.

2. Ergebnisse

2.1 Das Zytoskelett der J774A.1-Mausmakrophagen

Zur Darstellung der Aktin- und Tubulin-Filamente in J774A.1-Mausmakrophagen wurden die Zellen fixiert und die Zytoskelettkomponenten mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin (Aktin) bzw. Antikörpern (Tubulin) markiert.

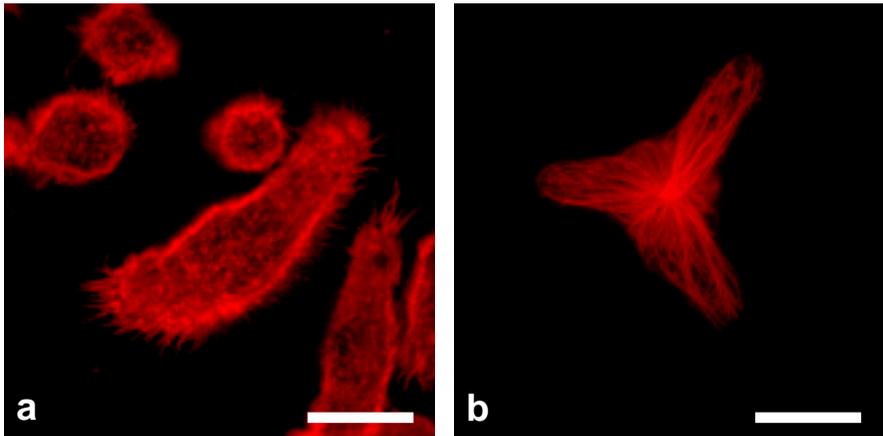


Abb. 2.1 Darstellung der zytoskelettalen Strukturen bei J774A.1-Mausmakrophagen. a) Aktin, markiert mit Rhodamin-markiertem Phalloidin (rot). b) Tubulin, markiert mit TRITC-markiertem monoklonalen Antikörper (rot). Dargestellt sind Schnittbilder durch die Zelle in einer Ebene nahe dem Objektträger. Beschreibung im Text. Maßbalken 10 μm .

Das Aktin bildet vor allem in der Zellperipherie kurz unterhalb der Zytoplasmamembran ein dichtes Geflecht von Filamenten (Abb. 2.1 a). Mit Hilfe von quervernetzenden, aktinbindenden Proteinen bildet es ein dreidimensionales Netzwerk, das auch als Zellrinde bezeichnet wird [19]. Durch Interaktion mit der Zytoplasmamembran sorgen Aktin-Filamente für die Ausbildung unterschiedlicher räumlicher Strukturen wie blattähnlicher Lamellipodien, Membranaus- oder -einstülpungen.

Durch die Vorwölbung von Lamellipodien kann sich die Zelle fortbewegen. In diesem peripheren Bereich, wo der Zellkörper stark abgeflacht ist, sind die Aktin-Filamente radiär ausgerichtet und schieben die Plasmamembran durch ständige Polymerisierung vorwärts. In diesem als Leitsaum bezeichneten Areal (Abb. 2.1 a oberes und unteres Ende der mittleren Zelle) ist der Kontakt der Zelle zum Untergrund über spezielle Kontaktstellen besonders ausgeprägt. Hier findet auch die Krafterzeugung für migratorische Prozesse statt. Mechanismen der Membraneinstülpung sind wichtig bei phagozytotischen Prozessen.

Die Mikrotubuli entspringen einem kernnah gelegenen Mikrotubulus organisierenden Zentrum (MOC), welches auch als Centrosom bezeichnet wird. In Abb. 2.1 b ist das MOC in

der Mitte der sternförmigen Zelle deutlich als dichte rote Region zu erkennen. Die Tubulin-Filamente strahlen von dort nach allen Seiten bis zur Zellperipherie aus. Sie unterstützen die räumliche Gestalt der Zelle und sorgen für intrazelluläre Transportvorgänge, wobei kleine Motorproteine an die zu bewegenden Organellen (z.B. Phagosome) binden und sich entlang der Mikrotubuli wie auf Schienen durch die Zelle bewegen.

Beteiligung des Zytoskelett an der Phagozytose

Makrophagen nehmen ihnen angebotene Bakterien sehr rasch und in großen Mengen in sich auf, um sie aus dem Körpergewebe zu entfernen und unschädlich zu machen. Abb. 2.2 zeigt den Phagozytosestatus bei Aktin-markierten (a) und Tubulin-markierten (b) Zellen nach 2,0 bzw. 2,75 Stunden Inkubation mit Bakterien.

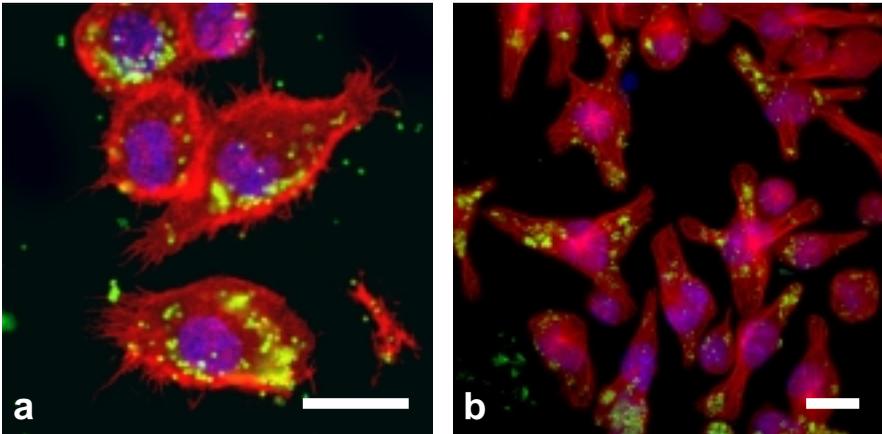


Abb. 2.2 J774A.1-Mausmakrophagen nach Phagozytose von *Staphylococcus aureus* (FITC-markiert, grün). a) Phagozytosedauer 2 Stunden, Aktin-Filamente rot, Zellkern blau. b) Phagozytosedauer 2 Stunden 45 Minuten, Mikrotubuli rot, Zellkern blau. Maßbalken 10 μm .

Der Phagozytoseprozeß hängt von der Integrität des Zytoskeletts ab. Die als Modellnoxe eingesetzten Substanzen Cytochalasin D und Colchicin können selektiv die Aktin (Cytochalasin D) bzw. Tubulinfilamente zerstören und erlauben so, immunologische Konsequenzen (verminderte Phagozytosefähigkeit) aufgrund von Schädigung des Zytoskeletts zu untersuchen.

Wird der Zelle über das Medium Cytochalasin D verabreicht (Abb. 2.3), wird das Aktin depolymerisiert und erscheint im Fluoreszenzbild nicht mehr filamentös. Die Konzentration von 1 μM Cytochalasin D reicht aus (Abb. 2.3 a), um die Phagozytose zu reduzieren bzw. zu stoppen. Abb. 2.3 b zeigt diesen Effekt bei 10 μM Cytochalasin D noch deutlicher. Die ursprüngliche, ausgestreckte Gestalt der Zellen kann nicht mehr aufrechterhalten werden, sie runden sich ab.

Werden die Mikrotubuli durch Colchicin (Abb. 2.4) zerstört, sind im Fluoreszenzbild keine Filamente mehr zu erkennen. Es sind nur noch rot gefärbte, granulöse Bereiche vorhan-

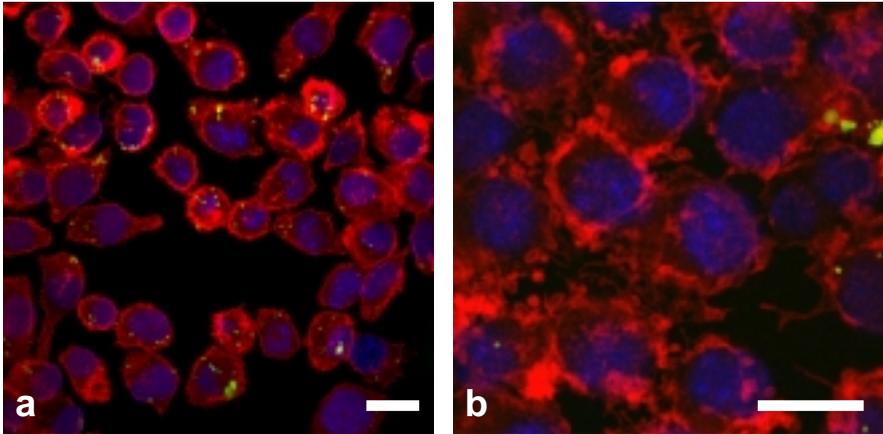


Abb. 2.3 *J774A.1-Mausmakrophagen nach Behandlung mit a) 1 μ M bzw. b) 5 μ M Cytochalasin D (jeweils 30 min) und anschließender Gabe von *Staphylococcus aureus* (FITC-markiert, grün) zur Phagozytose (Phagozytosedauer 2 Stunden). Aktin-Filamente rot, Zellkern blau. Maßbalken 10 μ m.*

den, die aus depolymerisierten Tubulin-Untereinheiten bestehen. Die Phagozytose ist im Gegensatz zur Cytochalasin-Behandlung der Zellen nicht blockiert, wohl aber reduziert. Nach Depolymerisation der Mikrotubuli kommt es zu einem Schrumpfen der Zellen um ca. 20 %.

Abb. 2.5 zeigt die Ergebnisse der Auszählung phagozytierter Bakterien in 170 Zellen. Nach Zerstörung der Aktin-Filamente durch Cytochalasin D ging die Anzahl der phagozytierten Bakterien im Vergleich zu den unbehandelten Zellen um 70 % zurück. Nach Zerstörung der Mikrotubuli durch Colchicin war die Phagozytose praktisch unverändert bzw. nahm nicht mehr als um 5 % ab.

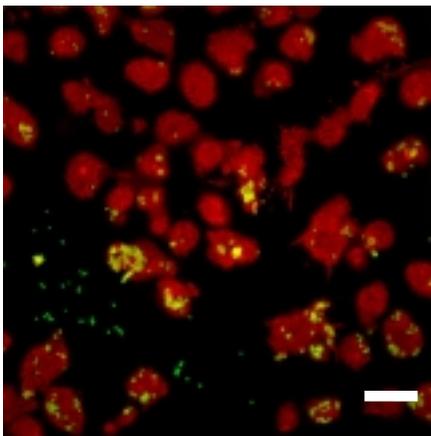


Abb. 2.4 *J774A.1-Mausmakrophagen nach Behandlung mit 10 μ M Colchicin (Inkubation 30 min) und anschließender Gabe von *Staphylococcus aureus* (FITC-markiert, grün) zur Phagozytose (Phagozytosedauer 2 Stunden 45 min). Tubulin-Filamente rot.*

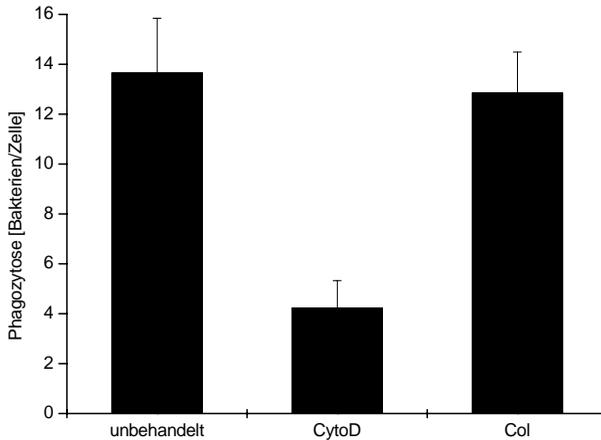


Abb. 2.5 Vergleich der Phagozytose von *Staphylococcus aureus* durch J774A.1-Mausmakrophagen bei unbehandelten Zellen (unbehandelt), bei Zellen, deren Aktin-Filamente durch Cytochalasin D (CytoD) und bei Zellen, deren Mikrotubulifilamente durch Colchicin (Col) zerstört wurden. (MW \pm S.D., n = 3).

2.2 Phagozytose

2.2.1 Kinetik der Phagozytose

Je nach ihren Eigenschaften werden die zu phagozytierenden Partikeln an besondere Oberflächenrezeptoren gebunden und dadurch die Phagozytose eingeleitet. Vom beteiligten Rezeptor wird die Kinetik des Phagozytosevorganges bestimmt.

Polystyrolatex-Partikeln

Abb. 2.6 zeigt an J774A.1-Mausmakrophagen den zeitlichen Verlauf der Phagozytose von fluoreszenten Polystyrolatex-Partikeln. Die Zellen werden sehr rasch stimuliert, die Partikeln aufzunehmen. Bereits nach 30 Minuten haben die Hälfte der Zellen mindestens einen Partikel aufgenommen, nach fünf Stunden praktisch jede Zelle.

Die verwendeten Latex-Partikeln bestehen aus Polystyrol, einem Stoff, der in der „normalen“ Umgebung selten vorkommt und für die Alveolarmakrophagen ein eher xenobiotischen Charakter besitzt. Daß Polystyrolatex-Partikeln dennoch phagozytiert werden können, spricht für die hohe immunologische Potenz der Makrophagen, die mehr oder weniger unspezifische Rezeptoren bereitstellen, über die die Phagozytose xenobiotischer Stoffe stattfinden kann.

Die Kinetik der Phagozytose hängt davon ab, welcher Rezeptor bei der Bindung des Partikels beteiligt ist. Deshalb ist es wichtig, ob im Medium, in dem die Phagozytoseversuche stattfinden, FCS enthalten ist oder nicht. Im Medium befinden sich Komplementfaktoren, die die Partikeln opsonieren (Komplement-Opsonierung), wonach sie über den Komplement-Rezeptor und weniger über andere Rezeptoren phagozytiert werden. Deshalb wurde in den

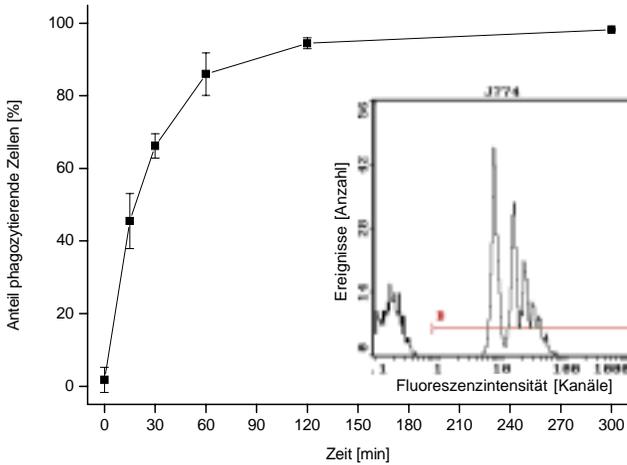


Abb. 2.6 J774A.1-Mausmakrophagen: Phagozytose-Kinetik von (fluoreszenten) Polystyrollatex-Partikeln (Durchmesser 1 μm); $n = 4$, \pm S.D. Die eingesetzte Graphik zeigt ein durchflußzytometrisch ermitteltes Fluoreszenz-Histogramm der Mausemakrophagen mit den phagozytierten Polystyrollatex-Partikeln. Der linke Kurvenverlauf im Histogramm repräsentiert die schwache Eigenfluoreszenz der J774A.1-Zellen. Im rechten Kurvenverlauf repräsentiert jedes Maximum die Zellen, die ein, zwei, drei und mehr fluoreszente Polystyrollatex-Partikeln phagozytiert haben.

Experimenten nur Medium mit hitzeinaktiviertem FCS verwendet, denn durch die Hitzebehandlung lassen sich die Komplementfaktoren inaktivieren.

Vergleichende Untersuchungen der Phagozytose in PBS und in FCS-supplementiertem Medium ergaben keine Unterschiede in der Kinetik.

Bakterien

Bakterien sind Fremdkörper, die häufig in die Lunge eindringen (z.B. über die Atemluft). Mit diesen Partikeln haben sich die Alveolarmakrophagen schon lange in der Evolution befassen müssen, zumal sich unter ihnen oft Krankheitserreger befinden, die zu eliminieren sind. Abb. 2.7 zeigt die Phagozytose-Kinetik von *Staphylococcus aureus* bei J774A.1-Mausmakrophagen.

Innerhalb der ersten 30 Minuten haben 75 % der Mausemakrophagen mindestens eine Bakterienzelle phagozytiert, nach einer Stunde mehr als 90 % der Zellen. Die Phagozytose läuft dabei effizienter ab als mit Polystyrollatex-Partikeln.

2.2.2 Bedeutung des Zytoskeletts für die Phagozytose

Wichtige immunologische Funktionen der (Alveolar-) Makrophagen hängen von der Integrität des Zytoskeletts ab. Durch den Einsatz von Zytoskelett-Giften, die selektiv eine

2. ERGEBNISSE

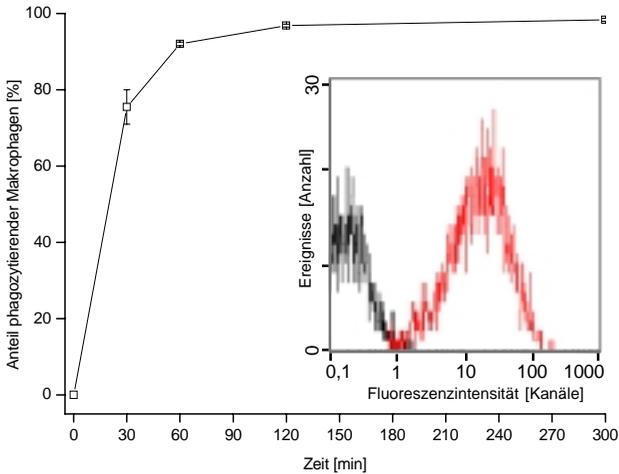


Abb. 2.7 J774A.1-Mausmakrophagen: Phagozytose-Kinetik von (fluoreszenten) *Staphylococcus aureus* (Durchmesser ca. 0,5 μm); $MW \pm S.D.$, $n = 4$. Die eingesetzte Graphik zeigt ein durchflußzytometrisch ermitteltes Fluoreszenz-Histogramm der Mausemakrophagen. Der linke, schwarze Kurvenverlauf im Histogramm repräsentiert die Eigenfluoreszenz der J774A.1-Zellen. Der rechte, rote Kurvenverlauf zeigt den Fluoreszenzanstieg der Zellen durch die phagozytierten Bakterien.

Komponente des Zytoskeletts zerstören (Tab. 2.1), kann ihre Bedeutung im Phagozytose-Prozeß untersucht werden.

| Gift | Zielstruktur | Wirkung | Eingesetzte Konzentration* |
|---------------------------------|--------------|---|----------------------------|
| Cytochalasin D | Aktin | Depolymerisierung des filamentösen Aktins in Untereinheiten | 1 μM |
| Colchiscin | Tubulin | Blockierung des Auf- und Abbauzyklus der Untereinheiten | 10 μM |
| * soweit nicht anders angegeben | | | |

Tab. 2.1 Zytoskelettgifte und ihre Wirkung auf die Zytoskelett-Komponenten Aktin (Mikrofilamente) und Tubulin (Mikrotubuli)

Der Einfluß der Zytoskelttgifte auf die Phagozytose-Eigenschaften wurden für mehrere Zell-Linien bzw. primäre Zellen und für unterschiedliche Partikeln, die zur Phagozytose angeboten wurden, gezeigt. Bei dieser Fragestellung ist es wichtig, zwischen phagozytierten und außen an den Zellen anhaftenden Partikeln unterscheiden zu können. Dies geschieht durch Zugabe von Trypanblau vor der Messung im Durchflußzytometer, wodurch die Fluoreszenz aller Partikeln außerhalb der Zellen überdeckt („gequencht“) wird.

Abb. 2.8 zeigt eine deutliche Wirkung von Cytochalasin D auf die Phagozytose von Polystyrolatex-Partikeln. Bereits mit $1 \mu\text{M}$ Cytochalasin D haben 20 % weniger Zellen zumindest ein Partikel aufgenommen als bei der unbehandelten Kontrolle. Bei $10 \mu\text{M}$ phagozytieren 30 %, bei $20 \mu\text{M}$ 40 % und bei $40 \mu\text{M}$ Cytochalasin D 60 % weniger Zellen.

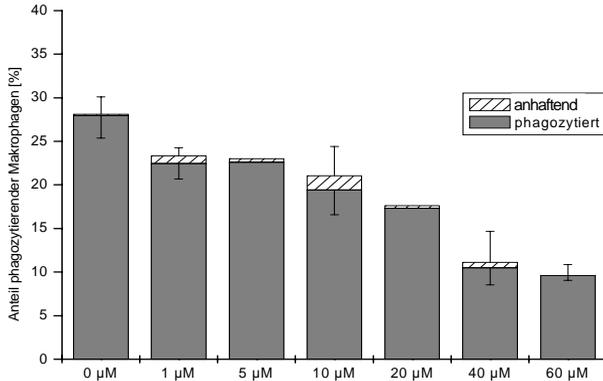


Abb. 2.8 Wirkung von Cytochalasin D auf die Phagozytose von Polystyrolatex-Partikeln bei J774A.1-Mausmakrophagen. Inkubationsdauer 2 Stunden. Die grauen Balken repräsentieren den Anteil der Makrophagen, die Partikeln phagozytiert haben; die schraffierten Balken den Anteil der Makrophagen, denen Partikeln außen an der Zelle anhaften. ($MW \pm S.D.$, $n = 4$; die Fehlerbalken nach unten gehören zu den grauen, die nach oben zu den quergestreiften Balken).

Colchicin hat einen schwächeren Effekt, der zudem nicht konzentrationsabhängig ist (Abb. 2.9). Gegenüber der unbehandelten Kontrolle sinkt der Anteil der phagozytierenden J774A.1-Mausmakrophagen über den getesteten Konzentrationsbereich von 10 - $40 \mu\text{M}$ Colchicin nur um 15 %.

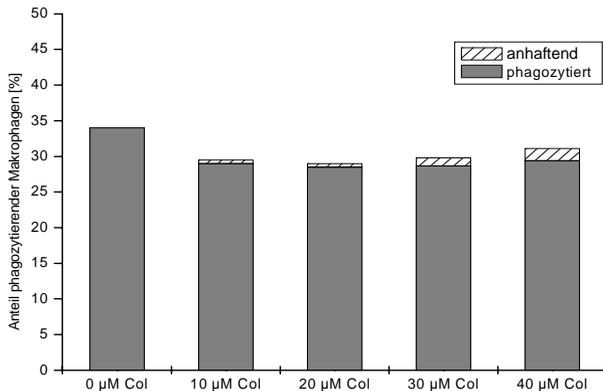


Abb. 2.9 Wirkung von Colchicin auf die Phagozytose von Polystyrolatex-Partikel bei J774A.1-Mausmakrophagen. Inkubationsdauer 2 Stunden. Die grauen Balken repräsentieren den Anteil der Makrophagen, die Partikel phagozytiert haben; die schraffierten Balken den Anteil der Makrophagen, denen Partikel außen an der Zelle anhaften. (Repräsentatives Experiment).

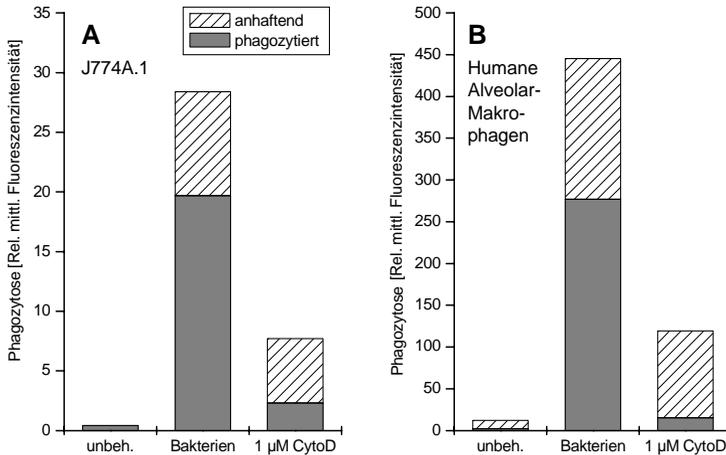


Abb. 2.10 Hemmung der Phagozytose von Bakterien (*S. aureus*) bei A) J774A.1-Mausmakrophagen und B) humanen Alveolarmakrophagen (gewonnen durch bronchoalveoläre Lavage; BAL) durch 1 µM Cytochalasin D; Phagozytosedauer 30 min, Messung mit dem Durchflußzytometer. (Repräsentatives Experiment).

Bei J774A.1-Mausmakrophagen und bei humanen Alveolarmakrophagen, die durch broncho-alveoläre Lavage (BAL) gewonnen wurden, zeigt Cytochalasin D ebenfalls einen phagozytosehemmenden Effekt, wenn den Zellen Bakterien (*S. aureus*) angeboten wurden (Abb. 2.10).

Die Behandlung mit Cytochalasin D verringert die Phagozytose von Bakterien bei J774A.1-Mausmakrophagen um 90 % (A), bei humanen Alveolarmakrophagen um 94 %. Die Abnahme der Phagozytose nach Cytochalasin D-Behandlung ist hochsignifikant. Gezeigt sind zwei typische Einzelexperimente.

Phagozytose von Hammel-Erythrozyten

Nur gealterte und Antikörper-beladene Erythrozyten werden durch Makrophagen phagozytiert, nicht jedoch intakte. Diesen Mechanismus kann man sich für Phagozytoseexperimente zunutze machen, indem man Hammel-Erythrozyten (Sheep red blood cells; SRBC) mit spezifischen Antikörpern markiert, die dann phagozytiert werden. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß durch die Antikörper-Markierung der Rezeptor bestimmt werden kann, über den die Phagozytose stattfindet. In diesem Falle findet sie über den Fc-Rezeptor statt. Im nächsten Kapitel werden wir auf diese Technik zurückkommen.

In den folgenden Experimenten wurden Antikörper-markierte („AK-opsoniert“) Hammel-Erythrozyten (SRBC) zusammen mit Zytoskelettgiften eingesetzt, um die Verknüpfung und damit Abhängigkeit der Fc-Rezeptor-gesteuerten Phagozytose mit dem Aktin-Zytoskelett aufzuzeigen.

Abb. 2.11 zeigt Phagozytose-Experimente am Durchflußzytometer mit AK-opsonierten Hammel-Erythrozyten an menschlichen monozytären Zellen, die Teil der aus dem Blut iso-

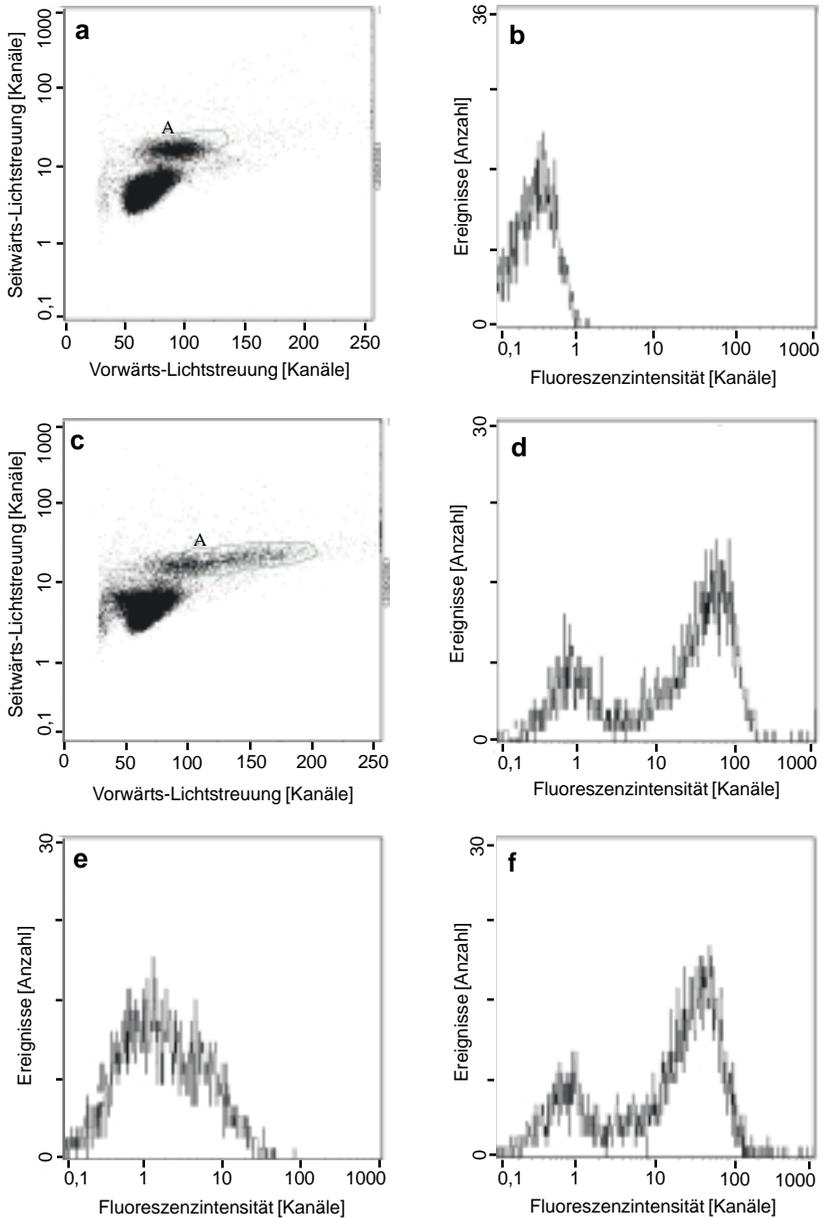


Abb. 2.11 Untersuchung menschlicher peripherer Blutmonozyten (PBMC) im Durchflußzytometer. Bild a und c sind Lichtstreubilder der Zellen. Die Bilder b, d, e und f sind die Fluoreszenz-Histogramme der ausgewählten Zellpopulationen (im Bild a und c durch die grüne Umrandung und die Bezeichnung „A“ zu sehen). Weitere Erklärung im Text.

lierten PBMC (peripheral blood mononuclear cells) sind. Bei gesunden Freiwilligen phagozytieren die Blutmonozyten effektiv große Mengen der Erythrozyten.

In Bild a und Bild c entspricht jeder Punkt einer Zelle, die entsprechend der Granularität ihres Zytoplasmas (Ordinate) und ihrer Größe (Abszisse) aufgetragen ist. Es lassen sich zwei Populationen unterscheiden. Die linke, tiefer liegende Zellwolke stellt Lymphozyten dar, die obere, weiter rechts liegende sind Monozyten. Durch das Setzen von „Gates“ erreicht man eine Auswertung nur dieser Zellen. Die Monozyten sind durch die Region „A“ gekennzeichnet. Vergleicht man die beiden Populationen in den Lichtstreuungsbildern a und c, erkennt man eine Rechtsverschiebung, d.h. die Zellen wurden größer. Den Zellen in c wurden fluoreszenzmarkierte rote Blutkörperchen zur Phagozytose angeboten und durch ihre Aufnahme nimmt das Volumen der phagozytierenden Zellen zu. Vergleicht man die Fluoreszenzbilder b und d korreliert die Aufnahme der Erythrozyten mit einer Zunahme an Fluoreszenz.

Wurden die Monozyten mit dem Aktin-Gift Cytochalasin D vorbehandelt, waren die Zellen nicht mehr in der Lage, die Erythrozyten zu phagozytieren, weshalb sich die Fluoreszenz der Zellen auch nicht erhöhte (Bild e). Das Mikrotubuli-Gift Colchicin hat auf den Phagozytose-Vorgang keinen Einfluß, die Erythrozyten wurden in die Zelle aufgenommen. Dies ist mit einer Zunahme der Fluoreszenz der Zellen verbunden (Bild f), die der der unbehandelten Zellen (Bild b) entspricht.

Abb. 2.12 faßt die Ergebnisse mehrerer Experimente ($n = 5$) von peripheren Blutmonozyten (PBMC) gesunder, freiwilliger Spender zusammen. Cytochalasin D vermindert die Phagozytose von Hammel-Erythrozyten um 80 %; Colchicin dagegen vermindert die Phagozytose praktisch nicht.

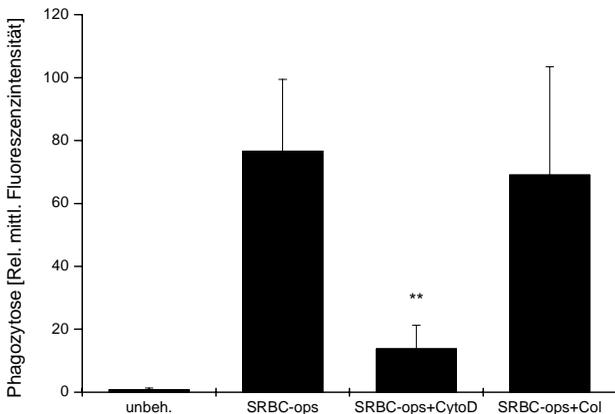


Abb. 2.12 Phagozytose von Antikörper-opsonierten Hammel-Erythrozyten (SRBC-ops) bei peripheren Blutmonozyten von gesunden Spendern. Unbeh. = unbehandelte Kontrollzellen, CytoD = Cytochalasin D, Col = Colchicin. (MW \pm S.D., $n = 5$, ** = $p < 0.01$).

Neben den PBMC gesunder Spender wurden Monozyten von Patienten mit der Diagnose Hyperreagibilität untersucht (Abb. 2.13). Die Ergebnisse wichen nicht weit von denen

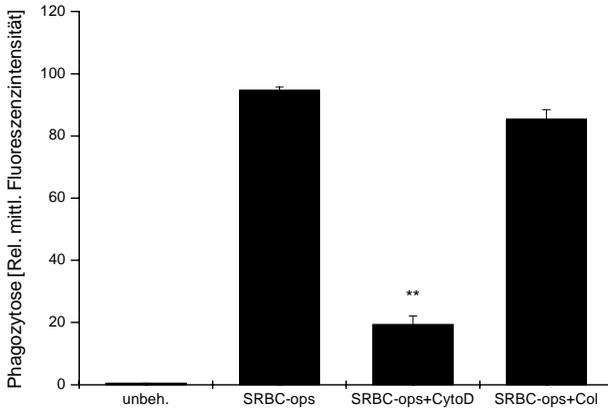


Abb. 2.13 Phagozytose von Antikörper-opsonierten Hammel-Erythrozyten (SRBC-ops) bei peripheren Blutmonozyten von hyperreagiblen Spendern. Unbeh. = unbehandelte Kontrollzellen, CytoD = Cytochalasin D, Col = Colchicin. (MW \pm S.D., n = 2, ** = $p < 0.01$).

gesunder Spender ab. Auch hier verminderte Cytochalasin D die Phagozytose um 80 %, Colchicin um 10 %.

Alveolarmakrophagen verhalten sich entsprechend den peripheren Blutmonozyten. Die gleichen Spender der peripheren Blutmonozyten wurden freiwillig einer bronchoalveolären Lavage (BAL) unterzogen und Alveolarmakrophagen gewonnen. Das Phagozytose-Verhalten und der Einfluß der Zytoskelettgifte auf die Phagozytose ist mit dem der PBMC vergleichbar, wobei die Phagozytosekapazität der humanen Alveolarmakrophagen insgesamt niedriger war (Abb. 2.14). Auch bei Alveolarmakrophagen vermindert die Zerstörung der Aktin-Filamente durch Cytochalasin D die Phagozytose um 80 %. Die Zerstörung der Mikrotubuli durch Colchicin beeinflusste die Phagozytose praktisch nicht.

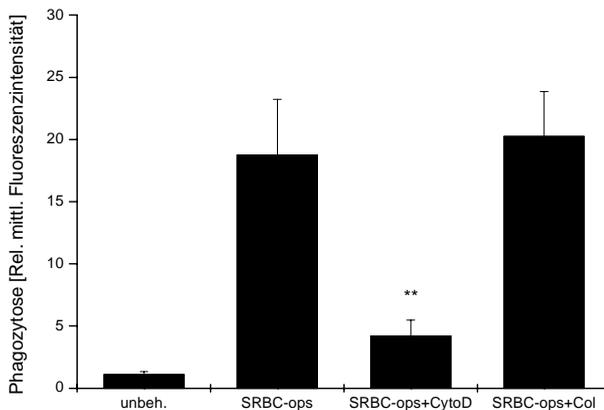


Abb. 2.14 Phagozytose von Antikörper-opsonierten Hammel-Erythrozyten (SRBC-ops) bei humanen Alveolarmakrophagen von gesunden Spendern. Unbeh. = unbehandelte Kontrollzellen, CytoD = Cytochalasin D, Col = Colchicin. (MW \pm S.D., n = 4, ** = $p < 0.01$).

2.2.3 Bedeutung der Oberflächen-Rezeptoren für die Phagozytose

Zur Phagozytose stehen drei wichtige Rezeptor-Klassen zur Verfügung: Fc-Rezeptoren, Komplement- und Scavenger-Rezeptoren. Die effizientesten Rezeptoren, über die die Phagozytose von Antikörper-markierten Partikeln abläuft, sind die Fc-Rezeptoren. Sie unterteilen sich in drei Subklassen: CD16 (Fc- γ RIII), CD32 (Fc- γ RII) und CD64 (Fc- γ RI). Für die Zell-Linie MM6 und primäre humane Alveolarmakrophagen (gewonnen aus BAL) wurde exemplarisch ein durchflußzytometrischer Nachweis der Fc-Rezeptoren durchgeführt (Abb. 2.15). CD14 (LPS-Rezeptor) kommt auf Monozyten und Makrophagen vor und bestätigt den Monozyten-Makrophagen-Charakter der verwendeten Zell-Linie MM6.

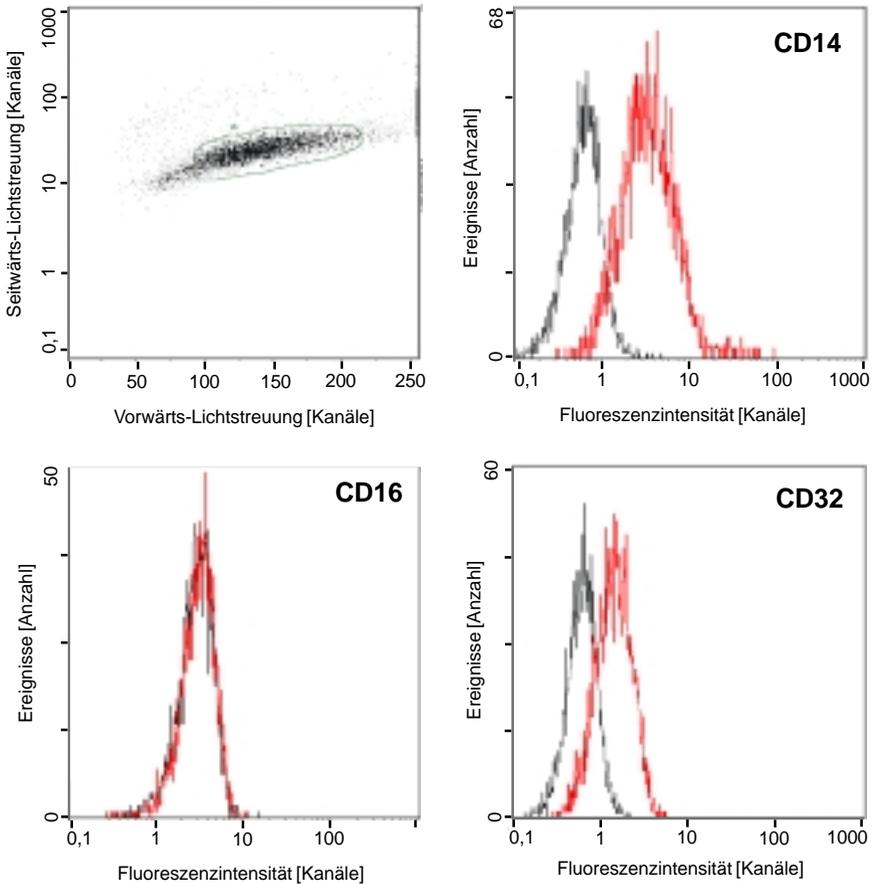


Abb. 2.15 Fortsetzung nächste Seite.

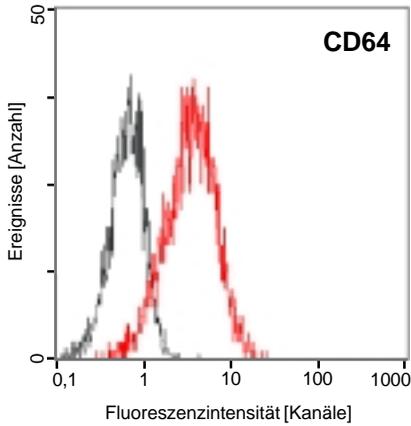


Abb. 2.15 Fortsetzung. Durchflußzytometrische Bestimmung der Oberflächenrezeptoren CD14, CD32 und CD64 bei der MM6 Zell-Linie.

Alveolarmakrophagen

Auf Alveolarmakrophagen gesunder Spender sind CD32 und CD64 die vorherrschenden Fc-Rezeptor-Subtypen (Abb. 2.16).

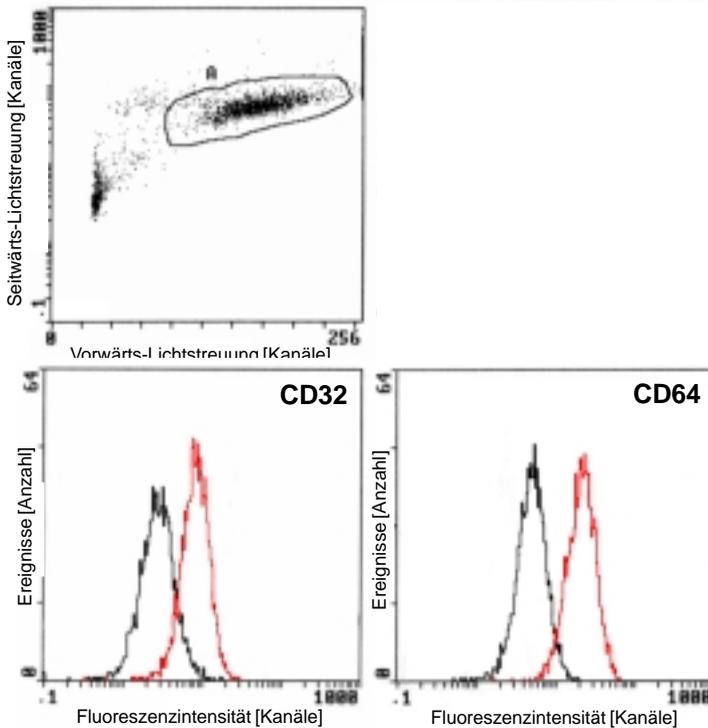


Abb. 2.16 Durchflußzytometrische Bestimmung der Oberflächenrezeptoren CD16, CD32 und CD64 bei humanen Alveolarmakrophagen.

Einfluß der Opsonierung auf die Phagozytose

Vom Immunsystem können Fremdstoffe mit körpereigenen Faktoren markiert werden, um sie für phagozytierende Zellen besser „sichtbar“ zu machen. Diese Markierung nennt man Opsonierung. Grundsätzlich lassen sich zwei Opsonierungen unterscheiden, je nach dem „Faktor“, der dafür eingesetzt wird. Werden Fremdstoffe mit niedermolekularen Eiweiß-Stoffen, dem Komplement, markiert, spricht man von Komplement-Opsonierung. Handelt es sich um hochmolekulare Antikörper, spricht man analog von Antikörper-Opsonierung.

Die markierten Fremdstoffe werden über spezialisierte Oberflächenrezeptoren erkannt und über sie wird die Phagozytose eingeleitet. Komplement-opsonierte Fremdstoffe werden vom Komplement-Rezeptor erkannt, Antikörper-opsonierte vom Fc-Rezeptor. Auch für unmarkierte oder unmarkierbare Fremdstoffe gibt es Rezeptoren, z.B. den Scavenger-Rezeptor. Die Effizienz der Phagozytose hängt vom Rezeptor ab, über den die Partikel aufgenommen werden.

Für „biologische“ Partikeln wie z.B. Bakterien gibt es spezifische Antikörper, mit denen man die Opsonierung durchführen kann. Für Partikeln, gegen die es keine direkten Antikörper gibt, wie bei Polystyrolatex-Partikeln, behilft man sich mit einem Trick. Zuerst werden die Polystyrolatex-Partikeln mit Rinder-Serum-Albumin (BSA) beschichtet und dann mit einem gegen das BSA gerichteten Antikörper (Anti-BSA) markiert. Die so opsonierten Polystyrolatex-Partikeln werden vom Fc-Rezeptor erkannt und schneller phagozytiert als „nackte“ Polystyrolatex-Partikeln, die über den Scavenger-Rezeptor aufgenommen werden (Abb. 2.17).

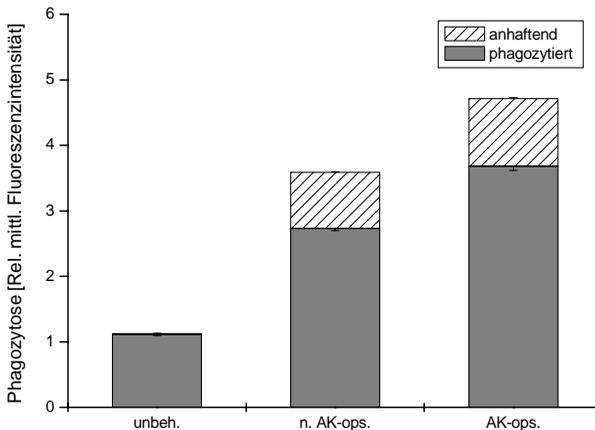


Abb. 2.17 Phagozytose von Polystyrolatex-Partikeln bei J774A.1-Mausmakrophagen. unbeh. = unbehandelte Zellen, n. AK-ops. = nicht Antikörper-opsonierte Polystyrolatexpartikel, AK-ops. = Antikörper-opsonierte Latexpartikel. MW \pm S.D., N = 2. Die Fehlerbalken nach unten geben die Standardabweichung für die phagozytierten Partikeln an, der Fehlerbalken nach oben die der anhaftenden Partikeln. Phagozytosedauer 30 min; repräsentatives Experiment.

Abb. 2.18 zeigt den Unterschied der phagozytierten Menge an nicht AK-opsonierten bzw. AK-opsonierten Bakterien (*S. aureus*) bei J774A.1-Mausmakrophagen. Auch für Bakte-

rien ließ sich bestätigen, daß opsonierte Partikeln effektiver aufgenommen wurden als nicht opsonierte. Die Zellen wurden zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Nach 30 Minuten Phagozytose ist bereits die effektivere Aufnahme über den Fc-Rezeptor zu erkennen. Die schraffierten Balken zeigen die Menge an Partikeln, die an der Zelle wahrscheinlich am Rezeptor anhaften, um phagozytiert zu werden. Nach 13 Stunden ist der Unterschied in der Aufnahmeeffektivität von nicht opsonierten zu opsonierten Bakterien deutlicher. Der Anteil der außen an der Zelle haftenden Bakterien ist geringer, da sie zwischenzeitlich aufgenommen wurden.

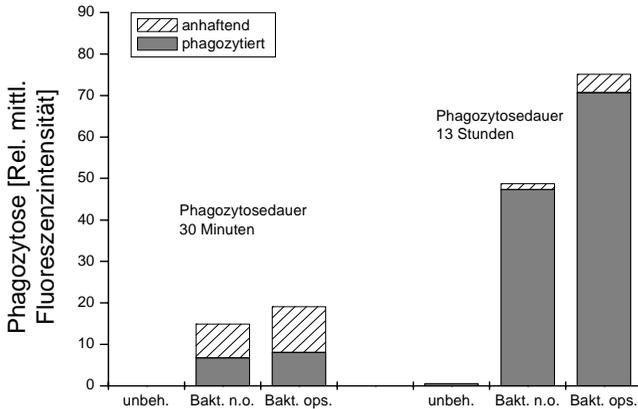


Abb. 2.18 Phagozytose von Bakterien bei J774A.1-Mausmakrophagen. unbeh. = unbehandelte Zellen, Bakt. n.o. = nicht Antikörper-opsonierte Bakterien, Bakt. ops. = Antikörper-opsonierte Bakterien. Repräsentatives Experiment.

Aus den obigen Daten und aus der mittleren Fluoreszenz der Bakterien sowie der Anzahl der eingesetzten Zellen und Bakterien kann man rechnerisch weitere Größen ermitteln, wie sie in Tab. 2.2 zusammengefaßt sind. Auch hier wird die höhere Effizienz des Fc-Rezeptors bei der Phagozytose gegenüber den nicht opsonierten Bakterien deutlich.

| | | Phagozytierende Zellen [%] | Nicht phagozytierende Zellen [%] | Phagozytierte Partikeln pro Zelle |
|-----------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Phagozytose 30 min | Bakterien nicht AK-opsoniert | 7,2 | 92,8 | 1,21 |
| | Bakterien AK-opsoniert | 16,0 | 84,0 | 1,26 |
| Phagozytose 13 h | Bakterien nicht AK-opsoniert | 95,7 | 4,3 | 4,24 |
| | Bakterien AK-opsoniert | 97,4 | 2,6 | 6,03 |

Tab. 2.2 Unterschiedliche Phagozytose-Effizienz von nicht opsonierten und AK-opsonierten Bakterien (*S. aureus*) bei J774A.1-Mausmakrophagen.

Die mit J774A.1-Mausmakrophagen gewonnenen Ergebnisse konnten mit der humanen monozytären Makrophagen-Zell-Linie MM6 bestätigt werden. Abb. 2.19 zeigt die höhere Phagozytose der AK-opsonierten Bakterien nach 2,5- stündiger Inkubation. Von den nicht

opsonierten Bakterien wurden durchschnittlich 2,8 pro Zelle aufgenommen, von den AK-opsonierten Bakterien durchschnittlich 11 pro Zelle.

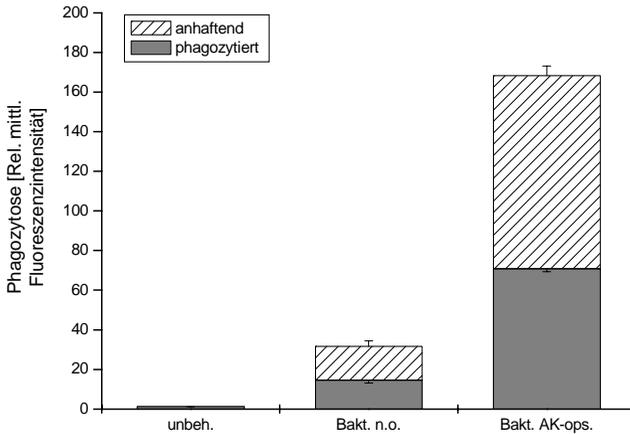


Abb. 2.19 Phagozytose von Bakterien (*S.aureus*) bei MM6. unbeh. = unbehandelte Zellen, Bakt. n.o. = nicht-Antikörper-opsonierte Bakterien, Bakt. AK-ops. = Antikörper-opsonierte Bakterien. (MW ± S.D., n = 3; die Fehlerbalken nach unten geben die Standardabweichung für die phagozytierten Partikeln an, der Fehlerbalken nach oben die der anhaftenden Partikeln). Phagozytosedauer: 2,5 h.

Nach 16-stündiger Phagozytose wird wie im Versuch mit J774A.1 auch bei den MM6-Zellen der Unterschied zwischen nicht opsonierten und AK-opsonierten Bakterien stärker deutlich. Nach zweistündiger Inkubation beträgt das Verhältnis der Phagozytose von nicht opsonierten zu AK-opsonierten Bakterien 1 : 4, nach 16-stündiger Inkubation annähernd 1 : 10.

Bei Hammel-Erythrozyten ist der Effekt der Opsonierung besonders gut zu beobachten. Bei MM6-Zellen als auch bei J774A.1-Zellen ist keine Phagozytose der nicht opsonierten Erythrozyten zu beobachten. Erst nach AK-Opsonierung werden die roten Blutkörperchen phagozytiert (Abb. 2.20).

Rezeptorstudien

Durch Opsonierung der Partikeln mit Antikörpern ist es möglich, die Phagozytose der Partikeln so zu steuern, daß sie hauptsächlich über den Fc-Rezeptor abläuft. Die Aufnahme über den Scavenger-Rezeptor konnte damit nicht näher untersucht werden. Dies wird möglich, wenn man Reagenzien einsetzt, die mit diesem Rezeptortyp interagieren. Polyinosinsäure (PIS) und Dextransulfat (DexS) sind Substanzen, die an den Scavenger-Rezeptor binden. Gibt man sie im Überschuß zum Kulturmedium, blockieren sie den Rezeptor für andere Substanzen (kompetitive Hemmung).

Abb. 2.21 und 2.22 zeigen die Ergebnisse der Phagozytoseversuche an Beagle-Alveolar-makrophagen. Es wurde mit dem Einsatz der nicht opsonierten und AK-opsonierten Bakterien, Cytochalasin D und Colchicin geprüft, ob die Zellen wie erwartet reagieren.

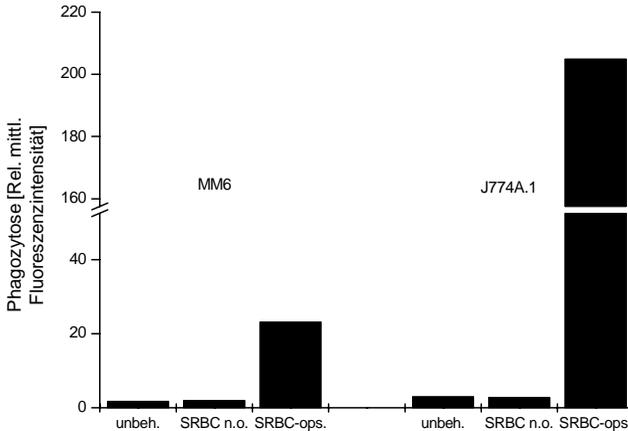


Abb. 2.20 Phagozytose von Hammel-Erythrozyten (SRBC) bei MM6 und J774A.1. unbeh. = unbehandelte Zellen, SRBC n.o. = nicht opsonierte SRBC, SRBC-ops. = AK-opsonierte SRBC. Repräsentatives Experiment.

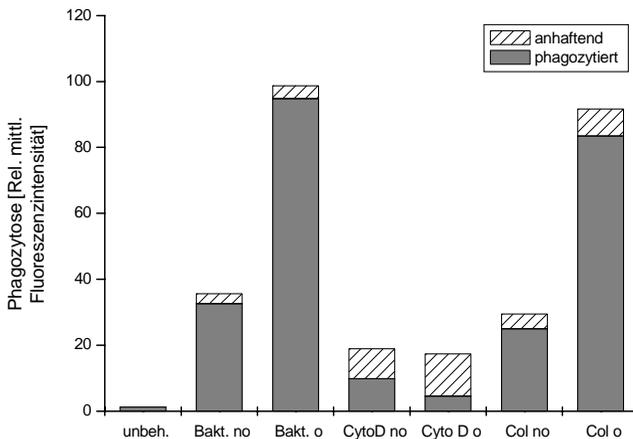


Abb. 2.21 Phagozytose von Bakterien (*S. aureus*) bei Beagle-Alveolarmakrophagen. unbeh. = unbehandelte Zellen, n.o. = nicht opsoniert, o = AK-opsoniert, CytoD = Cytochalasin D, Col = Colchicin. Inkubationsdauer 30 Minuten; repräsentatives Experiment.

AK-opsonierte Bakterien werden über den Fc-Rezeptor fast dreimal effizienter phagozytiert als nicht opsonierte Bakterien (Abb. 2.21). Wurden die Alveolarmakrophagen mit Cytochalasin D und Colchicin vorbehandelt, verringerte sich die Phagozytose bei nicht opsonierten Bakterien um 70 % (für CytoD). Bei Colchicin wurde die Phagozytose nur unwesentlich reduziert (23 %). Wurden AK-opsonierte Bakterien zur Phagozytose angeboten, verminderte sich die Aufnahme der Bakterien bei CytoD-vorbehandelten Zellen um 95 %, bei Col-vorbehandelten um 12 %. Der Anteil der Bakterien, die an der Außenseite der Zellen anhaften, steigt nach Behandlung mit CytoD und Col, da die Zelle nicht mehr effektiv phagozytieren kann. Die Ergebnisse korrelieren gut mit denen im vorigen Kapitel erhobenen Daten mit anderen Zellen.

In Abb. 2.22 sind die Rezeptor-Blockierungsversuche zusammengefaßt und zum Vergleich nochmal die ungehinderte Phagozytose von nicht opsonierten bzw. AK-opsonierten Bakterien aufgeführt.

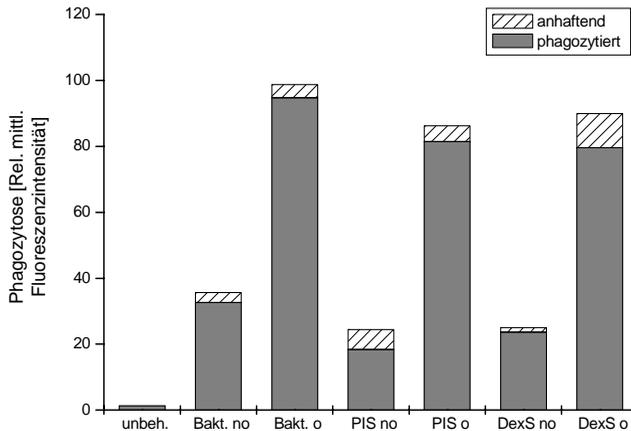


Abb. 2.22 Phagozytose von Bakterien (*S. aureus*) bei Beagel-Alveolarmakrophagen. unbeh. = unbehandelte Zellen, n.o. = nicht opsoniert, o = AK-opsoniert, PIS = Polyinosinsäure, DexS = Dextransulfat. Inkubationsdauer 30 Minuten; repräsentatives Experiment.

Werden nicht opsonierte Bakterien phagozytiert, vermindert Polyinosinsäure (PIS) die Aufnahme um 43 %. Weniger blockierend ist Dextransulfat (DexS), das nur zu einer 27 %igen Verminderung der Phagozytose führt. Bei opsonierten Bakterien wird die Phagozytose durch PIS um 14 % vermindert, durch DexS um 11 %.

Bei peripheren Blutmonozyten gesunder Spender vermindert PIS die Phagozytose nicht opsonierter Bakterien im Mittel um $85 \% \pm 6$ (MW \pm S.D., n = 3). Bei opsonierten Bakterien schwankt die Verminderung der Phagozytose zwischen 20 und 60 %.

2.3 Oxidativer Burst

Nach Aufnahme von Fremdstoffen über den Fc- oder Komplement-Rezeptor werden in den Zellen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) produziert. Sie dienen zur Vernichtung der aufgenommenen Partikeln. Dieser Vorgang wird als Respiratorischer oder Oxidativer Burst bezeichnet. Von anderen Rezeptoren ist bekannt, daß nach ihrer Stimulation nur ein geringer oder kein Oxidativer Burst ausgelöst wird.

Das ROS-produzierende Enzymsystem ist fein gesteuert, damit im Zusammenspiel mit den antioxidativen Systemen in der Zelle (z.B. Glutathion-System) das Redoxgleichgewicht erhalten bleibt. Bei Störungen dieses Gleichgewichtes kann nicht nur die Zelle selbst, sondern auch das umliegende Gewebe geschädigt werden.

Oxidativer Burst ausgelöst von PMA, LPS oder Bakterien (*S. aureus*)

Der folgende Abschnitt gibt eine Übersicht über die Charakteristik des Oxidativen Bursts bei verschiedenen Zelltypen (Zell-Linien als auch primäre Zellen). In Abb. 2.23 ist der Oxidative Burst von J774A.1, humanen PBMC und humanen Pleuramakrophagen, die mit Phorbol-Myristat-Acetat (PMA, ein Phorbolster) stimuliert wurden, sowie von MM6 und humanen PBMC, die mit Lipopolysacchariden (LPS) aus der Zellwand von Bakterien stimuliert wurden, aufgetragen.

Die Stimulation mit PMA erweist sich als effektiv, da der Phorbolster direkt die Proteinkinase C (PKC) stimuliert, die bei der Initiierung des Oxidativen Bursts eine wichtige Rolle spielt. Für LPS besitzen die Zellen einen eigenen Rezeptor, über den durch Signaltransduktion ebenfalls die Bildung von radikalen Sauerstoffspezies ausgelöst wird. Es ist zu beobachten, daß primäre Zellen stärker reagieren als die Zell-Linien (J774A.1 und MM6).

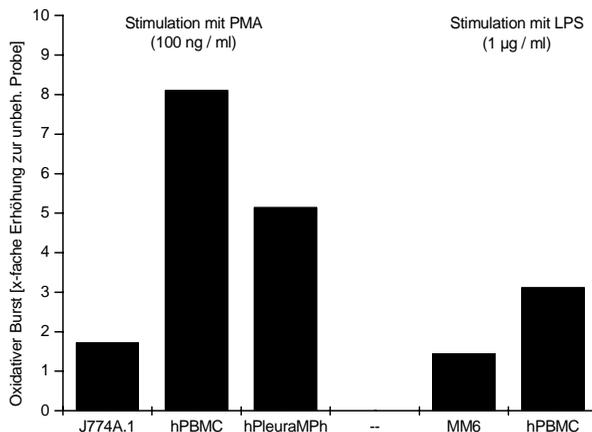


Abb. 2.23 Stärke des Oxidativen Bursts bei verschiedenen primären Zellen und Zell-Linien nach Stimulation mit PMA bzw. LPS. h = human MPh = Makrophage. Inkubationsdauer 20 Minuten; repräsentatives Experiment.

Einfluß des Zytoskeletts auf den Oxidativen Burst

Die NADPH-Oxidase ist ein Enzymsystem, das zur Produktion von ROS notwendig ist. Es besteht aus mehreren Untereinheiten, die erst nach Aktivierung zusammengesetzt werden, wobei Aktinfilamente eine Rolle spielen. Werden die Aktinfilamente mit dem Zytoskelettgift Cytochalasin D (CytoD) zerstört, müßten Auswirkungen auf die gebildete Menge an ROS nachzuweisen sein.

Humane PBMC wurden zur Kontrolle mit CytoD und Col behandelt, um auszuschließen, daß die beiden Substanzen in unserem Testsystem von sich aus einen Burst auslösen. Die Ergebnisse in Abb. 2.24 zeigen, daß von der Inkubation der Zellen mit den Zytoskelettgiften keine Bildung von ROS ausgelöst wird. Werden die Zellen durch Stimulation mit PMA zum Burst angeregt, bilden sie im Vergleich zu ruhenden Zellen die etwa sechsfache Menge an ROS. Wurden die Zellen zuvor mit CytoD inkubiert und damit die Aktinfilamente zerstört, war der Burst um 20 % tendenziell vermindert. Waren die Mikrotubuli der Zellen zerstört (Vorbehandlung mit Col), war der Burst tendenziell um 15 % erhöht. Diese Daten weisen darauf hin, daß die Aktinfilamente an der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt sind.

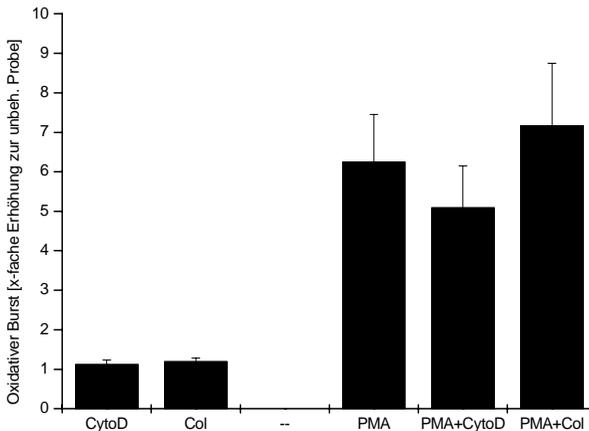


Abb. 2.24 Stärke des Oxidativen Burst bei humanen PBMC nach Stimulation mit Zytoskelettgiften, PMA und der Kombination beider. Inkubationsdauer 20 Minuten. (MW \pm S.D., n = 4).

Einfluß der Phagozytose von Teilchen auf den Oxidativen Burst

Es wurde geprüft, ob Teilchen, die die Zellen phagozytotisch aufnehmen, einen Oxidativen Burst auslösen. Dazu wurden humane PBMC mit PMA bzw. ultrafeinem Kohlenstoff (ufEC90) inkubiert. Die Partikeln sind ein Modell für die Belastung der Atemluft mit urbanen Umweltpartikeln. Partikeln mit sehr kleinem Durchmesser stehen dabei besonders im Mittelpunkt des Interesses, da diese Fraktion in den in der Umwelt vorkommenden Partikeln ständig zunimmt. Printex 90 (P90) und elementarer Kohlenstoff (EC90) dienen als Modell für diese Umweltpartikeln.

PMA dient als Kontrollsubstanz, die einen Oxidativen Burst durch Stimulation der Proteinkinase C auslöst (Abb. 2.25). Printex 90 und EC90 wurden in unterschiedlichen Kon-

zentrationen eingesetzt. 10 µg/ml P90 löst einen halb so hohen Burst aus wie PMA. Bei 32 bzw. 100 µg/ml P90 entsteht eine hohe Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies, die um das 2,7- bzw. 3-fache höher liegt als bei PMA.

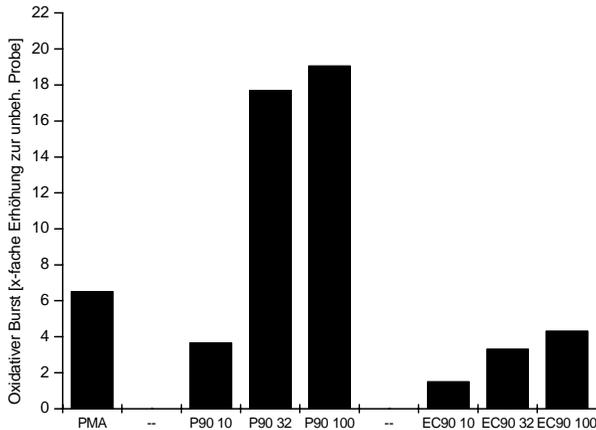


Abb. 2.25 Oxidativer Burst bei humanen PBMC nach Stimulation mit Printex 90 (P90) und elementarem Kohlenstoff (EC90). Die Zahlen hinter den Partikelbezeichnungen nennen ihre Konzentration in µg/ml Zellkulturmedium. Inkubationsdauer 20 Minuten; repräsentatives Experiment.

Humane Pleura-Makrophagen reagieren im vergleichbaren Maße auf PMA mit der Bildung von ROS wie die humanen PBMC (Abb. 2.26). Ihre Reaktion auf Partikeln übersteigt im Falle von P90 nicht die von PMA. EC90 löst nur eine geringe Bildung von ROS aus.

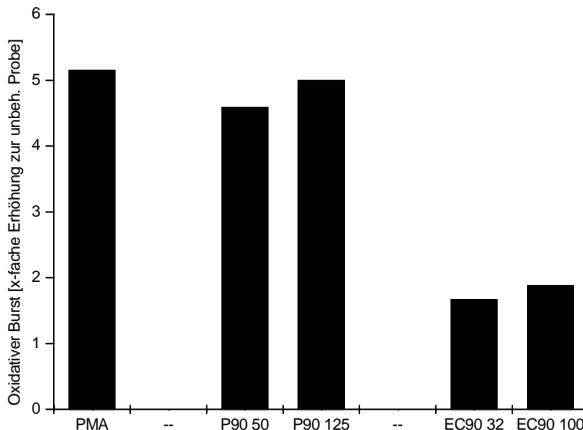


Abb. 2.26 Oxidativer Burst bei humanen Pleuramakrophagen nach Stimulation mit Printex 90 (P90) und elementarem Kohlenstoff (EC90). Die Zahlen hinter den Partikelbezeichnungen nennen ihre Konzentration in µg/ml Zellkulturmedium. Inkubationsdauer 20 Minuten; repräs. Exp.

Ratten-Alveolarmakrophagen

Männlichen WKY-Ratten wurden Suspensionen ultrafeiner Kohlenstoffpartikeln (EC30, EC90, P90) in die Lunge instilliert. Nach 24 Stunden wurden die Tiere lavagiert, um die Alveolarmakrophagen zu gewinnen. Diese Makrophagen wurden auf Stimulierbarkeit des Oxidativen Bursts durch verschiedenen Substanzen getestet.

Die Partikeln bzw. das LPS wurden in A. dest gelöst und dieses Volumen (200 µl) in die Lunge instilliert und die Tiere nach 24 h lavagiert. Abb. 2.27 und 2.28 zeigen, wie die Alveolarmakrophagen der behandelten Tiere *in vitro* auf Stimuli des Oxidativen Bursts reagieren.

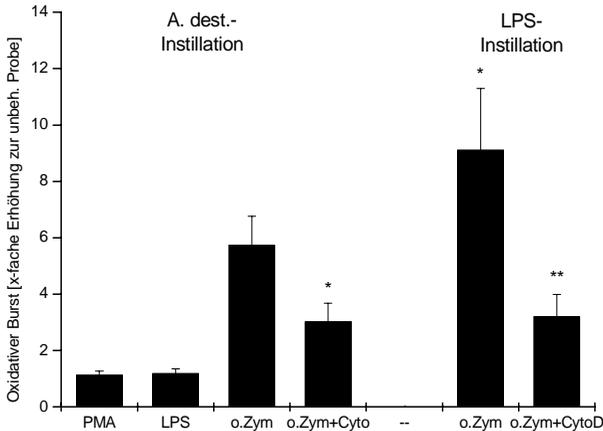


Abb. 2.27 Oxidativer Burst bei Alveolarmakrophagen von WKY-Ratten, die 24 Stunden nach Instillation von A. dest bzw. LPS (50 µg/kg Körpergewicht) durch Lavage gewonnen wurden. Inkubationsdauer 30 Minuten. (MW ± S.D., n = 4, * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01).

24 Stunden nach Instillation von A. dest reagieren die Ratten-Alveolarmakrophagen schwach auf PMA und LPS (Abb. 2.27). Es findet praktisch keine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies im Vergleich zu ruhenden Zellen (auf die normiert wurde) statt. Opsoniertes Zymosan dagegen ist ein potenter Stimulus. Da es aus Zellwandbestandteilen der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) besteht, ist Zymosan ein Modell für das Eindringen von Hefen in die Lunge und damit für eine Entzündungsreaktion. Die Makrophagen erhöhen die Bildung von ROS um den Faktor 6. Wurden die Makrophagen vor der Gabe von opsoniertem Zymosan mit CytoD vorinkubiert, d.h. die Aktinfilamente zerstört, sank die Bildung von ROS um 50 % (p ≤ 0,01). Die Daten zeigen einen deutlichen Beitrag von Aktinfilamenten an der Zymosan-induzierten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies.

Bei Alveolarmakrophagen, die 24 Stunden nach Induktion einer Entzündungsreaktion durch die Instillation von LPS gewonnen wurden, reagieren die Zellen mit einer um 60 % höheren Bildung von ROS nach Stimulation mit opsoniertem Zymosan als die Zellen nach A. dest.-Instillation (p ≤ 0,05). Werden die LPS-vorbehandelten Makrophagen wiederum mit CytoD vorinkubiert, reduziert sich die Bildung von ROS um 65 % gegenüber der nicht mit CytoD vorinkubierten Probe (p ≤ 0,01).

Nach Instillation von ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln (EC30, EC90 und P90) und Gewinnung der Alveolarmakrophagen 24 Stunden danach wurden die in Abb. 2.28 zusammengefaßten Stimulationsexperimente durchgeführt.

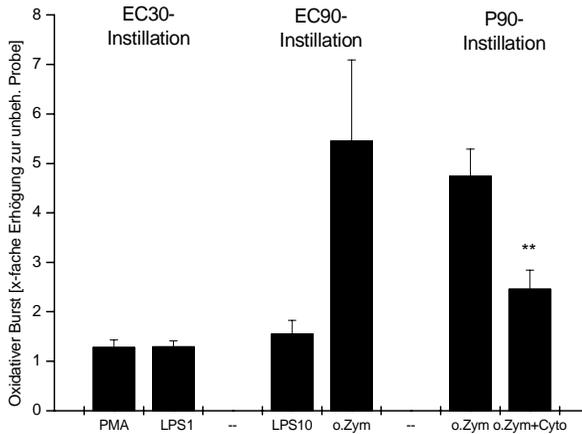


Abb. 2.28 Oxidativer Burst bei Alveolarmakrophagen von WKY-Ratten, die 24 Stunden nach Instillation von EC30, EC90 und P90 (jeweils 320 µg in 200 µl A. dest. pro Tier) durch Lavage gewonnen wurden. LPS10 = 10 µg/ml gegenüber LPS1 = 1 µg/ml. Inkubationsdauer 30 Minuten. (MW ± S.D., n = 4 bis 5, ** p ≤ 0,01).

Nach EC30-Instillation konnte bei Ratten-Alveolarmakrophagen keine veränderte Reaktion bei der Produktion von ROS nach Stimulation mit PMA und LPS nachgewiesen werden. Ebensovienig nach EC90-Instillation und Stimulation mit LPS (10 µg/ml, das zehnfache der herkömmlichen Dosis) oder opsoniertem Zymosan. Auch nach P90-Instillation war kein verändertes Burst-Verhalten der Alveolarmakrophagen nach Stimulation mit opsoniertem Zymosan und der Kombination von Zymosan und CytoD feststellbar. Der Rückgang der Burst-Aktivität durch Inkubation mit CytoD und nachfolgender Stimulation mit opsoniertem Zymosan war hochsignifikant ($p \leq 0.01$).

Einfluß von Lungenerkrankungen auf die ROS-Bildungskapazität von Alveolarmakrophagen

Bei Patienten, die unter einem Gerüstprozeß oder einer Fibrose der Lunge leiden, besteht ein chronischer Entzündungsprozeß, bei dem das normale Abwehrverhalten der Alveolarmakrophagen verändert ist. Es liegt die Vermutung nahe, daß die Alveolarmakrophagen auch beim Umgang mit eingeatmeten partikulären Fremdstoffen ein verändertes Muster bei der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies zeigen. In weiterer Konsequenz hieße das ein verändertes Verhalten der Makrophagen auch gegenüber eingedrungenen bakteriellen Erregern.

Es wurden Alveolarmakrophagen, die von gesunden Freiwilligen und Patienten durch bronchoalveoläre Lavage (BAL) gewonnen wurden, im Bezug auf ihre Fähigkeit zur Bildung von ROS nach Stimulation mit PMA und EC90-Partikeln miteinander verglichen.

2. ERGEBNISSE

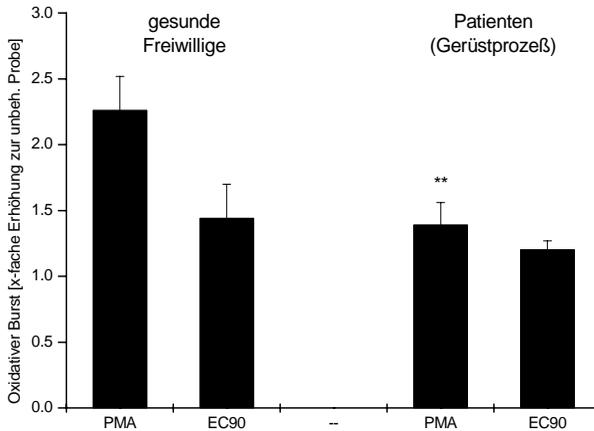


Abb. 2.29 Oxidativer Burst bei Alveolarmakrophagen von gesunden Freiwilligen und von Patienten (Diagnose: Gerüstprozeß/Fibrose), die durch bronchoalveoläre Lavage (BAL) gewonnen wurden. Stimulation mit PMA (100 ng/ml) und EC90 (50µg/ml). Inkubationsdauer 20 Minuten. (MW ± S.D., n = 3, ** p ≤ 0,01)

Abb. 2.29 zeigt, welche Mengen ROS von Alveolarmakrophagen gesunder Freiwilliger und von Patienten nach Stimulation mit PMA und EC90 gemessen wurden.

Nach Stimulation mit PMA reagierten die Alveolarmakrophagen gesunder Spender mit einer Verdoppelung ihrer Burst-Aktivität. Verglichen mit PMA war EC90 ein schwächerer Stimulus; die Bildung von ROS erhöhte sich gegenüber der unbehandelten Probe nur um den Faktor 1,5. Bei Alveolarmakrophagen von Patienten, die an einem Lungengerüstprozeß leiden, scheint die Stimulierbarkeit der Zellen herabgesetzt. Während bei EC90 nur geringfügig weniger ROS gemessen wurde, konnte für PMA eine hochsignifikant niedrigere Bildung von ROS nachgewiesen werden ($p \leq 0,01$).

Zusammenfassend sei erwähnt, daß feine und ultrafeine TiO_2 -Partikeln keinen oder nur einen geringen Oxidativen Burst auslösen. Demgegenüber provoziert der ultrafeine Kohlenstoff-Partikeln P90 einen sehr starken Burst, der ebenfalls ultrafeine Kohlenstoff-Partikeln EC90 jedoch nur einen geringen. Die Aktin-Filamente haben einen deutlichen Einfluß bei der Zymosan-induzierten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Sind die Aktin-Filamente durch Cytochalasin D zerstört, ist der Oxidative Burst um 50 % vermindert. Bei PMA-induziertem Oxidativen Burst haben die Aktinfilamente einen geringeren Einfluß auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Bei Patienten, bei denen eine (chronische) Entzündung in der Lunge vorliegt, ist der Oxidative Burst vermindert.

2.4 Wirkung feiner und ultrafeiner Partikeln auf das Zytoskelett von Makrophagen - Zytomagnetometrische Untersuchungen

Für immunologisch wichtige Prozesse wie die Phagozytose und den Oxidativen Burst besitzt, wie in den vorigen Kapiteln gezeigt werden konnte, das Zytoskelett der Zellen eine wichtige Funktion. Aus den Untersuchungen ergaben sich deutliche Hinweise, daß sich durch die Interaktion der Alveolarmakrophagen mit partikulären Fremdstoffen, wie man sie in industrialisierten Regionen verstärkt einatmet, Auswirkungen auf das Zytoskelett der Zellen und damit auf die mit ihm verbundenen Funktionen ergeben können.

In diesem Kapitel wird der Einfluß von feinen und ultrafeinen Teilchen (elementarer Kohlenstoff, EC90; EC90 belegt mit Benzo[a]pyren, EC90B; Printex 90, P90; Titandioxid fein und ultrafein, f und uTiO₂) auf Eigenschaften des Zytoskeletts (Relaxation und Steifigkeit) bei Makrophagen der Maus (J774A.1, Zell-Linie) und bei Alveolarmakrophagen des Beagle-Hundes (primäre Zellen) untersucht. Die Partikeln wurden in den Konzentrationen 32, 100 und 320 µg pro ml Medium und Million Zellen eingesetzt.

Bei den magnetometrischen Untersuchungen (ausführliche Erläuterung der Methodik siehe Kapitel 5.9) wurden zwei Eigenschaften des Zytoskeletts erfaßt: Relaxation und Steifigkeit. Die Relaxation beschreibt den Abbau des magnetischen Feldes, das durch die ausgerichteten Dipole der Magnetpartikeln in den Phagosomen der Zelle erzeugt wird. Der Abbau kommt zustande, da sich die Phagosomen, in denen sich die Magnetpartikeln befinden, an Zytoskelettkomponenten gekoppelt sind und sich daran entlangbewegen. Die Relaxation kann als Maß für den stochastischen Phagosomentransport herangezogen werden. Die Steifigkeit ist ein Maß für die mechanische Integrität der Zytoskelett-Filamente. Störungen in der Umbauodynamik der Filamente verändern diese Größe und geben Aufschluß z.B. über eine verminderte Beweglichkeit der Makrophagen.

Die Darstellungsweise der Ergebnisse in den folgenden Graphiken und die Statistik sind in den Kapiteln 5.9.4 und 5.12 erläutert.

Für die Relaxation gilt, daß eine Abweichung von „1“ nach unten, d.h. Verminderung der Relaxation bezüglich ihrer dazugehörigen Negativkontrolle, einer langsameren Zytoskelettdynamik (z.B. Phagosomentransport) entspricht. Eine Erhöhung der Werte über „1“ entspricht einer Erhöhung der Zytoskelettdynamik. Für die Steifigkeit gilt, daß eine Erhöhung über „1“ einer Erhöhung der Steifigkeit des Zytoskeletts entspricht, einer Verminderung unter „1“ einer Verminderung der Steifigkeit.

Auswirkung ultrafeiner Partikeln auf das Zytoskelett von J774A.1-Mausmakrophagen

Dargestellt in Abb. 2.30 sind Veränderungen der Relaxation (normiert auf die dazugehörigen unbehandelten Kontrolle) nach 4,5 Stunden Inkubation mit den Partikeln. Die Behandlung der Zellen mit feinem und ultrafeinem Titandioxid erhöht den Wert der Relaxation leicht.

Die Änderung ist signifikant bei feinem Titandioxid bei einer Partikelkonzentration von 320 µg/ml und bei ultrafeinem Titandioxid von 100 µg/ml. Ultrafeines Printex 90, ein Partikel aus Kohlenstoff, vermindert den Wert der Relaxation deutlich, die Zytoskelettdynamik und damit z.B. der Phagosomentransport nimmt zu (signifikant bzw. hochsignifikant für Partikelkonzentrationen von 100 bzw. 320 µg/ml). Elementarer Kohlenstoff (EC90) führt zu einer deutlichen Erhöhung der Relaxation bei einer Partikelkonzentration von 320 µg/ml, während für den mit Benzo[a]pyren beschichteten ultrafeinen EC90-Kohlenstoff für die untersuchten Partikelkonzentrationen (32 und 100 µg/ml) nur eine geringe (nicht signifikante) Verminderung der Relaxation auftritt.

Bei längerer, 24-stündiger Inkubationsdauer mit den Partikeln (Abb. 2.31), wird der in der 4,5-stündigen Inkubation sichtbare Trend für ultrafeines TiO₂ und für ultrafeines EC90 deutlicher. Bei beiden Partikeln tritt eine Erhöhung des Wertes für die Relaxation ein, was einer Verlangsamung der Zytoskelettdynamik entspricht (hochsignifikant für uftTiO₂ und ufEC90 bei einer Partikelkonzentration von 320 µg/ml). Für feines TiO₂ konnten keine signifikanten Effekte mehr festgestellt werden, die sich bei der 4,5-stündigen Inkubation noch gezeigt hatten. Die Verminderung des Relaxationswertes bei uFP90 ist bei 24-stündiger Inkubation nicht mehr so deutlich wie bei der 4,5-stündigen und nur noch für die hohe Konzentration von 320 µg/ml Partikeln signifikant. Während bei der kurzen Inkubation (4,5 Stunden) sich die Ergebnisse für den ufEC90 und ufEC90W unterscheiden, stimmen sie für die lange Inkubation (24 Stunden) bei 320 µg/ml überein. Beide Partikelarten werden mit den gleichen Generatoren und der gleichen Herstellungsart produziert, sie besitzen somit die gleichen physikalischen Parameter (z.B. spezifische Oberfläche, aerodynamischer Durchmesser), wurden aber in zwei verschiedenen Laboratorien hergestellt.

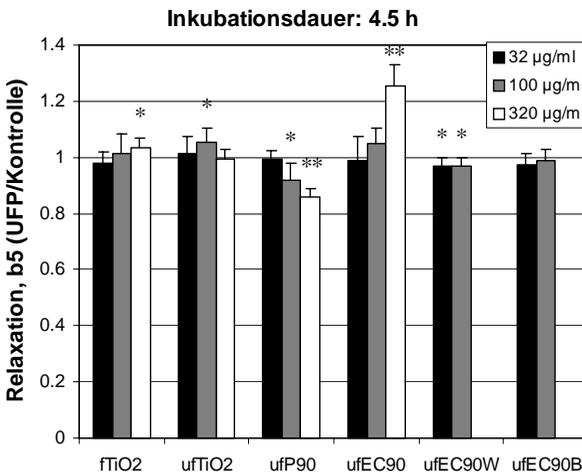


Abb. 2.30 Zytomagnetometrische Messung des Zytoskelettparameters Relaxation nach 4,5-stündiger Inkubation von J774A.1-Mausmakrophagen mit unterschiedlichen Partikel-Konzentrationen (32, 100 und 320 µg/ml). (MW ± S.D., n = 6, ** p ≤ 0,01; * p ≤ 0,05).

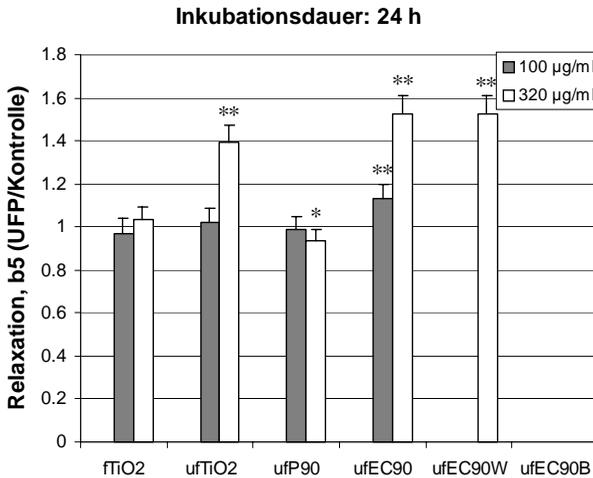


Abb. 2.31 Zytomagnetometrische Messung des Zytoskelettparameters Relaxation nach 24-stündiger Inkubation von J774A.1-Mausmakrophagen mit unterschiedlichen Partikel-Konzentrationen (32, 100 und 320 µg/ml). (MW ± S.D. n = 6, ** p ≤ 0,01; * p ≤ 0,05).

An den Magnetpartikeln und damit an den Phagosomen und an den mit ihnen verbundenen Filamenten des Zytoskeletts wurde mit zwei unterschiedlichen starken Magnetfeldern Kraft ausgeübt, die als „low stress“ (LowStr) und „high stress“ (HiStr) bezeichnet werden (Erläuterung der beiden Größen siehe Kapitel 5.9.4).

Die Ergebnisse der Experimente, bei der die Steifigkeit mit „low stress“ untersucht wurden, sind in den Abb. 2.32 und 2.33 dargestellt. Nach 4,5-stündiger Inkubation (Abb. 2.32) löst eine geringe Partikelkonzentration (32 µg/ml) bei den meisten Partikeln eine Verminderung des Steifigkeits-Wertes und damit eine verminderte Steifigkeit des Zytoskeletts aus. Signifikant ist diese Verminderung für ufP90 und ufEC90B (mit Benzo[a]pyren beschichtetes EC90). Bei steigender Konzentration der Partikeln und damit steigender Beladung des Zytoskeletts mit partikelhaltigen Phagosomen kehrt sich dieser Trend um und es kommt zu einer zunehmenden Versteifung des Zytoskeletts (Werte der Steifigkeit > 1). Signifikant ist dieser Trend für fTiO₂ und ufEC90B. Die stärkste Verminderung des Wertes für die Steifigkeit ist bei ufEC90B zu beobachten. Eine Erhöhung der Partikelkonzentration wirkt dem zwar entgegen, die Steifigkeit bleibt aber auch bei 100 µg/ml Partikeln vermindert. Nur bei den Zellen, die mit UfEC90 inkubiert wurden, zeigt sich eine Versteifung des Zytoskeletts, die für die Partikelkonzentration 100 µg/ml signifikant ist.

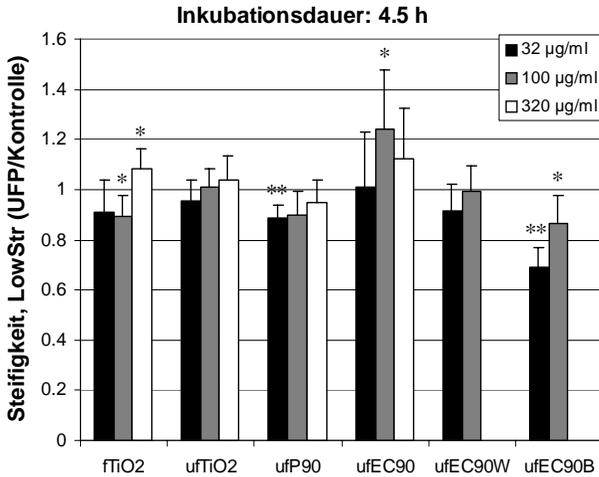


Abb. 2.32 Zytomagnetometrische Messung des Zytoskelettparameters Steifigkeit bei „low stress“ nach 4,5-stündiger Inkubation von J774A.1- Mausemakrophagen mit unterschiedlichen Partikel-Konzentrationen (32, 100 und 320 µg/ml). (MW ± S.D., n = 6, ** p ≤ 0,01; * p ≤ 0,05).

Bei der 24-stündigen Inkubation ist der Effekt der verminderten Steifigkeit aufgehoben (Abb. 2.33). Alle Partikeln verursachen bei den untersuchten Konzentrationen von 100 und 320 µg/ml eine unveränderte (100 µg/ml) oder erhöhte (320 µg/ml) Steifigkeit, aber keine Verminderung mehr. Besonders deutlich ist die Zunahme der Steifigkeit bei ufTiO₂, das einen

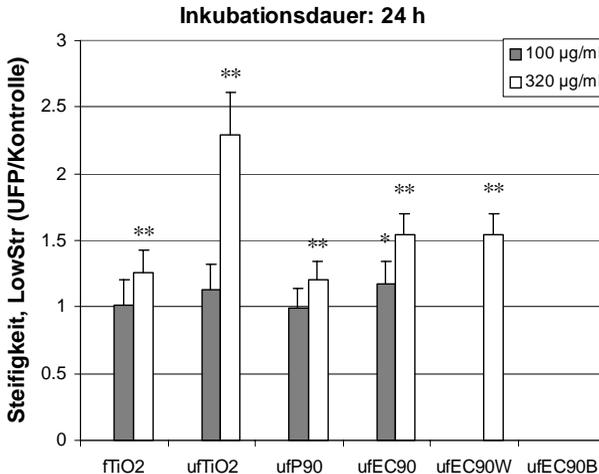


Abb. 2.33 Zytomagnetometrische Messung des Zytoskelettparameters Steifigkeit bei „low stress“ nach 24-stündiger Inkubation von J774A.1- Mausemakrophagen mit unterschiedlichen Partikel-Konzentrationen (32, 100 und 320 µg/ml). (MW ± S.D., n = 6, ** p ≤ 0,01; * p ≤ 0,05).

fast doppelt so starken Effekt als das feine TiO_2 auf das Zytoskelett hat. Auch ufP90 hat bei längerer Inkubation den Effekt, die Steifigkeit nicht herabzusetzen, sondern zu erhöhen. ufEC90 setzt den Trend der Erhöhung der Steifigkeit fort, den es schon bei 4,5-stündiger Inkubation bei den höheren Partikelkonzentrationen gezeigt hat. Die unterschiedliche Wirkung von ufEC90 und ufEC90W, die bei kurzer, 4,5-stündiger Inkubation vorhanden sind, sind bei 24-stündiger Inkubation zumindest für die dort untersuchte Partikelkonzentration von $320 \mu\text{g/ml}$ nicht mehr nachzuweisen. Beide Partikeln führen zu einer hochsignifikanten Zunahme der Versteifung.

Wird mit einem stärkeren Magnetfeld, also mit höherer Kraft oder „high stress“ an den Phagosomen gezogen (vgl. Kapitel 5.9.4), sind außer bei ufP90 und ufEC90B (jeweils bei $32 \mu\text{g/ml}$ Partikelkonzentration) keine signifikanten Veränderungen der Steifigkeit des Zytoskeletts mehr nachzuweisen (Abb. 2.34). Eine leichte Verminderung der Steifigkeit ist bei allen Partikeln zu erkennen. Für die Partikeln ufEC90, ufEC90W und ufEC90B stimmt das Muster der Veränderungen, die die unterschiedlichen Partikelkonzentrationen verursachen, mit dem bei „low stress“ überein. TiO_2 fein und ultrafein zeigt bei „high stress“ keine Effekte.

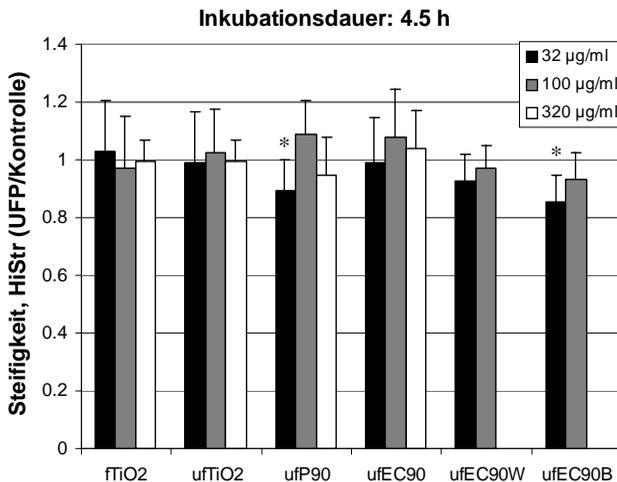


Abb. 2.34 Zyto-magnetometrische Messung des Zytoskelettparameters Steifigkeit bei „high stress“ nach 4,5-stündiger Inkubation von J774A.1- Mausemakrophagen mit unterschiedlichen Partikelkonzentrationen (32 , 100 und $320 \mu\text{g/ml}$). ($MW \pm S.D.$, $n = 6$, $**p \leq 0,01$; $*p \leq 0,05$).

Nach langer Inkubation (24 Stunden) ist auch bei „high stress“ ein deutlicher Effekt, vor allem bei der hohen Partikelkonzentration von $320 \mu\text{g/ml}$ als Versteifung des Zytoskeletts zu erkennen (Abb. 2.35). ufTiO2 bewirkt eine deutliche Versteifung des Zytoskeletts, wie es auch schon bei den Untersuchungen mit „low stress“ nachgewiesen werden konnte. ufEC90 und ufEC90W reagieren bei $320 \mu\text{g/ml}$ Partikelkonzentration mit einer gleich starken Erhöhung der Steifigkeit, die bei ufEC90 bereits mit $100 \mu\text{g/ml}$ Partikeln hochsignifikant ist.

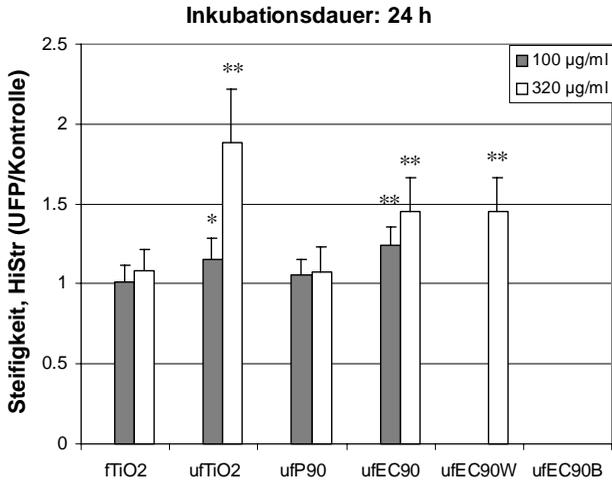


Abb. 2.35 Zytomagnetometrische Messung des Zytoskelettparameters Steifigkeit bei „high stress“ nach 24-stündiger Inkubation von J774A.1- Mausmakrophagen mit unterschiedlichen Partikel-Konzentrationen (32, 100 und 320 µg/ml). (MW ± S.D., n = 6, ** p ≤ 0,01; * p ≤ 0,05).

Auswirkung ultrafeiner Partikeln auf das Zytoskelett von primären Alveolarmakrophagen vom Beagle-Hund

Primäre Makrophagen wurden von Beagle-Hunden durch bronchoalveoläre Lavage (BAL) gewonnen und zytomagnetometrisch untersucht. Parallel dazu wurden Daten zum Oxidativen Burst nach Einwirken von feinen und ultrafeinen Partikeln gewonnen.

Die Hauptpopulation der Zellen einer BAL sind Alveolarmakrophagen. Daneben kommen Neutrophile Granulozyten, Eosinophile Granulozyten und Leukozyten vor. Das Verhältnis der Zellen untereinander ist bei der Bewertung der Versuchsergebnisse von Interesse, da z.B. durch einen höheren Anteil von Neutrophilen Granulozyten ein akuter Entzündungsprozeß in der Lunge erkannt werden kann. Dieser muß bei der Interpretation der Daten z.B. zum Oxidativen Burst, berücksichtigt werden. In Tab. 2.3 ist das Ergebnis der Differenzierung der BAL-Zellen von den lavagierten Hunde dargestellt. Bei zwei Hunden (H411 und H426) ist der Anteil der Leukozyten erhöht (>20 %). Hier kann von einer leichten Entzündung in der Lunge des Tieres ausgegangen werden.

Abb. 2.36 zeigt die Beagle-Alveolarmakrophagen nach Inkubation ohne Partikeln (A), mit fTiO₂ (B), uf TiO₂ (C), ufP90 (D) und ufEC90 (E). f und ufTiO₂ lösen sich im Medium recht homogen, während die beiden Kohlenstoffpartikelarten ufP90 und ufEC90 eher zur Aggregation neigen und sich schlechter suspendieren lassen.

Bei den zytomagnetometrischen Untersuchungen folgen die Grafiken dem selben Aufbau, wie er schon für die Untersuchungen an J774A.1-Mausmakrophagen im vorstehendem Abschnitt vorgestellt wurde (siehe auch Kapitel 5.9.4 und 5.12).

| | Zelltyp | Makrophagen | Lymphozyten | Neutrophile | Eosinophile |
|---|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Prozentualer Anteil der leukozytischen Zellen [%] | Hund 290 | 83,5 | 13,3 | 3,2 | 0,0 |
| | Hund 293 | 85,5 | 12,2 | 2,3 | 0,0 |
| | Hund 337 | 91,0 | 6,0 | 2,5 | 0,5 |
| | Hund 411 | 68,0 | 23,2 | 2,5 | 6,3 |
| | Hund 426 | 77,8 | 20,3 | 1,2 | 0,7 |
| | Hund 440 | 93,7 | 6,0 | 0,3 | 0,0 |
| | Hund 468 | 79,8 | 16,2 | 3,0 | 1,0 |
| | Hund 470 | 84,5 | 14,5 | 0,7 | 0,3 |
| | Hund 476 | 89,2 | 9,2 | 1,2 | 0,5 |

Tab. 2.3 Differenzierung der Zellpopulation, die durch bronchoalveoläre Lavage (BAL) bei Beagle-Hunden gewonnen wurde.

Abb. 2.36 A - E zeigen Zellen aus der BAL des Beagle-Hundes.

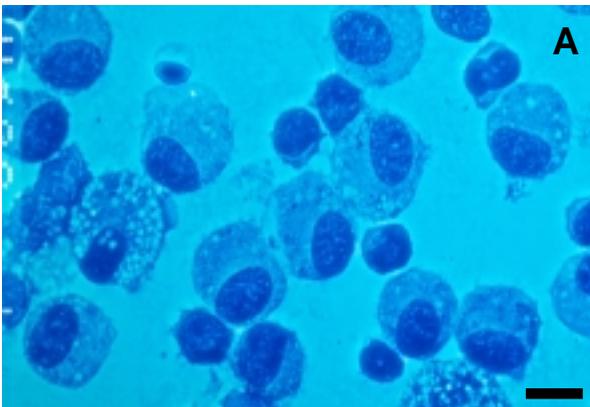


Abb. 2.36 Fortsetzung
nächste Seite.

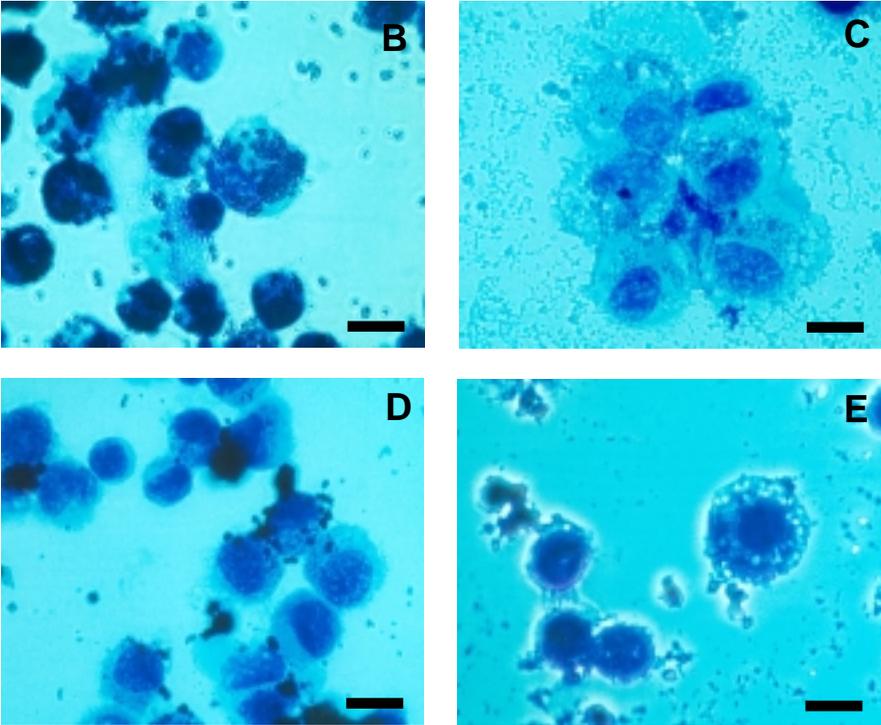


Abb. 2.36 Zellen der BAL von Beagle-Hunden. **A** unbehandelte Zellen; **B** behandelt mit 32 µg/ml *f*TiO₂, Phasenkontrast; **C** behandelt mit 32 µg/ml *uf*TiO₂, Hellfeld; **D** behandelt mit 32 µg/ml *uf*P90, Hellfeld; **E** behandelt mit 32 µg/ml *uf*EC90, Phasenkontrast. Meßbalken 10 µm.

Beagle-Alveolarmakrophagen reagieren nach 4,5-stündiger Inkubation mit TiO₂ (Abb. 2.37) mit einer Zunahme des Wertes für die Relaxation, d.h. die Zytoskelettdynamik wird vermindert. Dies gilt für das *f*TiO₂, als auch für das *uf*. Ganz anders wirken die Kohlenstoffpartikeln *uf*P90 und *uf*EC90. Bei ihnen führt die Partikelbelastung zu einer Verminderung des Relaxations-Wertes und damit zu einer Aktivierung der Zytoskelettdynamik. Bei *uf*P90 ist eine tendenzielle Abhängigkeit von der Partikelkonzentration zu erkennen. Sie ist aufgrund der Streuung der Einzelwerte jedoch nicht signifikant. Für *uf*EC90 konnte diese Konzentrationsabhängigkeit nachgewiesen werden. Mit steigender Konzentration der Partikeln nimmt der Relaxationswert ab, die Zytoskelettdynamik der Zellen also zu.

Bei der langen, 24-stündigen Inkubation mit Partikeln (Abb. 2.38) bestätigt sich das Ergebnis für *uf*EC90 von der kurzen Inkubation. Der bei *uf*P90 und kurzer Inkubationszeit beobachtete Trend des Rückgangs des Relaxationswert hat sich nach 24-stündiger Inkubation für die hohen Partikelkonzentrationen (100 und 320 µg/ml) fortgesetzt und ist statistisch belegbar (signifikant bzw. hochsignifikant). War bei *f*TiO₂ und kurzer Inkubationszeit (4,5 Stunden) bei den hohen Partikelkonzentrationen noch eine Verlangsamung der Relaxation

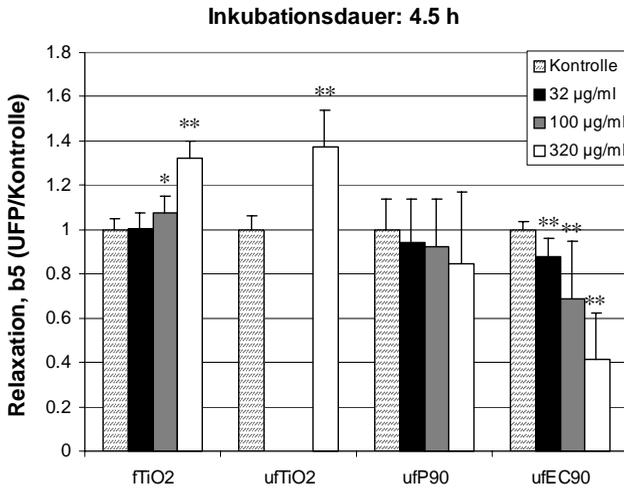


Abb. 2.37 Zytomagnetometrische Messung des Zytoskelettparameters Relaxation nach 4,5-stündiger Inkubation von Alveolarmakrophagen von Beagle-Hunden mit unterschiedlichen Partikelkonzentrationen (32, 100 und 320 µg/ml). (MW ± S.D., n = 5, ** p ≤ 0,01; * p ≤ 0,05).

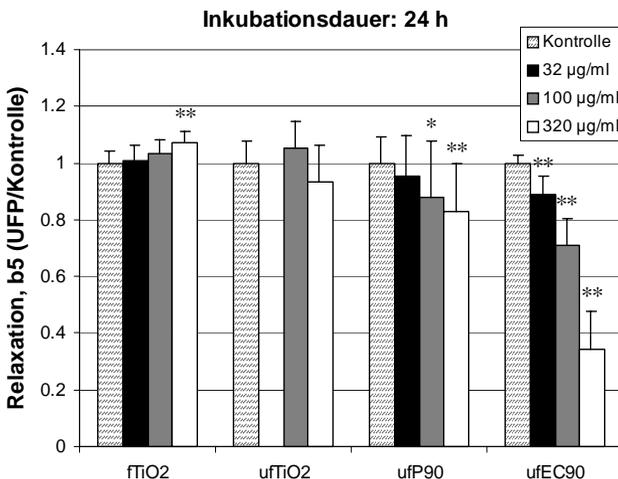


Abb. 2.38 Zytomagnetometrische Messung des Zytoskelettparameters Relaxation nach 24-stündiger Inkubation von Alveolarmakrophagen von Beagle-Hunden mit unterschiedlichen Partikelkonzentrationen (32, 100 und 320 µg/ml). (MW ± S.D., n = 5, ** p ≤ 0,01; * p ≤ 0,05).

(Erhöhung des Relaxationswertes) zu beobachten, geht die Reaktion der Zellen nach 24 Stunden Inkubation zurück. Eine signifikante Erhöhung des Wertes für die Relaxation ist nur noch bei 320 µg Partikeln pro ml zu messen. ufTiO₂ induziert keine Effekte auf die Relaxation.

Der Einfluß der Partikeln auf die Steifigkeit des Zytoskeletts nach 4,5- bzw. 24-stündiger Inkubation sind in Abb. 2.39 und 2.40 zusammengestellt. Nach 4,5 Stunden (Abb. 2.39) erhöht sich die Steifigkeit des Zytoskeletts der Beagle-Alveolarmakrophagen nach Inkubation mit fTiO₂ bei einer Konzentration von 32 µg/ml. Eine höhere Konzentration hat einen weniger großen Anstieg des Parameters zur Folge. ufTiO₂ folgt diesem Trend, wobei sich keine statistisch belegbaren Unterschiede zu den Kontrollen ergeben. Bei den Kohlenstoffpartikeln haben alle Konzentrationen von ufP90 keinen verändernden Einfluß auf die Steifigkeit. ufEC90 hingegen zeigt eine konzentrationsabhängige Verminderung der Zytoskelettsteifigkeit. Je höher die Partikelkonzentration, desto stärker die Verminderung (signifikant für 100 µg/ml, hochsignifikant für 320 µg/ml).

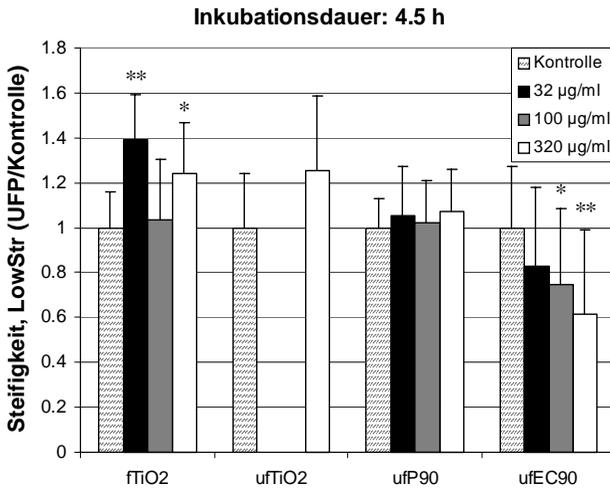


Abb. 2.39 Zytomagnetometrische Messung des Zytoskelettparameters Steifigkeit bei „low stress“ nach 4,5-stündiger Inkubation von Alveolarmakrophagen von Beagle-Hunden mit unterschiedlichen Partikelkonzentrationen (32, 100 und 320 µg/ml). (MW ± S.D., n = 5, ** p < 0,01; * p < 0,05).

Nach 24-stündiger Inkubation der Partikeln (Abb. 2.40) zeigt nur noch ufEC90 einen Effekt auf die Steifigkeit des Zytoskeletts. Während nach kurzer Inkubationsdauer (4,5 Stunden) eine Verminderung der Steifigkeit aufgetreten ist, kehrt sich dieser Effekt nach 24-stündiger Inkubationszeit um. Hier wurde durch ufEC90 eine Versteifung des Zytoskeletts bei Partikelkonzentrationen von 100 und 320 µg/ml gemessen.

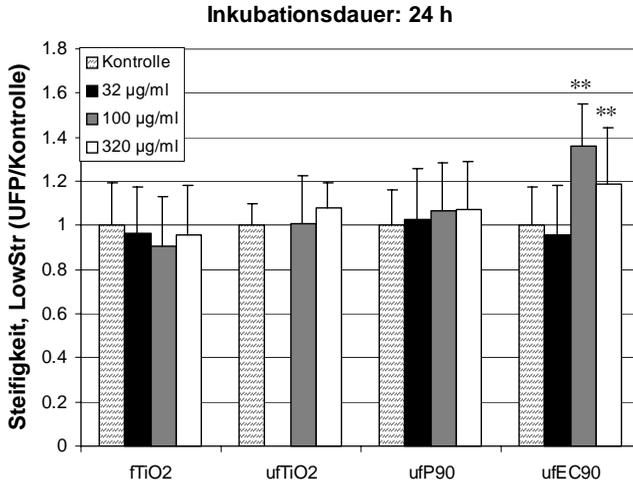


Abb. 2.40 Zytomagnetometrische Messung des Zytoskelettparameters Steifigkeit bei „low stress“ nach 24-stündiger Inkubation von Alveolarmakrophagen von Beagle-Hunden mit unterschiedlichen Partikelkonzentrationen (32, 100 und 320 µg/ml). (MW ± S.D., n = 5, ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$).

Bei Anwendung hoher Kraft („high stress“) sind die Effekte, die bei geringer Kraft („low stress“) gemessen wurden (vgl. Kapitel 5.9.4), deutlich nachweisbar (Abb. 2.41 und 2.42).

Die für TiO₂ gemessene Tendenz, die Steifigkeit zu erhöhen, die nur für das fTiO₂ in den hohen Konzentrationen signifikant war, ist nach 24-stündiger Inkubation (Abb. 2.41) auch bei ufTiO₂ nachzuweisen. Bei fTiO₂ läßt sich eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Zytoskelettsteifigkeit zeigen, die, wie auch bei ufTiO₂, bei der Partikelkonzentration von 320 µg/ml hoch signifikant ist. ufP90 zeigt keine Effekte auf die Steifigkeit. Von den Kohlenstoffpartikeln zeigt nur ufEC90 den gleichen, aber etwas schwächeren Trend wie bei „low stress“. Die Steifigkeit des Zytoskeletts wird mit steigender Konzentration der Partikeln immer mehr vermindert (signifikant für 320 µg Partikeln pro ml).

Bei 24-stündiger Inkubationsdauer (Abb. 2.42) hat wie bei „low stress“ fTiO₂ keinen Effekt auf die Steifigkeit. Bei ufTiO₂ ist bei hoher Partikelkonzentration (320 µg/ml) eine leichte Versteifung zu beobachten. Bei den Kohlenstoffpartikeln zeigt jetzt auch ufP90 einen Effekt. War bei „low stress“ nur andeutungsweise ein versteifender Effekt zu erkennen, ist bei „high stress“ und 24-stündiger Teilcheninkubation eine signifikant bzw. hoch signifikant erhöhte Steifigkeit des Zytoskeletts nachzuweisen. Die mit ufEC90 bei „low stress“ gewonnenen Ergebnisse bestätigten sich auch bei höherer Kraft („high stress“). Bei hohen Partikelkonzentrationen (100 und 320 µg/ml) ist die Steifigkeit erhöht ($p \leq 0,01$).

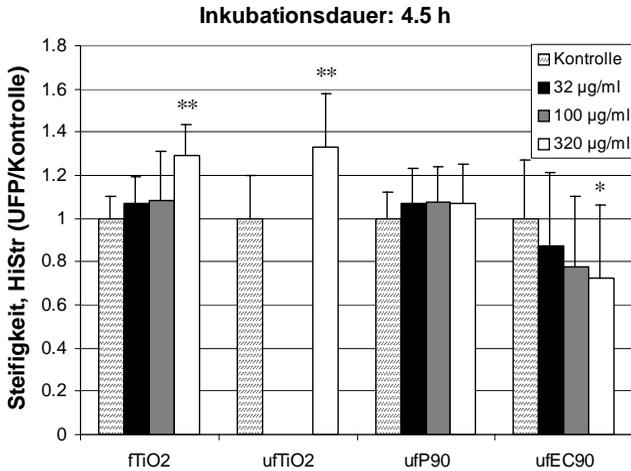


Abb. 2.41 Zytomagnetometrische Messung des Zytoskelettparameters Steifigkeit bei „high stress“ nach 4,5-stündiger Inkubation von Alveolarmakrophagen von Beagle-Hunden mit unterschiedlichen Partikel-Konzentrationen (32, 100 und 320 µg/ml). (MW ± S.D., n = 5, ** p ≤ 0,01; * p ≤ 0,05).

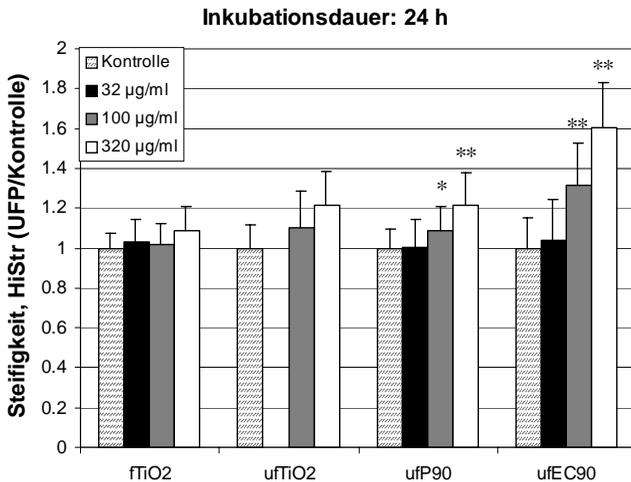


Abb. 2.42 Zytomagnetometrische Messung des Zytoskelettparameters Steifigkeit bei „high stress“ nach 24-stündiger Inkubation von Alveolarmakrophagen von Beagle-Hunden mit unterschiedlichen Partikel-Konzentrationen (32, 100 und 320 µg/ml). (MW ± S.D., n = 5, ** p ≤ 0,01 * p ≤ 0,05).

In parallelen Versuchen wurden die Beagle-Alveolarmakrophagen auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies nach Stimulation mit den in den zytomagnetometrischen Experimenten benutzten Partikeln untersucht (Abb. 2.43 und 2.44). Abb. 2.43 zeigt die Stärke des Bursts (normiert auf die jeweilige unbehandelte Probe) nach 30-minütiger Inkubation. PMA löst (durch Interaktion mit der Proteinkinase C) einen Burst in den Zellen aus. Durch die Inkubation der Zellen mit den Partikeln alleine und in Kombination mit PMA läßt sich zeigen, ob die Partikeln alleine die Bildung von ROS induzieren und ob sie imstande sind, den PMA-induzierten Burst zu modulieren.

Feines sowie ultrafeines TiO_2 löste keinen Oxidativen Burst aus. Es wurden auch keine Hinweise auf modulatorische Eigenschaften gefunden. P90 alleine löste einen starken Burst aus (2,5-fach erhöht gegenüber PMA), EC90 einen gegenüber PMA leicht höheren Burst. Etwas höher als EC90 alleine ist der Effekt von EC90 in Kombination mit PMA.

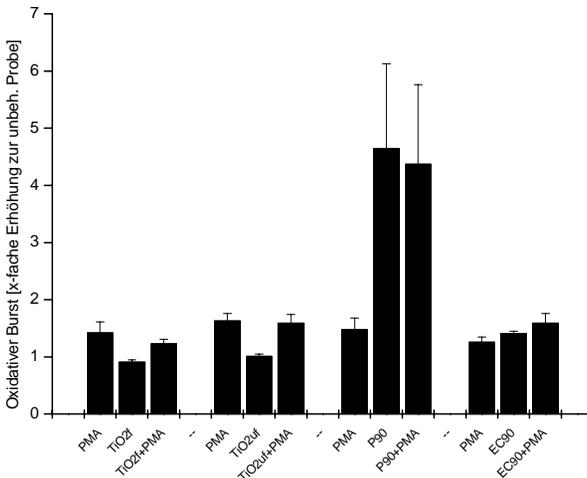


Abb. 2.43 Oxidativer Burst bei Alveolarmakrophagen vom Beagle-Hund nach Stimulation mit $f\text{TiO}_2$, $uf\text{TiO}_2$, $uf\text{P90}$ und $uf\text{EC90}$. Inkubationsdauer 30 Minuten. (MW \pm S.D., $n = 4$).

Abb. 2.44 zeigt die Höhe des Oxidativen Bursts nach 130 min Inkubation mit den Partikeln. Bestätigt wurde, daß feines und ultrafeines TiO_2 keinen Einfluß auf die Bildung von ROS haben und auch die Wirkung von PMA nicht moduliert. EC90 zeigte eine zu PMA mehr als verdoppelte, P90 eine starke Bildung von ROS (8,5-fach höher als PMA). In der Kombination von P90 und PMA war die Höhe des Oxidativen Bursts signifikant niedriger als mit P90 alleine. Ein leichter, nicht signifikanter Rückgang der ROS-Bildung war bei der gemeinsamen Inkubation von EC90 und PMA nachzuweisen.

2. ERGEBNISSE

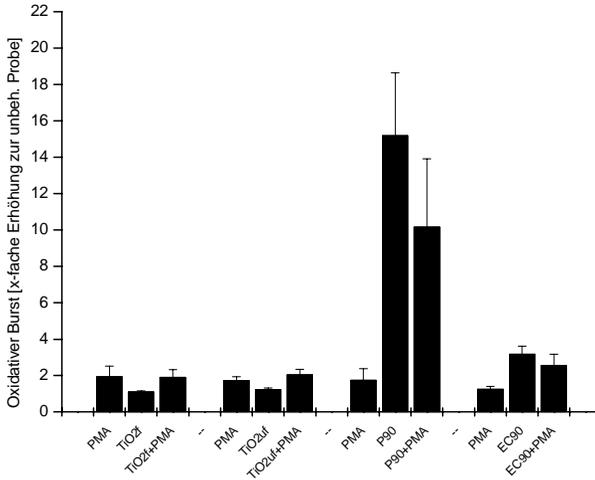


Abb. 2.44 Oxidativer Burst bei Alveolarmakrophagen vom Beagle-Hund nach Stimulation mit $fTiO_2$, $ufTiO_2$, $ufP90$ und $ufEC90$. Inkubationsdauer 130 Minuten. (MW \pm S.D., n = 4).

2.5 Wirkung von Zytoskelettnoxen sowie feiner und ultrafeiner Partikeln auf die Genexpression

2.5.1 Einfluß von Cytochalasin D, Colchicin und EC90 auf die Expression von Zytokinen

Da Zytoskelettnoxen wie Cytochalasin D und Colchicin stark in die Physiologie der Zelle eingreifen, lag die Vermutung nahe, daß die Behandlung von Zellen mit diesen Giften Genexpressionsänderungen hervorrufen sollte. Die gleiche Fragestellung galt auch den feinen und ultrafeinen Partikeln. Wie in den vorigen Kapiteln gezeigt, konnte nachgewiesen werden, daß die Partikeln einen Oxidativen Burst in den Zellen induzieren und modifizierend auf funktionelle Eigenschaften des Zytoskeletts wirken. Deshalb wurde untersucht, inwieweit Partikeln die Genexpression von Makrophagen modulieren können.

Um Anhaltspunkte für die o.g. Vermutung zu finden, wurde die Expression von Zytokinen (TNF- α und IL-8) nach Inkubation der Zellen mit Cytochalasin D, Colchicin und EC90 auf mRNA-Ebene mittels PCR untersucht.

Das proinflammatorische Zytokin TNF- α (Abb. 2.45) wird bei Entzündungsreaktionen von Makrophagen schnell gebildet und ausgeschüttet. Die Banden repräsentieren die Menge an cDNA des Genes für TNF- α , die nach Stimulation von MM6-Zellen mit LPS, Cytochalasin D (CytoD), Colchicin (Col) und elementarem Kohlenstoff (EC90) gebildet wurden.

LPS ist ein starker Induktor für das Zytokin, was in einer gegenüber der unbehandelten Probe deutlich hellere Bande zu erkennen ist. Cytochalasin D alleine, das die Aktinfilamente der Zelle zerstört, führt zu einer leichten Erhöhung der Expression von TNF- α , ebenso wie EC90. Eine starke Induktion der Genexpression von TNF- α , die in der Größenordnung von LPS liegt, bewirkt Colchicin. pAW109 ist ein Plasmid, das als interner Standard der Probe zugegeben wurde. Zusammen mit der Beurteilung der Menge an cDNA des „housekeeping“-Genes α -Enolase kann geprüft werden, daß die Expressionsunterschiede von TNF- α nicht nur auf Konzentrationsunterschiede bei der eingesetzten Matrizen-cDNA zurückzuführen sind. Die linke Bande dient als Größenmarker für die Größenbestimmung der cDNA.

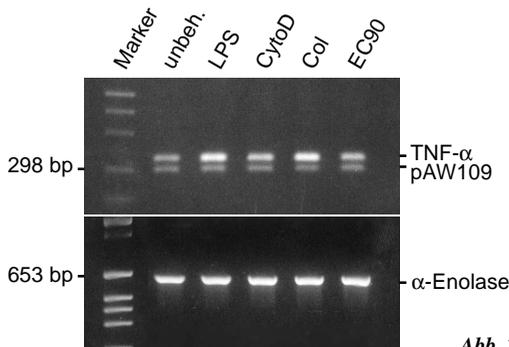


Abb. 2.45 RT-PCR von TNF- α .

Die Induktion des Zytokins Interleukin-8 (IL-8) wird nach LPS-Behandlung der MM6-Zellen gegenüber der unbehandelten Probe erhöht (Abb. 2.46). ufEC90-Partikeln führen zu einer leichten Erhöhung der IL-8-Expression. Die Banden repräsentieren die Menge an cDNA des Genes für IL-8, die nach Stimulation von MM6-Zellen mit LPS und elementarem Kohlenstoff (EC90) gebildet wurden.

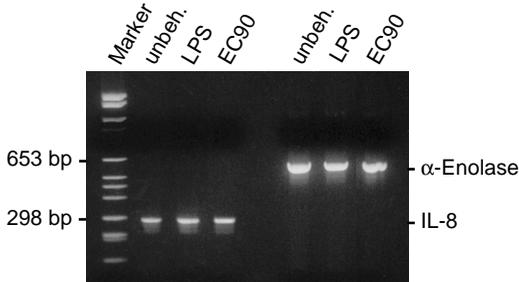


Abb. 2.46 RT-PCR von IL-8.

2.5.2 Screening von Genen, deren Expression durch Zytoskelettnoxen und Partikeln verändert ist, mit Hilfe der Expressionsarray-Technik

Die Expressionsversuche mit den beiden Zytokinen TNF- α und IL-8 haben gezeigt, daß eine Änderung der Expression bestimmter Gene durch Cytochalasin D, Colchicin und ultrafeinen Partikeln ausgelöst werden kann. Mit einer neuen Versuchstechnik, der Expressions-Array-Technik, kann man in kurzer Zeit auf kleinem Raum die Expression einer großen Anzahl von Genen untersuchen.

Insgesamt wurden 588 Gene der MM6-Zellen auf Veränderung der Expression nach Behandlung mit Cytochalasin D und Colchicin untersucht (Array „Human“, Fa. Clontech, USA). Auf genexpressionserhöhende oder -vermindernde Wirkung durch die ultrafeinen Partikeln EC90, P90 und Standard-Diesel-Ruß (SDR) wurden 1.176 Gene untersucht (Array „Human 1.2“, Fa. Clontech, USA). Die vollständige Liste der untersuchten Gene befindet sich im Internet unter <http://www.clontech.com/atlas/genelists/index.html>.

Bei der Expressions-Array-Technik handelt es sich um eine relativ neue Untersuchungsmethode. Deshalb werden anhand der Untersuchungen der Genexpression bei Cytochalasin D-behandelten MM6-Zellen die Versuchsdurchführung und ihre Auswertung etwas detaillierter vorgestellt. Für die Untersuchungen mit Colchicin, EC90, P90 und SDR werden nur die Endergebnisse gezeigt.

Wirkung von Cytochalasin D auf die Genexpression von MM6-Zellen

Nach Inkubation der Zellen mit CytoD (1,5 Stunden) und Isolierung ihrer gesamt-RNA wird auf Verdau der RNA geprüft. Die RNA darf keinen Verdau aufweisen. Dies kann durch

gelelektrophoretische Auftrennung der RNA erreicht werden, bei der ein deutliches Bandenmuster aus zwei scharf voneinander abgegrenzten, in kurzem Abstand liegenden Banden erkennbar sein muß (Abb. 2.47).

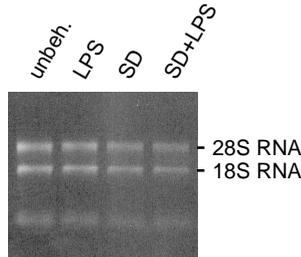


Abb. 2.47 Prüfung auf unverdaute RNA durch gelelektrophoretische Auftrennung der gesamt-RNA aus MM6. Darstellung der beiden Banden für 28S und 18S RNA.

Um die RNA, die den Status der Genaktivität in der Zelle widerspiegelt, von eventuell vorhandener genomischer DNA (gDNA) zu befreien, wird ein Verdau mit dem Enzym DNaseI durchgeführt. Danach wird wieder durch Gelelektrophorese geprüft, daß kein Verdau der RNA stattgefunden hat (Abb. 2.48).

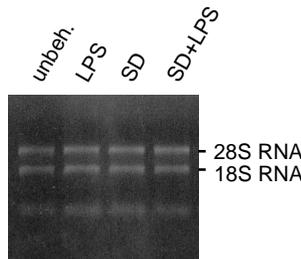


Abb. 2.48 Erneute Prüfung auf unverdaute RNA durch gelelektrophoretische Auftrennung der gesamt-RNA aus MM6. Darstellung der beiden Banden für 28S und 18S RNA.

Nun erfolgt die Prüfung, ob die RNA-Probe frei von gDNA ist (d.h. der DNA-Verdau vollständig war). Dazu wird eine PCR-Reaktion durchgeführt, bei dem das RNA-Material ohne reverse Transkription für die Amplifizierung des Genes für GAPDH, einem in der Zelle konstitutiv exprimierten Gen („housekeeping“-Gen), eingesetzt wird. Nur wenn noch gDNA vorhanden war, ist die PCR erfolgreich und eine Bande erscheint (Abb. 2.49). Die Wasserprobe (H₂O) und die RNA-Probe (mRNA) dürfen keine Bande zeigen. Die Probe mit gDNA dient als Positivkontrolle. Die Probe mit der Kombination aus gDNA und mRNA (D/R) würde aufzeigen, wenn durch eine hohe Konzentration von mRNA die Amplifikation von GAPDH trotz Anwesenheit von gDNA durch kompetitive Hemmung nicht gelingt und man deshalb (fälschlicherweise) von einer gDNA-freien RNA-Probe ausginge. Die geprüfte mRNA-Probe zeigt keine Bande, sie enthält also keine gDNA-Verunreinigung.

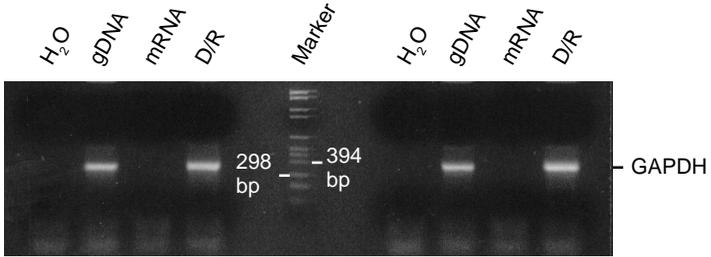


Abb. 2.49 PCR zur Amplifizierung von GAPDH mit der RNA-Probe (mRNA) als Template.

Die reine mRNA-Probe wird zur Hybridisierung der Array-Membran eingesetzt, auf die die zu prüfenden Gene aufgetragen sind. Nach Autoradiographie auf Röntgenfilm erhält man ein Punktemuster, wobei jeder Punkt einem Gen entspricht. Die Stärke der Schwärzung der Punkte spiegelt die Höhe der Expression dieses Genes wider. Der Versuch wird parallel an einer unbehandelten Probe (Negativkontrolle; Abb. 2.50) und der mit Cytochalasin D behandelten Probe durchgeführt (Abb. 2.51).

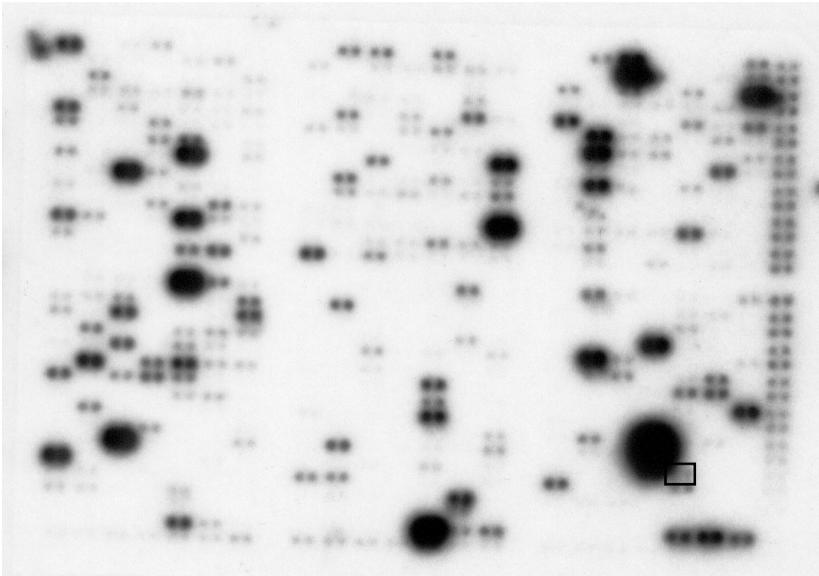


Abb. 2.50 Autoradiographie des Expressionsarrays der unbehandelten Zellen (Negativkontrolle). Jeder Punkt entspricht einem Gen, wobei bei diesem Array die Gene als dicht nebeneinanderliegende Punkte doppelt aufgetragen sind. Eingerahmt ist die cDNA des Gens für den IL-1 α precursor.

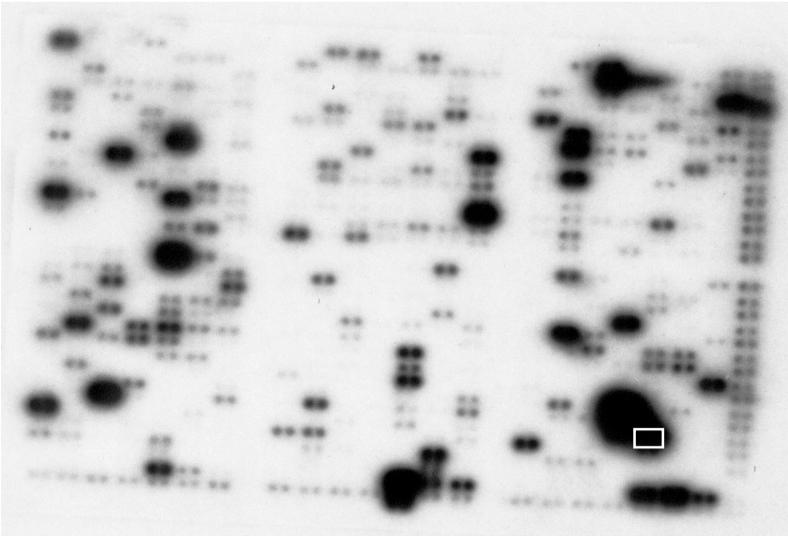


Abb. 2.51 Autoradiographie des Expressionsarrays der mit Cytochalasin D behandelten Zellen. Eingerahmt ist die cDNA des Gens für den IL-1 α precursor, dessen Expression nach der Cytochalasin D-Inkubation stark erhöht ist.

Zur Auswertung der Arrays wird mit einem Computerprogramm paßgenau ein Raster über das Punktemuster gelegt, die Gene identifiziert und ihre Expression densitometrisch erfaßt (Abb. 2.52).

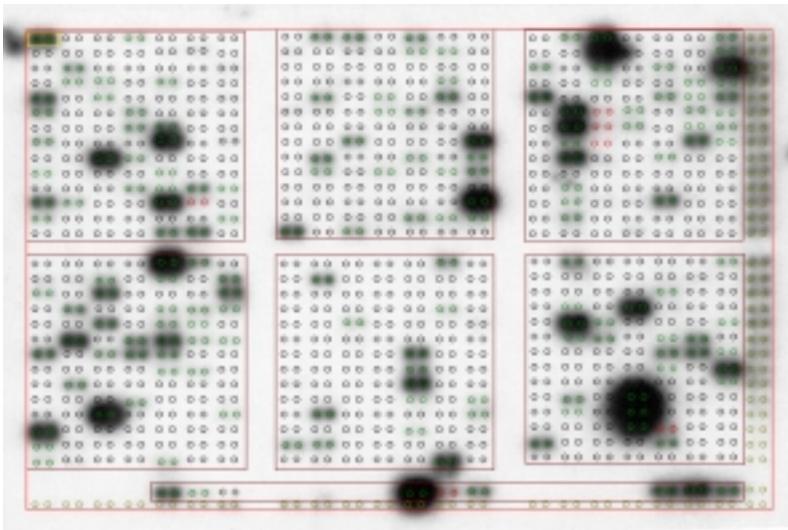


Abb. 2.52 Auswertung des Expressionsarrays. Identifizierung der Gene durch ein Raster und densitometrische Erfassung der Genexpression (Tiefe der Schwärzung der Punkte).

Ein Vergleich der Negativkontrolle mit der CytoD-behandelten Probe zeigt die Gene, die sich in ihrer Expression verändert haben (höhere bzw. niedrigere Expression) (Abb. 2.53).

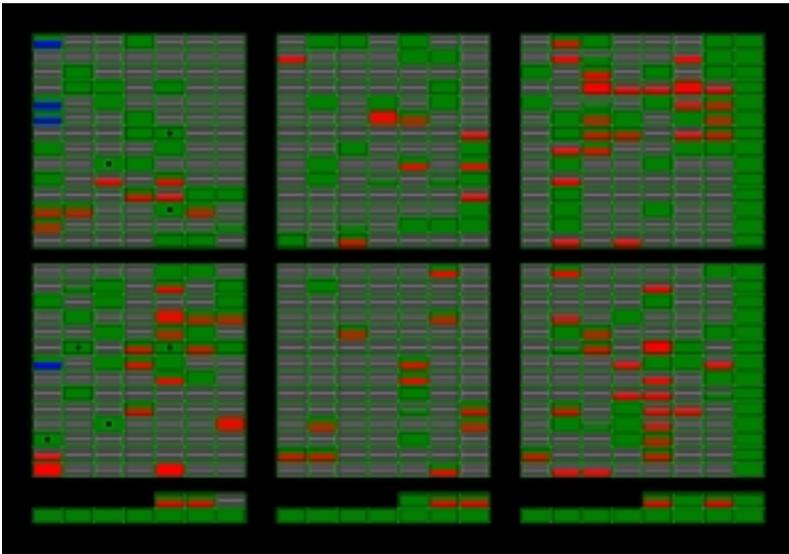


Abb. 2.53 Auswertung des Expressionsarrays. Identifizierung der Gene mit erhöhter (rot) bzw. vermindert (blau) Expression.

Die Auswertung und weitere Verarbeitung durch das Computerprogramm „Atlas Image“ sei beispielhaft am Gen für den IL-1 α precursor erläutert. In den Abb. 2.50 und 2.51 ist die Lage des Gens für den IL-1 α precursor durch einen Rahmen markiert. Für beide Punkte ermittelt das Programm einen densitometrischen Wert („Schwärzungsgrad“) und errechnet daraus einen Mittelwert, der als „Intensity1“ (Array mit unbehandelten Zellen; Referenz) bzw. „Intensity2“ (Array mit CytoD-behandelten Zellen) bezeichnet wird. Von den „Intensity“-Werten wird die Hintergrundschwärzung („background“) des jeweiligen Arrays abgezogen. Als Ergebnis erhält man einen korrigierten densitometrischen Wert, der als „Adjusted Intensity1“ bzw. „Adjusted Intensity2“ bezeichnet wird. Die Berechnung der prozentualen Expressionsänderung erfolgt mit folgender Formel: $((100 / \text{Adjusted Intensity 1} * \text{Adjusted Intensity 2}) - 100)$. Beispielrechnung für IL-1 α precursor:

| Intensity1 | Backgr.1 | Adj. Int.1 | Intensity2 | Backgr.2 | Adj. Int.2 |
|------------|----------|------------|------------|----------|------------|
| 7958 | 2304 | 5654 | 56440 | 2304 | 54136 |

$$\left[\left(\frac{100}{5.654} \right) \cdot 54.136 \right] - 100 = + 857,48$$

Wirkung von Cytochalasin D und Colchicin auf die Genexpression bei MM6-Zellen

Die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Gene sind durch Behandlung mit Cytochalasin D bzw. Colchicin in ihrer Expression verändert (Tab. 2.4). Bei mit Colchicin behandelten Zellen ist die Expression weniger Gene verändert, als mit Cytochalasin D. Bei Colchicin ist eine deutliche Tendenz zur Verminderung der Genexpression zu beobachten.

| Gene / Proteine | Expressionsänderung [%] | |
|---|-------------------------|--------|
| | Col | Cyto D |
| Interleukin-1 alpha precursor (IL-1 alpha; IL1A); hematopoietin-1 | 1059 | 857 |
| T-lymphocyte maturation-associated protein MAL | | 597 |
| Interleukin-8 precursor (IL-8); monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF); T-cell chemotactic factor; neutrophil-activating protein 1 (NAP1); lymphocyte-derived neutrophil-activating factor (LYNAP); protein 3-10C | | 597 |
| Interleukin-1 beta precursor (IL-1 ; IL1B); catabolin | | 583 |
| HLA class I histocompatibility antigen C-4 alpha subunit (HLAC) | | 423 |
| Brain-specific tubulin alpha 1 subunit (TUBA1) | | 385 |
| C-jun proto-oncogene; transcription factor AP-1 | 389 | 335 |
| Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) beta subunit 1 (GNB1); transducin beta-1 subunit | | 331 |
| Macrophage inflammatory protein 1 alpha precursor (MIP1-alpha); tonsillar lymphocyte LD78 alpha protein; G0S19-1 protein; PAT 464.2; SIS-beta; small inducible cytokine A3 (SCYA3) | | 322 |
| Macrophage-specific colony-stimulating factor (CSF-1; MCSF) | | 288 |
| Transcriptional repressor protein yin & yang 1 (YY1); delta transcription factor; DNA-binding protein NF-E1 | -67 | 267 |
| Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) | | 254 |
| Interleukin-12 beta subunit precursor (IL-12B); cytotoxic lymphocyte maturation factor 40-kDa subunit (CLMF p40); NK cell stimulatory factor subunit 2 (NKSF2) | | 225 |
| Microsomal glutathione S-transferase 12 (GST12; MGST1) | | 193 |
| V-erbA related protein (EAR2) | | 185 |
| NADH-ubiquinone oxidoreductase B18 subunit; complex I-B18 (CI-B18); cell adhesion protein SQM1 | | 169 |
| Macrophage inflammatory protein 2 alpha (MIP2-alpha); growth-regulated protein beta (GRO-beta) | | 160 |
| Xeroderma pigmentosum group B complementing protein (XPB); DNA excision repair protein ERCC3; basal transcription factor 2 89-kDa subunit (BTF2-p89); TFIIF 89-kDa subunit | | 158 |
| Alpha1 catenin (CTNNA1); cadherin-associated protein; alpha E-catenin | | 158 |
| Cytoplasmic beta-actin (ACTB) | | 153 |
| Ubiquitin | | 151 |
| Fli-1 oncogene; ergB transcription factor | | 144 |
| Early growth response protein 1 (hEGR1); transcription factor ETR103; KROX24; zinc finger protein 225; AT225 | | 140 |
| Heat shock 90-kDa protein A (HSP90A; HSPCA); HSP86 | | 137 |
| Mitogen-activated protein kinase p38 (MAP kinase p38); cytokine suppressive anti-inflammatory drug binding protein (CSAID binding protein; CSBP); MAX-interacting protein 2 (MXI2) | | 137 |
| Ribosomal protein S9 | | 131 |
| Transcription initiation factor TFIID 31-kDa subunit; TAFII31; TAF2G | | 122 |
| Homeobox protein HOXB7; HOX2C; HHO.c1 | | 120 |
| Tristetraproline (TTP); TIS11; ZFP36; growth factor-inducible nuclear protein 475 (NUP475) | | 120 |

2. ERGEBNISSE

| Gene / Proteine | Expressionsänderung [%] | |
|--|-------------------------|--------|
| | Col | Cyto D |
| Caspase-10 precursor (CASP10); ICE-LIKE apoptotic protease 4 (ICE-LAP4); apoptotic protease MCH4; fas-associated death domain protein; interleukin-1-beta-converting enzyme 2 (FLICE2) | -60 | 118 |
| Hepatoma-derived growth factor (HDGF) | | 117 |
| Corticotropin releasing factor receptor 1 precursor (CRF-R; CRF1) | | 116 |
| Cellular nucleic acid binding protein (CNBP); sterol regulatory element-binding protein | | 114 |
| Vascular endothelial growth factor precursor (VEGF); vascular permeability factor (VPF) | | 112 |
| HHR23A; UV excision repair protein protein RAD23A | | 112 |
| DNA-repair protein XRCC1 | | 111 |
| Interleukin-2 receptor alpha subunit precursor (IL-2 receptor alpha subunit; IL2RA); p55; TAC antigen; CD25 | | 104 |
| Transcription factor LSF | | 104 |
| Cell surface adhesion glycoproteins LFA-1/CR3/p150,95 beta-subunit precursor; LYAM1; integrin beta 2 (ITGB2); CD18 antigen; complement receptor C3 beta subunit | | 104 |
| Apoptosis regulator bcl-2 | 311 | |
| 23-kDa highly basic protein; 60S ribosomal protein L13A (RPL13A) | 51 | |
| Myeloid cell nuclear differentiation antigen (MNDA) | -74 | |
| Helix-loop-helix protein; DNA-binding protein inhibitor Id-2 | -71 | |
| C-myc oncogene | -67 | |
| Transforming growth factor beta receptor III precursor (TGF beta receptor III; TGFR3); betaglycan | -63 | |
| Estrogen receptor hSNF2b; global transcription activator SNF2L4; brg-1 protein; mitotic growth and transcription activator; brahma protein homolog 1 | -57 | |
| Heat shock factor protein 1 (HSF1); heat shock transcription factor 1 (HSTF1); TCF5 | -55 | |
| Zinc finger X-chromosomal protein (ZFX) | -53 | |
| Cytoplasmic dynein light chain 1 (HDLC1); protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase (PIN) | -51 | |

Tab. 2.4 Veränderung der Genexpression nach Inkubation von MM6-Zellen mit Cytochalasin D bzw. Colchicin. Ein positiver Wert gibt eine Expressionserhöhung, ein negativer eine verminderte Expression an.

Wirkung von Printex 90 auf die Genexpression bei MM6-Zellen

Bei den Versuchen mit ultrafeinen Teilchen wurden Expressionsarrays eingesetzt, die die gleichzeitige Überprüfung von 1.176 Genen (Array „Human 1.2“) erlauben. Es wurde nicht nur die Wirkung der Partikeln alleine auf die Genexpression untersucht, sondern auch die Wirkung von LPS und die Wirkung der Kombination von Partikeln und LPS (Tab. 2.5). Die ausführlichen Versuchsergebnisse befindet sich im Anhang (Kapitel 8).

| Versuch P90 Gen/Protein | Genexpressionsänderung durch LPS | Genexpressionsänderung durch P90 | Genexpressionsändg. durch P90+LPS | Bemerkung |
|--|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| Cyclin H (CCNH); MO15-associated protein | ↔ keine Veränderung | ↑ 15.000% erhöht | ↔ keine Veränderung | P90 unterdrückt LPS-Wirkung |
| C-jun proto-oncogene | ↑ 290% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 280% erhöht | reine LPS-Wirkung |
| Cdc-2 related protein kinase P1SSLRE | ↔ keine Veränderung | ↑ 70% erhöht | ↑ 80% erhöht | reine P90-Wirkung |
| Protein kinase C beta I (PKC-beta-1) | ↔ keine Veränderung | ↔ keine Veränderung | ↑ 318.575% erhöht | reine P90+LPS-Wirkung |
| Ephrin type-A receptor 1 precursor | ↔ keine Veränderung | ↑ 50% erhöht | ↑ 190% erhöht | P90 + LPS synergistisch |
| Protein-tyrosin phosphatase 1E | ↔ keine Veränderung | ↔ keine Veränderung | ↑ 9.020% erhöht | reine P90+LPS-Wirkung |
| protein phosphatase PP2A 55-kDa regulatory subunit alpha isoform | ↑ 1.640% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↔ keine Veränderung | P90 unterdrückt LPS-Wirkung |
| Tumor necrosis factor precursor (TNF-alpha; TNFA) | ↑ 1.800% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 1.860% erhöht | reine LPS-Wirkung |
| Aromatic-L-amino-acid decarboxylase | ↔ keine Veränderung | ↔ keine Veränderung | ↑ 4.694.900% erhöht | reine P90+LPS-Wirkung |
| Desoxyribonuclease I (Dnase I) | ↔ keine Veränderung | ↔ keine Veränderung | ↑ 1.113.300% erhöht | reine P90+LPS-Wirkung |
| Intercellular adhesion molecule-1 precursor (ICAM1) | ↑ 750% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 480% erhöht | |
| Leukocyte adhesion glycoprotein LFA-1 alpha subunit precursor | ↑ 150% erhöht | ↔ prakt. nicht detekt. | ↔ prakt. nicht detekt. | P90 unterdrückt LPS-Wirkung |
| Macrophage inflammatory protein 1 beta precursor (MIP1-beta) | ↑ 10.180% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 3.600% erhöht | P90 verringert LPS-Wirkung |
| T-cell specific rantes protein precursor | ↑ 100% erhöht | ↑ 60% erhöht | ↔ prakt. nicht detekt. | |
| Macrophage inflammatory protein 2 alpha (MIP2-alpha) | ↑ 1.000% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 100% erhöht | P90 verringert LPS-Wirkung |
| Interleukin 1 beta precursor | ↑ 200% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 170% erhöht | reine LPS-Wirkung |
| Macrophage inflammatory protein 1 alpha precursor (MIP1-alpha) | ↑ 4.010% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 2.730% erhöht | P90 verringert LPS-Wirkung |
| Placenta growth factor 1 + 2 (PLGF1 + 2) | ↑ 580% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 470% erhöht | reine LPS-Wirkung |
| Interleukin 8 precursor | ↑ 2.220% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 1.150% erhöht | P90 verringert LPS-Wirkung |

Tab. 2.5 Veränderung der Expression ausgewählter Gene nach Inkubation von MM6-Zellen mit Printex 90. Das gesamte Ergebnis befindet sich im Anhang.

2. ERGEBNISSE

Wirkung von EC90 auf die Genexpression bei MM6-Zellen

Bei EC90 fanden sich wenig Hinweise auf eine direkte Wirkung der Partikel auf Veränderung der Genexpression (Tab. 2.6). EC90 verändert in größerem Maße die LPS-Wirkung, indem sie die LPS-induzierte Expressionserhöhung einiger Gene verringert.

| Versuch EC90 Gen/Protein | Genexpressionsänderung durch LPS | Genexpressionsänderung durch EC90 | Genexpressionsändg. durch EC90+LPS | Bemerkung |
|--|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| Serine/threonine-protein kinase PLK1 (STPK13) | ↓ 60% verringert | ↔ keine Veränderung | ↓ 55% verringert | reine LPS-Wirkung |
| Proto-oncogene c-jun | ↑ 210% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 210% erhöht | reine LPS-Wirkung |
| C-myc oncogene | ↓ 93% verringert | ↓ 35% verringert | ↓ 92% verringert | |
| Tumor necrosis factor precursor (TNF-alpha; TNFA) | ↑ 4.900% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 5.060% erhöht | reine LPS-Wirkung |
| IEX-1L anti death protein | ↑ 1.300% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 1.530% erhöht | reine LPS-Wirkung |
| Activator 1 37-kDa subunit | ↓ 78% verringert | ↓ 42% verringert | ↓ 91% verringert | |
| CCAAT/enhancer binding protein alpha | ↓ 82% verringert | ↔ keine Veränderung | ↓ 78% verringert | reine LPS-Wirkung |
| Estrogen receptor hSNF2b | ↓ 60% verringert | ↔ keine Veränderung | ↓ 80% verringert | reine LPS-Wirkung |
| Nuclease-sensitive element DNA-binding protein (NSEP) | ↓ 72% verringert | ↓ 52% verringert | ↓ 57% verringert | EC90 verringert LPS-Wirkung |
| NADH-ubiquinone oxidoreductase B18 subunit | ↑ 115% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 117% erhöht | reine LPS-Wirkung |
| I-rel (RELB) | ↔ keine Veränderung | ↑ 2.635% erhöht | ↔ keine Veränderung | reine EC90-Wirkung |
| Corticotropin releasing factor receptor precursor | ↑ 3.600% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 3.500% erhöht | reine LPS-Wirkung |
| Microsomal glutathion S-transferase 12 (GST12) | ↓ 73% verringert | ↓ 12% verringert | ↓ 25% verringert | EC90 verringert LPS-Wirkung |
| Glutathion S-transferase pi (GSTP1) | ↓ 76% verringert | ↓ 27% verringert | ↓ 27% verringert | EC90 verringert LPS-Wirkung |
| Alpha1 catenin (CTNNA1) | ↑ 72% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 116% erhöht | reine LPS-Wirkung |
| Intercellular adhesion molecule-1 precursor (ICAM1) | ↑ 1.610% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 2.030% erhöht | reine LPS-Wirkung |
| Macrophage inflammatory protein 1 beta precursor (MIP1-beta) | ↑ 1.375.740% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 906.900% erhöht | reine LPS-Wirkung |
| B94 protein | ↑ 250% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 420% erhöht | reine LPS-Wirkung |
| T-cell-specific rantes protein precursor | ↑ 96% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 177% erhöht | reine LPS-Wirkung |
| Macrophage inflammatory protein 2 alpha (MIP2-alpha) | ↑ 4.205.800% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 3.996.800% erhöht | reine LPS-Wirkung |
| Interleukin 1 beta precursor | ↑ 1.490% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 840% erhöht | EC90 verringert LPS-Wirkung |
| Macrophage inflammatory protein 1 alpha precursor (MIP1-alpha) | ↑ 4.460% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 5.100% erhöht | reine LPS-Wirkung |
| Placenta growth factor 1 + 2 (PLGF1 + 2) | ↑ 520% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 500% erhöht | reine LPS-Wirkung |

| Versuch EC90 | Genexpressionsänderung durch LPS | | Genexpressionsänderung durch EC90 | | Genexpressionsändg. durch EC90+LPS | | Bemerkung |
|---|----------------------------------|---------------|-----------------------------------|-------------------|------------------------------------|---------------|-----------------------------|
| Monocyte chemotactic protein 1 precursor (MCP1) | ↑ | 130% erhöht | ↔ | keine Veränderung | ↑ | 40% erhöht | EC90 verringert LPS-Wirkung |
| Interleukin 8 precursor | ↑ | 1.690% erhöht | ↔ | keine Veränderung | ↑ | 1.280% erhöht | reine LPS-Wirkung |

Tab. 2.6 Veränderung der Expression ausgewählter Gene nach Inkubation von MM6-Zellen mit EC90. Das gesamte Ergebnis befindet sich im Anhang.

Wirkung von Standard-Diesel-Ruß auf die Genexpression bei MM6-Zellen

Der Standard-Diesel-Ruß ist ein Referenzmaterial vom National Institute of Standards and Technology, USA, der durch den Betrieb von Dieselmotoren gewonnen und auf seinen Gehalt an organischen Verbindungen, vor allem aromatische Kohlenwasserstoffe, geprüft wurde. Ein Prüfzertifikat liegt vor und kann unter http://ois.nist.gov/srmcatalog/certificates/view_cert2.cfm?certificate=1650 im Internet abgerufen werden (Stand: Oktober 2000).

Von den drei untersuchten Partikeln hat der Standard-Diesel-Ruß (SDR) die meisten Effekte auf die Genexpression von MM6-Zellen (reine SDR-Wirkung als auch synergistische und modulierende Effekte mit LPS) (Tab. 2.7).

| Versuch SDR | Genexpressionsänderung durch LPS | | Genexpressionsänderung durch SDR | | Genexpressionsändg. durch SDR+LPS | | Bemerkung |
|--|----------------------------------|-------------------|----------------------------------|-------------------|-----------------------------------|-------------------|----------------------------|
| Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein (VHL) | ↔ | keine Veränderung | ↔ | keine Veränderung | ↑ | 397% erhöht | SD + LPS synergistisch |
| Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR1) | ↔ | keine Veränderung | ↓ | 59% verringert | ↔ | keine Veränderung | SD-Wirkung |
| Serine/threonine-protein kinase PLK1 | ↓ | 59% verringert | ↓ | 37% verringert | ↓ | 70% verringert | |
| Erythrocyte glucose transporter (GLUT1) | ↓ | 72% verringert | ↔ | keine Veränderung | ↓ | 66% verringert | reine LPS-Wirkung |
| C-myc oncogene | ↓ | 51% verringert | ↔ | keine Veränderung | ↓ | 50% verringert | reine LPS-Wirkung |
| Protein kinase MLK-3; sprk | ↔ | keine Veränderung | ↔ | keine Veränderung | ↓ | 67% verringert | SD + LPS synergistisch |
| Guanine nucleotide-binding protein G(i)(G(s))/G(t) beta subunit (GNB1) | ↑ | 200% erhöht | ↔ | keine Veränderung | ↑ | 441% erhöht | |
| Leukocyte-derived seven transmembrane domain receptor (LESTR) | ↔ | keine Veränderung | ↔ | keine Veränderung | ↓ | 73% verringert | SD + LPS synergistisch |
| DANN excision repair protein ERCC1 | ↔ | keine Veränderung | ↔ | keine Veränderung | ↓ | 57% verringert | SD + LPS synergistisch |
| Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) | ↔ | keine Veränderung | ↑ | 2.930.400% erhöht | ↔ | keine Veränderung | SD-Wirkung |
| Excision repair protein ERCC6 | ↔ | keine Veränderung | ↑ | 6.554% erhöht | ↔ | keine Veränderung | SD-Wirkung |
| Tumor necrosis factor precursor (TNF-alpha; TNFA) | ↑ | 3.270% erhöht | ↔ | keine Veränderung | ↑ | 56% erhöht | SD unterdrückt LPS-Wirkung |
| IEX-1L anti-death protein | ↑ | 1.347.000% erhöht | ↔ | keine Veränderung | ↑ | 2.036.300% erhöht | SD + LPS synergistisch |
| CD27 ligand (CD27LG) | ↑ | 109% erhöht | ↔ | keine Veränderung | | | reine LPS-Wirkung |
| CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP alpha) | ↓ | 86% verringert | ↔ | keine Veränderung | ↓ | 70% verringert | reine LPS-Wirkung |

2. ERGEBNISSE

| Versuch SDR | Genexpressionsänderung durch LPS | Genexpressionsänderung durch SDR | Genexpressionsändg. durch SDR+LPS | Bemerkung |
|---|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| P2X purinoceptor 1 | ↔ keine Veränderung | ↑ 1.875% erhöht | ↔ keine Veränderung | SD-Wirkung |
| PCAF-associated factor 65 alpha | ↓ 100% verringert | ↓ 98% verringert | ↓ 96% verringert | |
| Endothelial transcription factor GATA2 | ↓ 87% verringert | ↓ 71% verringert | ↔ keine Veränderung | |
| B-cell lymphoma 3-encoded protein (bcl-3) | ↔ keine Veränderung | ↔ keine Veränderung | ↑ 95% erhöht | SD + LPS synergistisch |
| Ets transcription factor; NERF2 | ↔ keine Veränderung | ↑ 383% erhöht | ↔ keine Veränderung | SD-Wirkung |
| Muscle cadherin precursor (M-cadherin) | ↔ keine Veränderung | ↑ 327% erhöht | ↔ keine Veränderung | SD-Wirkung |
| Serine/threonine-protein kinase receptor R2 (SKR2) | ↔ keine Veränderung | ↑ 9.006% erhöht | ↔ keine Veränderung | SD-Wirkung |
| MSX-1 homeobox protein | ↔ keine Veränderung | ↑ 763% erhöht | ↔ keine Veränderung | SD-Wirkung |
| Corticotropin releasing factor receptor 1 precursor (CRF-R; CRR1) | ↑ 157% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 212% erhöht | reine LPS-Wirkung |
| Intercellular adhesion molecule-1 precursor (ICAM1) | ↑ 1.280% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 1.428% erhöht | reine LPS-Wirkung |
| Heat-shock protein 40 (hsp40) | ↔ keine Veränderung | ↔ keine Veränderung | ↓ 52% verringert | SD + LPS synergistisch |
| Complement component 5 (C5) | ↔ keine Veränderung | ↑ 1.395.000% erhöht | ↔ keine Veränderung | SD-Wirkung |
| Alpha-1-antichymotrypsin precursor (ACT) | ↔ keine Veränderung | ↑ 1.440% erhöht | ↔ keine Veränderung | SD-Wirkung |
| Macrophage inflammatory protein 1 beta precursor (MIP1-beta) | ↑ 3.063.700% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 2.980.500% erhöht | reine LPS-Wirkung |
| B94 protein | ↑ 249% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 113% erhöht | SD verringert LPS-Wirkung |
| Dioxin-inducible cytochrom P450 1B1 (CYP1B1) | ↔ keine Veränderung | ↔ keine Veränderung | ↑ 324% erhöht | SD + LPS synergistisch |
| T-cell-specific rantes protein precursor | ↑ 60% erhöht | | ↔ keine Veränderung | SD unterdrückt LPS-Wirkung |
| Macrophage inflammatory protein 2 alpha (MIP2-alpha) | ↑ 3.880% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 4.157% erhöht | reine LPS-Wirkung |
| Interleukin 1 beta precursor (IL-1; IL1B) | ↑ 92% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 99% erhöht | reine LPS-Wirkung |
| Macrophage inflammatory protein 1 alpha precursor (MIP1-alpha) | ↑ 584% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 610% erhöht | reine LPS-Wirkung |
| Placenta growth factor 1 + 2 (PLGF1 + 2) | ↑ 196% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 228% erhöht | reine LPS-Wirkung |
| Interleukin 8 precursor | ↑ 643% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 1.270% erhöht | reine LPS-Wirkung |

Tab. 2.7 Veränderung der Expression ausgewählter Gene nach Inkubation von MM6-Zellen mit Standard-Diesel-Ruß (SDR). Das gesamte Ergebnis befindet sich im Anhang.

Auswahl interessanter Gene

Aus den oben dargestellten Ergebnissen zur Genexpression bei P90, EC90 und SDR wurden insgesamt 15 Gene ausgewählt (Tab. 2.8). Bei der Auswahl der Gene stand die Wirkung nur der Partikeln auf die Genexpression und die Stärke ihres Effekts im Vordergrund.

| Gen/Protein | Genexpressionsänderung durch LPS | Genexpressionsänderung durch Partikel | Genexpressionsänderung durch Part.+LPS |
|--|----------------------------------|---------------------------------------|--|
| P90 | | | |
| Cyclin H (CCNH); MO15-associated protein | ↔ keine Veränderung | ↑ 15.000% erhöht | ↔ keine Veränderung |
| Ephrin type-A receptor 1 precursor | ↔ keine Veränderung | ↑ 50% erhöht | ↑ 190% erhöht |
| EC90 | | | |
| I-rel (RELB) | ↔ keine Veränderung | ↑ 2.635% erhöht | ↔ keine Veränderung |
| SD | | | |
| Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) | ↔ keine Veränderung | ↑ 2.930.400% erhöht | ↔ keine Veränderung |
| Excision repair protein ERCC6 | ↔ keine Veränderung | ↑ 6.554% erhöht | ↔ keine Veränderung |
| Tumor necrosis factor precursor (TNF-alpha; TNFA) | ↑ 3.270% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 56% erhöht |
| P2X purinoceptor 1 | ↔ keine Veränderung | ↑ 1.875% erhöht | ↔ keine Veränderung |
| Ets transcription factor; NERF2 | ↔ keine Veränderung | ↑ 383% erhöht | ↔ keine Veränderung |
| Muscle cadherin precursor (M-cadherin) | ↔ keine Veränderung | ↑ 327% erhöht | ↔ keine Veränderung |
| Serine/threonine-protein kinase receptor R2 (SKR2) | ↔ keine Veränderung | ↑ 9.006% erhöht | ↔ keine Veränderung |
| MSX-1 homeobox protein | ↔ keine Veränderung | ↑ 763% erhöht | ↔ keine Veränderung |
| Complement component 5 (C5) | ↔ keine Veränderung | ↑ 1.395.000% erhöht | ↔ keine Veränderung |
| Alpha-1-antichymotrypsin precursor (ACT) | ↔ keine Veränderung | ↑ 1.440% erhöht | ↔ keine Veränderung |
| Interleukin 1 beta precursor (IL-1; IL1B) | ↑ 92% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 99% erhöht |
| Interleukin 8 precursor | ↑ 643% erhöht | ↔ keine Veränderung | ↑ 1.270% erhöht |

Tab. 2.8 Veränderung der Expression ausgewählter Gene nach Inkubation von MM6-Zellen mit Printex 90 (P90), elementarem Kohlenstoff (EC90) und Standard-Dieselmotoren-Ruß (SDR). Das gesamte Ergebnis befindet sich im Anhang.

Die ausgewählten Gene und ihre Bedeutung werden im Kapitel 3. Diskussion besprochen.

3. Diskussion

3.1 Modell des Alveolarmakrophagen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden primäre Zellen und Zell-Linien verwandt. Das Arbeiten mit Zell-Linien hat mehrere Vorteile. Die Zellen lassen sich relativ leicht und oft passagieren und können lange Zeit in Kultur gehalten werden. Sie können in flüssigem Stickstoff gelagert werden und sind deshalb für unbegrenzte Zeit verwendbar. Da eine Zell-Linie meist von nur einem Zellklon abstammt, ist sie gut charakterisiert. Es können interindividuelle Schwankungen ausgeschlossen werden und die Resultate sind mit niedrigen Schwankungsbreiten reproduzierbar. Als Makrophagenmodell wurden zwei Zell-Linien eingesetzt, die Maus-Makrophagen-Linie J774A.1 und die humane Monozyten-Linie Mono Mac 6 (MM6).

Die Linie J774A.1 entstammt der BALB/c-Maus und ist aus einem Sarkom hervorgegangen [54]. Sie besitzt Eigenschaften von Makrophagen wie Adhärenz, Morphologie, Fc-Rezeptoren, Sekretion von Lysozym [54, 55] und ist zu einer effektiven Phagozytose befähigt [56], wobei sie auch Antikörper-opsonierte Antigene erkennt [57]. Ihre Reaktion nach Stimulation mit LPS oder Polystyrolatex-Partikeln ist gut charakterisiert [58].

Die humane Zell-Linie MM6 wurde aus dem Blut eines Patienten mit monoblastischer Leukämie etabliert. Sie besitzt Charakteristika reifer Monozyten und stehen deshalb den Eigenschaften von Makrophagen sehr nahe (Morphologie, Phagozytose, Oxidativer Burst, Oberflächenrezeptoren) [59].

Zell-Linien haben den Nachteil, daß genetische Veränderungen stattgefunden haben, die zu ihrer Immortalisierung geführt haben, aber auch andere Eigenschaften der Zelle betreffen können. Welchen Einfluß die genetischen Veränderungen auf die Übertragbarkeit der Experimente auf das Verhalten primärer Zellen haben, ist mitunter schwierig. Deshalb wurden auch primäre Zellen untersucht. Zum Einsatz kamen humane Monozyten aus peripherem Blut, humane Pleuramakrophagen, Alveolarmakrophagen von der Ratte, von Beagle-Hunden und vom Menschen.

3.2 Zytoskelett und Phagozytose

3.2.1 Untersuchungen mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM)

Mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops [60] wurde die Struktur des Zytoskeletts und seine Rolle bei der Phagozytose sowie der Einfluß der Zytoskelettgifte Cytochalasin D (zerstört Aktin-Filamente) und Colchicin (zerstört Mikrotubuli) auf die Phagozytose untersucht. Das CLSM bietet den Vorteil, daß man eine räumliche Vorstellung vom Zytoskelett der Zelle bekommt und man einen Eindruck darüber erhält, mit welchen zytoskelettalen Strukturen die Partikeln räumlich assoziiert sind [61].

Ungehinderte Phagozytose

Eine erfolgreiche Phagozytose hängt von einem funktionsfähigen Aktin-Zytoskelett ab [62], wie es in Abb. 2.1 a zu sehen ist. Nur bei gegebener Dynamik von Aktin-Polymerisation und -Depolymerisation sind die Zellen in der Lage, chemotaktisch auf die Fremdkörper zuzuwandern (Migration, Lokomotion) [63, 64] und Pseudopodien zu bilden, die die phagozytierenden Partikeln umschließen und in den Zellkörper aufnehmen [63]. Dabei kann es neben der eigentlichen Phagozytose zu weiteren Prozessen kommen, wie z.B. zum Oxidativen Burst, die durch Weitergabe von Signalen über intrazelluläre Signaltransduktionsketten in der Zelle ausgelöst werden [65]. Auf den Oxidativen Burst kommen wir in Abschnitt 3.3 zurück.

Kurz nach der erfolgreichen Phagozytose sind die Partikeln, eingeschlossen in Phagosomen, mit Aktin-Filamenten assoziiert (Abb. 2.2 a) und werden zum weiteren Transport in der Zelle an die Mikrotubuli-Filamente weitergegeben [66, 67] und an ihnen wie auf intrazellularen Schienen transportiert [68, 69]. Während ihres Mikrotubuli-abhängigen Transports „reifen“ die Phagosomen, d.h. sie werden verändert, indem sie z.B. mit Lysosomen zu Phagolysosomen verschmelzen [68, 69], um ihren Inhalt enzymatisch zu verdauen. Bewegt werden die Phagosome durch Motorproteine, die mit Hilfe von „Mikrotubuli assoziierten Proteinen“ (MAP) [70] an die Mikrotubuli binden. Die Motorproteine sind Kinesin und zytoplasmatisches Dynein [71]. Beide Proteinklassen sind ATPasen, wobei die chemische Energie bei der Phosphat-Abspaltung in mechanische Energie umgesetzt wird und die Mikrotubuli als Widerlager für die Fortbewegung der Phagosomen dienen [72 - 74].

Die Hauptbewegungsrichtung der Phagosome entlang der Mikrotubuli ist zentripetal, d.h. zum „Minus“-Ende des Mikrotubulus hin [75]. Das „Minus“-Ende der Tubulinfilamente liegt in einer kernnahen Region, von der aus auch alle anderen Mikrotubuli der Zelle entspringen, weshalb es als „Mikrotubulus Organisierendes Zentrum“ (MOC) oder Centrosom bezeichnet wird. In Abb. 2.1 b ist das Tubulin-Gerüst von J774A.1-Mausmakrophagen durch Fluoreszenzfärbung dargestellt. Das Zentrosom ist als dichte Fläche in der Mitte der Zelle zu erkennen, von der alle Mikrotubuli ausgehen.

Abb. 2.2 zeigt den ungehinderten Verlauf der Phagozytose. Nach zweistündiger Inkubation der J774A.1-Zellen sind viele der angebotenen Bakterien (*Staphylococcus aureus*, grün markiert) in Phagosomen verpackt in die Zelle aufgenommen worden. Wie Abb. 2.2 a zeigt, liegen einige der mit Bakterien gefüllten Phagosomen noch nahe der Zellperipherie, in der Aktinfilamente in hoher Dichte vorkommen (rote, homogene Bereiche und rote, radiär verlaufende Filamente). Nur noch wenige (grüne) Bakterien liegen außerhalb der Zelle. Der größere Teil der Bakterien ist in den Phagosomen schon weiter ins Zellinnere „gewandert“ und mit den Mikrotubuli assoziiert (Abb. 2.2 b). Die Momentaufnahme nach 2 h 45 min läßt die zentripetale Bewegungsrichtung der Bakterien-beladenen Phagosomen erkennen [75].

Phagozytose nach Cytochalasin D - Behandlung

Cytochalasin D-Konzentrationen im mikromolaren Bereich hemmen die Anlagerung neuer Untereinheiten (G-Aktin) an die Aktin-Filamente (F-Aktin) [76]. Da die Filamente einem ständigen Umbau unterworfen sind, werden sie kontinuierlich ab- und abgebaut. Nach Blockade des Aufbaus durch Cytochalasin D depolymerisieren die Filamente schließlich. Das

Resultat ist ein weitgehende Zerstörung der Filamente. In Abb. 2.3 a und b sind Zellen dargestellt, deren Aktin-Filamente rot markiert wurden. Bereits bei 1 μM Cytochalasin D sind die in Abb. 2.2 a noch sichtbaren filamentösen Anteile des Aktins weitgehend verschwunden. Innerhalb der Zelle beginnen sich globuläre Ansammlungen von Aktin anzudeuten. Nach Behandlung mit 5 μM Cytochalasin D ist die Organisation des Aktin-Zytoskeletts vollkommen aufgelöst (Abb. 2.3 b). Die Phagozytose ist bereits bei der geringen Cytochalasin D-Konzentration reduziert (vgl. Abb. 2.5). Untersuchungen von Painter und Koautoren an primären Peritonealmakrophagen der Maus bestätigen diese Ergebnisse [77]. Nicht nur die Phagozytose, sondern auch die Mobilität der Zellen ist mit der Zerstörung der Aktin-Filamente eingeschränkt, wie Wallace et al. bei Neutrophilen Granulozyten zeigten [78].

Auffällig ist auch die Gestaltveränderung der Zellen. Die Ausbreitung und das Anhaften der Zelle an den Untergrund geschieht über spezielle Rezeptoren in der Zellmembran, z.B. den Integrinen [79], die mit den Aktin-Filamenten verbunden sind und der Zelle erlauben, in ihrer Peripherie flächige, mit wenig Zytoplasma gefüllte Bereiche ihres Zell-Leibes zu bilden („cell spreading“), der dem Untergrund dicht anhaftet. Dieser Prozeß ist stark vom Aktin abhängig. So konnten Mooney und Mitarbeiter [80] zeigen, daß mit der Anhaftung der Zelle an den Untergrund eine 20-fache Erhöhung ihres Gehaltes an filamentösem Aktin verbunden ist. Die Zerstörung des Aktins mit Cytochalasin D hob in Übereinstimmung zu den Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit auch bei den Untersuchungen von Mooney et al. das typische Ausbreiten der Zelle auf [80].

Phagozytose nach Colchicin-Behandlung

Nach Behandlung der J774A.1-Mausmakrophagen mit 10 μM Colchicin (Abb. 2.4) ist keine filamentöse Struktur mehr zu erkennen. Die Mikrotubuli sind in ihre Untereinheiten depolymerisiert. Die Phagozytose verlief weitgehend unbeeinflusst ab, da sie primär ein Aktin-getragener Prozeß ist [62]. In den Fluoreszenzbildern und bei der Auszählung der phagozytierten Bakterien (Abb. 2.5) konnte dennoch eine leichte Abnahme (5 %) der Phagozytose nach Colchicin-Behandlung nachgewiesen werden. Die Arbeit von Kuhn [81] unterstützen diese Ergebnisse. Kuhn fand bei der Mausmakrophagen-Linie P388D1 neben der erwarteten Anfälligkeit der Zellen bei der Phagozytose von Bakterien (*Listeria monocytogenes*) gegenüber Cytochalasin D einen Einfluß von Colchicin und Nocodazol auf die Phagozytose. Nocodazol ist wie Colchicin eine Substanz, die die Mikrotubuli depolymerisiert. Nach Kuhns Ergebnissen ist diese Colchicin-abhängige „Empfindlichkeit“ der Phagozytose zelltypabhängig [81].

Durch die Depolymerisierung der Mikrotubuli ist kein geordneter Transport der Phagosomen möglich und wahrscheinlich auch die weitere „Verarbeitung“ des Phagosomeninhalts eingeschränkt, wie z.B. die Verschmelzung der Phagosomen mit Lysosomen, um den enzymatischen Abbau einzuleiten. Diese Vermutung liegt nahe, denn nicht nur der Phagosomentransport, sondern auch die Organisation anderer intrazellulärer Organellen wie des Endoplasmatischen Retikulums, des Golgi-Apparates oder die Morphologie von Lysosomen sind abhängig vom Mikrotubuli-Zytoskelett [82, 83].

Nach den Untersuchungen mit dem CLSM und dem Lichtmikroskop sind Colchicin-behandelte J774A.-Mausmakrophagen etwa 20 % kleiner als unbehandelte Zellen. Das

Zellvolumen wird also hauptsächlich vom Tubulin-Zytoskelett aufrechterhalten und gesteuert. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden durch Untersuchungen von Melmed und Koautoren bestätigt, die bei J774.2-Mausmakrophagen (J774.2 und J774A.1 sind Klone der J774A-Mausmakrophagen) ebenfalls eine Volumenverminderung um 20 % gefunden haben [84].

Wirkungsspezifität von Cytochalasin D und Colchicin

Um die Wirkungsspezifität der beiden Zytoskelettnoxen zu belegen, wurden J774A.1-Mausmakrophagen mit Cytochalasin D behandelt und mittels Immunfluoreszenzmarkierung die Mikrotubuli sichtbar gemacht und umgekehrt. Morphologisch konnte keine Beeinflussung der Mikrotubuli durch Cytochalasin D bzw. der Aktin-Filamente durch Colchicin festgestellt werden. Tsai und Koautoren [85] berichten von einer Zerstörung der Mikrotubuli bei humanen Neutrophilen Granulozyten, wobei mit Colchicin-Konzentrationen $< 1 \mu\text{M}$ keine Beeinflussung der Aktin-Filamente festgestellt werden konnten. Behandlung der Zellen mit $10 \mu\text{M}$ Colchicin führten zu einem 17 %igen Anstieg der Aktin-Filamente [85]. Die Vorstellung, ein höherer F-Aktin-Anteil könnte sich in einer erhöhten Phagozytoserate Colchicin-behandelter Zellen widerspiegeln, konnte nicht bestätigt werden. Die Phagozytose der Colchicin-behandelten J774A.1-Mausmakrophagen ist leicht geringer (Abb. 2.5) und stimmt dabei mit den Ergebnissen von Kuhn [81] überein. Wahrscheinlich versucht die Zelle der Volumenverminderung entgegenzuwirken [84], die durch die Zerstörung der Mikrotubuli entstanden ist.

3.2.2 Untersuchungen mit dem Durchflußzytometer

Die Untersuchung der Phagozytose durch mikroskopische Techniken ist sehr zeitaufwendig und nur eine verhältnismäßig kleine Menge der im Versuch eingesetzten Phagozyten kann untersucht werden. Durch den Einsatz des Durchflußzytometers kann die Phagozytoseaktivität von mehreren Tausend Zellen *in vitro* schnell durch Analyse jeder einzelnen Zelle gemessen werden [86]. Die zu phagozytierenden Partikeln sind dabei mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Menge an phagozytierten Partikeln wird in Form der mittleren Fluoreszenzintensität angegeben, die die gemessene Zellpopulation emittiert. Ist die durchschnittliche Fluoreszenz eines Partikels bekannt, kann man rechnerisch auf ihre Zahl zurückschließen. Um nicht phagozytierte, außen an der Zelle anhaftende Partikeln von phagozytierten, also in die Zelle aufgenommene Partikeln unterscheiden zu können, wird der Zellsuspension vor der Messung Trypanblau zugesetzt, das die Fluoreszenz aller extrazellulär verbliebenen Partikeln stark vermindert („Quenching“) [87, 88]. Da Trypanblau die intakte Zellmembran nicht passieren kann, bleibt die Fluoreszenz der phagozytierten Partikeln uneingeschränkt erhalten.

Zur Untersuchung der Phagozytose-Eigenschaften wurden J774A.1-Mausmakrophagen, MM6, Beagle-Alveolarmakrophagen, humane PBMC und humane Alveolarmakrophagen eingesetzt, denen folgende fluoreszenzmarkierte Partikeln angeboten wurden: Polystyrollatex, Bakterien (*S. aureus*) und Hammel-Erythrozyten (SRBC).

Phagozytosekinetik

Abb. 2.6 und 2.7 zeigen die Phagozytosekinetik von J774A.1-Mausmakrophagen, denen Polystyrollatex-Partikeln bzw. Bakterien (*S. aureus*) zur Phagozytose angeboten wurden. Die Mausemakrophagen phagozytieren die Partikeln sehr schnell und sehr effektiv, wobei die Phagozytose der Bakterien etwas schneller abläuft. Dies könnte ein Anhaltspunkt dafür sein, daß zwei verschiedene Rezeptoren bzw. Phagozytosesysteme existieren, über die die verschiedenen Partikeln aufgenommen werden. Tatsächlich sind unterschiedliche Oberflächenrezeptoren [36, 89 - 91] und Phagozytose-Mechanismen [92] bekannt, die die Aufnahme von Partikeln bei der Phagozytose vermitteln. Im Rahmen dieser Arbeit sind der Fc-, der Komplement- und der Scavenger-Rezeptor von Interesse. Der Fc-Rezeptor sorgt für die Einleitung der Phagozytose von Partikeln, die mit Immunglobulinen (Antikörpern) markiert sind [93], die z.B. in Folge einer bakteriellen Infektion vom Immunsystem gebildet werden. Über den Komplement-Rezeptor werden Partikeln aufgenommen, die mit Komplement-Komponenten markiert sind. Das sind niedermolekulare Proteine, die dauernd im Serum vorhanden sind und an Antigene unspezifisch binden [91] und sie dadurch zur Aufnahme über den Rezeptor markieren. Durch Hitzeinaktivierung von Serum, d.h. Erhitzung auf 56°C für 30 min kann man die Komplement-Proteine zerstören und ihren Einfluß auf die Phagozytose ausschalten. Der Gruppe von Scavenger-Rezeptoren wurde als Rezeptoren beschrieben, über den acetylierte oder oxidierte Proteine [94, 95], aber auch nichtopsonierte Umweltpartikeln wie TiO₂, Eisenoxid und Quarz, aber auch Polystyrollatex-Partikeln aufgenommen werden [36].

Abhängigkeit der Phagozytose von Membranrezeptoren und Zytoskelettkomponenten

Gemeinsam ist all den Rezeptoren, daß sie mit dem Zytoskelett in Verbindung stehen, um die Phagozytose einzuleiten. Um dies zu belegen, wurden J774A.1-Mausmakrophagen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cytochalasin D behandelt und die Phagozytose von Polystyrollatex-Partikeln untersucht (Abb. 2.8). Nach Zerstörung der Aktin-Filamente kommt es zur konzentrationsabhängigen Verminderung der Phagozytose, die bei 40 µM Cytochalasin D um 60 % reduziert ist. Durch die verminderte Phagozytose ist der Anteil der Partikeln erhöht, die außen an der Zelle anhaften, da nur die Aufnahme in die Zelle, nicht aber die Bindung an den Rezeptor unterdrückt ist.

Die Unterdrückung der Phagozytose der Polystyrollatex-Partikeln ist nicht so effizient wie die von Bakterien (Abb. 2.10). Bei J774A.1 und humanen Alveolarmakrophagen konnte durch nur 1 µM Cytochalasin D die Phagozytose um über 90 % vermindert werden. Der Anteil der außen an der Zelle anhaftenden Bakterien (schraffierte Balken) ist bei der ungestörten Phagozytose als auch bei der Cytochalasin D-behandelten Zellen ungefähr gleich groß, da nur eine begrenzte Anzahl Rezeptoren zur Verfügung stehen und an allen Bakterien gebunden sind.

Die unterschiedliche Hemmbarkeit der Phagozytose von Polystyrollatex-Partikeln (Abb. 2.8) bzw. Bakterien (Abb. 2.10) liegt vermutlich daran, daß die beiden Partikeln von verschiedenen Rezeptoren erkannt werden. Vom beteiligten Rezeptor wiederum ist die Art und die Anordnung die an der Phagozytose beteiligten Zytoskelettproteine, und damit auch die Eigenschaften und Kinetik der Phagozytose abhängig. Gestützt wird diese Erklärung durch

eine Arbeit von Allen und Koautor [89], die bei der Phagozytose über den Fc- bzw. den Komplement-Rezeptor eine unterschiedliche Verteilung von Aktin-Filamenten und aktinbindenden Proteinen beim Phagozytosevorgang zeigen konnten. Eine Übersicht über wichtige Unterschiede der molekularen Mechanismen der Phagozytose über verschiedene Rezeptoren haben Aderem und Underhill zusammengestellt [90].

Kobzik hat für die Aufnahme von Polystyrolatex-Partikeln bei Hamster-Alveolarmakrophagen den Scavenger-Rezeptor identifiziert [36]. Über welchen Rezeptor unbehandelte Bakterien aufgenommen werden, läßt sich nicht eindeutig zuordnen, wahrscheinlich sind mehrere Rezeptor-Gruppen in der Lage, nicht markierte Bakterien zu erkennen. Le Cabec und Koautoren berichten über die Aufnahme von (Gram-positiven) Mykobakterien über einen Komplement-Rezeptor [96], der bestimmte Zuckergruppen auf der Bakterienoberfläche erkennt. Aber auch in der Gruppe der Scavenger-Rezeptoren scheint es Vertreter zu geben, die bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) erkennen. Hampton und Mitarbeiter [97] berichten von einem Scavenger-Rezeptor bei Makrophagen, der bakterielles LPS erkennt und aufnehmen kann. Es wird aber nicht die ganze Bakterienzelle erkannt und phagozytiert. Zudem ist LPS ein Hauptbestandteil der Zellwand Gram-negativer Bakterien, die in den Versuchen der vorliegenden Arbeit eingesetzten Bakterien sind Gram-positiv und besitzen kein LPS. Palecanda und Mitarbeiter beschreiben den Scavenger-Rezeptor MARCO, über den nichtopsonierte Bakterien aufgenommen werden [98], wobei Gram-negative Bakterien (*E. coli*) um 30 % besser phagozytiert wurden als Gram positive (*S. aureus*).

Kobzik hat zur Untersuchung der Scavenger-Rezeptoren Polyinosinsäure (PIS) und Dextransulfat (DexS) eingeführt, die an den Rezeptor binden und ihn durch kompetitive Hemmung blockieren [36]. Dabei blockiert PIS effektiver als DexS, was Kobzik auf die kleinere Größe des PIS-Moleküls und damit auf seinen besseren Zugriff auf die Rezeptoren zurückführt. Mit primären Hundealveolarmakrophagen und nichtmarkierten und AK-markierten Bakterien (*S. aureus*) wurden Blockungsexperimente mit PIS und DexS durchgeführt (Abb. 2.21 und 2.22). Abb. 2.21 bestätigt die effektivere Aufnahme der AK-markierten Bakterien über den Fc-Rezeptor, die starke Einschränkung der Phagozytose durch Cytochalasin D und die schwache durch Colchicin. Wurden die Scavenger-Rezeptoren der Beagle-Alveolarmakrophagen mit PIS blockiert, verringerte sich die Phagozytose von nichtmarkierten Bakterien um 43 %, die der AK-markierten Bakterien nur um 14 %. Die starke Verminderung der Phagozytose der nichtmarkierten Bakterien ist ein Hinweis auf die Phagozytose über den Scavenger-Rezeptor. DexS blockiert wie von Kobzik berichtet [36] mit einer 27 %igen Verminderung die Phagozytose von nichtmarkierten Bakterien. Die Verminderung der Phagozytose von AK-markierten Bakterien liegt mit 11 % in der gleichen Größenordnung wie die von PIS. Diese Beobachtung läßt vermuten, daß die Beeinflussung der Fc-Rezeptor-vermittelten Phagozytose durch PIS (14 %) und DexS (11 %) unspezifisch ist. Sie ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß PIS und DexS einen zusätzlichen, unspezifischen Phagozytosereiz auf die Zelle ausübt, auf den die Zelle auf Kosten der Fc-Rezeptor-Phagozytose zusätzlich reagieren muß.

Um die Phagozytose über den Fc-Rezeptor weiter zu untersuchen, wurden den Zellen rote Blutkörperchen (Erythrozyten) angeboten [99], die mit Antikörper (Immunglobulin G) markiert waren. Nichtmarkierte rote Blutkörperchen werden von Phagozyten nicht erkannt und deshalb nicht aufgenommen [100]. Mit der Antikörper-Markierung wird erreicht, daß die Erythrozyten nur über den Fc-Rezeptor phagozytiert werden (Abb. 2.20 zeigt diesen Effekt bei MM6- und J774A.1-Zellen). Bei humanen Blutmonozyten (PBMC) führt die Behandlung der Zellen mit Cytochalasin D, und damit die Depolymerisierung der Aktin-Filamente, zu einer starken Abnahme der Phagozytose (Abb. 2.11 bis 2.13). Die gleichen Ergebnisse wurden bei humanen Alveolarmakrophagen gefunden, die durch bronchoalveoläre Lavage an gesunden Freiwilligen gewonnen wurden (Abb. 2.14). Zur Kontrolle wurden auf den humanen Alveolarmakrophagen zwei wichtigen Subklassen des Fc-Rezeptors, nämlich CD32 und CD64, durchflußzytometrisch nachgewiesen (Abb. 2.16).

Die Phagozytose über den Fc-Rezeptor läßt sich durch Depolymerisation der Aktin-Filamente in der gleichen Größenordnung hemmen wie beim Komplement-Rezeptor.

Die Zerstörung der Mikrotubuli durch Colchicin (Abb. 2.9) hat nur geringe Auswirkungen auf die Phagozytose. Sie führt bei den getesteten Zellen (J774A.1, Abb. 2.9; humane PBMC, Abb. 2.12; humane Alveolarmakrophagen, Abb. 2.14; Beagle-Alveolarmakrophagen, Abb. 2.21) nur zu einer 5 bis 10 %igen Verminderung der Phagozytose. Allen und Aderem [89] haben in ihren Untersuchungen Hinweise gefunden, daß intakte Mikrotubuli für die Komplement-Rezeptor-gestützte Phagozytose notwendig sind. Bei den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit war die Phagozytose-Verminderung durch Colchicin unabhängig von der Art des zu phagozytierenden Partikels. Cannon und Swanson [37] haben bei ihren Arbeiten Hinweise darauf gefunden, daß die Phagozytose deshalb Mikrotubuli-abhängig ist, weil sie für die Koordinierung des Zytoplasma beim Phagozytosevorgang, d.h. bei der Einstülpung der Partikeln ins Zellinnere verantwortlich sind. Dies deutet ebenfalls auf einen Mechanismus hin, der unabhängig vom beteiligten Rezeptor ist.

Effektivitätssteigerung der Phagozytose durch Markierung der Partikeln

Neben der unterschiedlichen Abhängigkeit der Phagozytose über die drei verschiedenen Rezeptor-Gruppen gibt es noch einen Unterschied in der Schnelligkeit und damit Effektivität, mit der die Phagozytose abläuft. Am effektivsten werden Partikeln über den Fc-Rezeptor phagozytiert. Voraussetzung dafür ist, daß eine Immunreaktion, stimuliert durch die Antikörper (IgG)-Markierung des Partikels, stattgefunden hat. Durch die Phagozytose über den Fc-Rezeptor wird die Zelle z.B. im Vergleich der Phagozytose über den Komplement-Rezeptor immunologisch stark aktiviert [91].

Vergleicht man die Phagozytose von Polystyrolatex-Partikeln mit solchen, die mit Antikörpern (IgG) markiert wurden, ist die Phagozytose über den Fc-Rezeptor innerhalb der ersten 30 min bereits um ein Viertel höher als bei den nicht-AK-opsonierten Polystyrolatex-Partikeln (Abb. 2.17). Dies gilt auch für die Phagozytose von Bakterien (*S. aureus*) bei J774A.1-Mausmakrophagen (Abb. 2.18). Bei MM6 ist nach 2,5-stündiger Phagozytose die Aufnahme von AK-markierten Bakterien um 75 % höher als bei nichtopsonierten Bakterien (Abb. 2.19).

Bei den durchflußzytometrischen Untersuchungen ist die Zahl der untersuchten Zellen, die Gesamtfluoreszenz der phagozytierten Zellen, die durchschnittliche Fluoreszenz eines Partikels und der Anteil der phagozytierenden Zellen bekannt. Mit diesen Zahlen kann man die Anzahl der phagozytierten Partikeln pro Zelle errechnen. Die errechneten Zahlen sind keine absoluten Angaben, sondern spiegeln nur das ungefähre Verhältnis von phagozytierten Partikeln zu den Zellen wider (Tab. 2.2). Nach einer 13-stündigen Phagozytose von Bakterien hatten J774A.1-Mausmakrophagen pro Zelle im Durchschnitt etwa 4 nicht opsonierte Bakterien phagozytiert. Im Ansatz mit den AK-markierten Bakterien waren es 6 pro Zelle.

3.3 Oxidativer Burst

Um bei Phagozyten einen oxidativen Burst auszulösen, gibt es mehrere Möglichkeiten. Eine dieser Möglichkeiten ist die Stimulation der Zellen mit Phorbol-Myristat-Acetat (PMA), einem Phorbol-ester, der die Proteinkinase C (PKC) in der Zelle aktiviert, die eine wichtige Komponente intrazellulärer Signalwege darstellt [38]. Eine andere Möglichkeit ist die Verabreichung von Lipopolysacchariden (LPS), einem Zellwandbestandteil Gram-negativer Bakterien, der eine starke Aktivierung von Phagozyten zur Folge hat. Abb. 2.23 gibt eine Übersicht über den Oxidativen Burst von J774A.1-Mausmakrophagen, PBMC, humane Pleuramakrophagen und MM6 nach Stimulation mit verschiedenen Substanzen.

Einfluß des Zytoskeletts auf den Oxidativen Burst

Im vorigen Kapitel wurde diskutiert, daß das Zytoskelett für die Phagozytose wichtig ist und daß neben den Aktin-Filamenten, die die Aufnahme der Partikeln in die Zelle steuern, auch die Mikrotubuli für einen reibungslosen Phagozytose-Ablauf notwendig sind. Beeinflußt das Zytoskelett auch den Oxidativen Burst?

Die bloße Verabreichung der Aktin-depolymerisierenden Substanz Cytochalasin D oder der Mikrotubuli-depolymerisierenden Substanz Colchicin löst in humanen PBMC (Abb. 2.24) sowie in primären Ratten-Alveolarmakrophagen (Daten nicht gezeigt) keinen Oxidativen Burst aus. Wird z.B. mit PMA ein Burst provoziert und dann Cytochalasin D bzw. Colchicin verabreicht, zeigen die unter Cytochalasin D einen reduzierten, und die unter Colchicin einen unveränderten Burst (Abb. 2.24). Die gemessenen Veränderungen sind nicht signifikant. Möglicherweise greift die Aktivierung der PKC durch PMA stark in zelluläre Mechanismen ein und aktiviert weitere Signalwege. So kann z.B. der Ca^{2+} -Haushalt der Zelle beeinflußt werden, der wiederum Auswirkung auf den Oxidativen Burst hat [38].

Wurden primäre Ratten-Alveolarmakrophagen mit Komplement-opsoniertem Zymosan stimuliert, so kam es zu einem starken Oxidativen Burst (Abb. 2.27). Zymosan ist Zellwandmaterial der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*), das mit Komplement-Proteinen markiert (opsoniert) wurde. Es wird über den Komplement-Rezeptor erkannt, die Phagozytose eingeleitet und einen starken Oxidativen Burst ausgelöst. Den Ratten wurden in diesem Versuch 24 Stunden vor der Gewinnung der Alveolarmakrophagen A. dest. bzw. LPS-

Lösung in die Lunge instilliert. Der durch opsoniertes Zymosan (α Zym) ausgelöste Oxidative Burst ist bei den zuvor LPS-instillierten Ratten höher, da die Alveolarmakrophagen gegenüber denen der A. dest.-instillierten Tiere vorstimuliert sind (Abb. 2.27). Die interessante Beobachtung ist jedoch, daß der Burst signifikant durch die Gabe von Cytochalasin D zu hemmen ist. Der Oxidative Burst setzt intakte Aktin-Filamente voraus.

Wie ist das zu erklären? Für die Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies ist ein Enzymkomplex namens NADPH-Oxidase verantwortlich, der in ruhenden Zellen in seine Untereinheiten dissoziiert vorliegt. Wird die Zelle aktiviert, muß er zusammengebaut werden, wobei einige Untereinheiten vom Zytoplasma mit anderen Untereinheiten, die sich in der Zellmembran befinden, zusammengeführt werden müssen [38] (siehe auch Einleitung). Für die Translokation der zytoplasmatischen Untereinheit sind die Aktin-Filamente zuständig [38, 101]. Sind diese depolymerisiert, ist der Zusammenbau und damit die Funktion der NADPH-Oxidase eingeschränkt.

Induktion des Oxidativen Bursts durch ultrafeinen Partikeln

In den Industrieländern muss von einer Partikel-Belastung der Atemluft ausgegangen werden, wobei der Anteil der ultrafeinen Partikeln immer größer wird (siehe Einleitung). Zwei ultrafeine Test-Partikelsysteme (P90 und EC90) wurden auf ihre potentielle Wirkung, bei humanen Blut-Monozyten (PBMC) einen Oxidativen Burst auszulösen, untersucht (Abb. 2.25). P90 löst in PBMC einen Burst aus, der mit steigender Konzentration der Partikeln zunimmt. Bei P90-Partikeln (32 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ist der Burst mehr als doppelt so hoch wie mit PMA. Die EC90-Partikeln lösen ebenfalls einen Oxidativen Burst aus, der jedoch viel niedriger ist, als der von P90 und PMA. Die Ergebnisse, die mit den gleichen Partikeln bei humanen Pleuramakrophagen durchgeführt wurden (Abb. 2.26) zeigen ebenfalls mit P90 einen stärkeren Burst als mit EC90, wobei der von P90 provozierte Oxidative Burst nicht so hoch wie bei den PBMC war und im Bereich der PMA-Kontrollstimulation lag.

Beide Partikelsysteme, P90 wie auch EC90, bestehen aus Kohlenstoff und unterscheiden sich in ihrer spezifischen Oberfläche (P90: 300 m^2/g , EC90: 600 m^2/g). Da mehrere Studien [2, Übersicht in 1] die Hypothese unterstützen, daß ultrafeine Partikeln ein größeres inflammatorisches Potential besitzen, hätte man aufgrund der größeren spezifischen Oberfläche bei EC90 einen stärkeren Oxidativen Burst erwarten müssen als bei P90.

Konsistent sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu Untersuchungen von Li und Koautoren [102, 103] sowie Stone et al. [104], die darauf hinweisen, daß ultrafeine Partikeln eine oxidative Kapazität besitzen. Diese Kapazität ist mit der physikalischen Beschaffenheit der Partikeloberfläche korreliert. Stone [104] arbeitete ebenfalls mit P90, das in seiner oxidativen Potenz stärker war als Partikeln aus dem gleichen Material, aber geringerer spezifischen Oberfläche.

Warum aber war der Oxidative Burst in PBMC mit EC90 niedriger als mit P90? Die Reinheit von EC90 ist höher als die von P90, das 0,02 % Übergangsmetalle enthält [105]. Somit wäre es möglich, daß eine Reaktion nach Fenton, die mit Eisen Sauerstoffradikale erzeugen kann, ursächlich für den höheren Oxidativen Burst (mit-) verantwortlich ist. Neue Untersuchungen von Stone und Koautoren [106] kamen jedoch zu dem Ergebnis, daß die höhere oxidative Kraft von ultrafeinem P90 sich nicht mit löslichen Übergangsmetallen auf

den Partikeln oder mit einer Ansammlung von Eisen auf der Partikeloberfläche erklären lassen.

Alle Partikeln werden zur Applikation auf die Zellen in einem Medium gelöst, das nicht-hitzeinaktiviertes Serum enthält. Deshalb kann es zu einer Komplement-Opsonierung der Partikeln kommen, wonach die Partikeln von Komplement-Rezeptoren erkannt und gebunden werden können. Serrander et al. [107] berichten von Partikeln, die nach Binden an einen Komplement-Rezeptor (CD11b/CD18) einen starken Oxidativen Burst in den Zellen auslösen. So wird ein Teil des beobachteten Bursts in den Experimenten (Abb. 2.25 und 2.26) auf die Aktivierung des Oxidativen Bursts über den Komplement-Rezeptor zurückzuführen sein. Es wäre nun denkbar, daß die Komplement-Proteine aufgrund der Oberflächengeometrie und aufgrund sterischer Probleme bevorzugt an P90 binden und P90 deshalb einen höheren Burst produziert.

Modulation des Oxidativen Bursts durch ultrafeine Partikeln

Um zu untersuchen, ob ultrafeine Partikeln den Oxidativen Burst modulieren können, wurden in die Lunge von WKY-Ratten EC30-, EC90- bzw. P90-Partikeln instilliert. Nach 24 Stunden wurden bei den Tieren durch bronchoalveoläre Lavage Alveolarmakrophagen gewonnen. Diese Makrophagen wurden mit LPS bzw. Komplement-opsoniertem Zymosan (oZym) stimuliert und der Oxidative Burst gemessen.

Der Oxidative Burst durch LPS nach EC30-Instillation sowie durch oZym nach EC90-Instillation war gegenüber der A. dest.-Kontrollgruppe nicht erhöht (Abb. 2.27 und 2.28). Bei den Tieren, die mit P90 vorbehandelt waren, reagierten die Alveolarmakrophagen nach Stimulation mit oZym mit einem leicht (20 %) verminderten Oxidativen Burst (Abb. 2.28). Die Höhe der Bursts sind durch die Behandlung mit den ultrafeinen Partikeln nicht signifikant verändert. Für P90 ergab sich ein leicht verminderter Burst, der wahrscheinlich auf eine Schwächung des oxidativen Gleichgewichts der Zellen durch die starke oxidative Kapazität der P90-Partikel selbst (Abb. 2.25) zurückzuführen ist. Bei EC90, das selbst nur einen geringen Burst in Zellen auslöst (Abb. 2.25), hatten die Makrophagen genug Zeit, sich zu erholen und waren energetisch in einer besseren Verfassung, um auf den neuen Stimulus mit einem Burst zu reagieren. Zudem spielen toxische Prozesse, die die Partikeln auslösen können, eine Rolle. Li und Koautoren [108] berichten nach P90-Instillation in Ratten von einem Einstrom von Neutrophilen Granulozyten, einer Erhöhung von Lactatdehydrogenase als einem Marker von Zellschädigungen und einem Absenken von Glutathion, das bei der Aufrechterhaltung der Redoxgleichgewichtes in der Lunge eine wichtige Rolle spielt.

Einfluß von Vorerkrankungen der Lunge auf den Oxidativen Burst

Dockery [4] und Cohen [5] haben in epidemiologischen Studien eine erhöhte Krankheits- und Sterberate bei Personen gefunden, die in ihrer Umwelt Partikeln mit einem aerodynamischen Durchmesser kleiner als 2,5 µm ausgesetzt waren. Daß ultrafeine Partikeln ein oxidatives und damit inflammatorisches Potential haben, das stärker ist, als das von Partikeln gleichen Materials, aber geringerer Oberfläche (das oxidative Potential also von den physikalischen Oberflächeneigenschaften der Partikeln abhängen), zeigen zahlreiche Untersuchungen [102, 103, 108, 109].

Da sich die Lunge durch das Vorhandensein von Wirkstoffen schützt, die das Redoxpotential im Lungengewebe aufrechterhalten (z.B. Glutathion), werden im Tiermodell bei Kurzzeitversuchen hohe Partikelkonzentrationen eingesetzt, um dieses Puffersystem zu überwinden. Auch der Mensch besitzt ein solches Puffersystem für reaktive Sauerstoffspezies in der Lunge, das durch das Einatmen ultrafeiner Partikel belastet wird. Ist die Lunge durch eine Erkrankung so vorbelastet, daß diese Puffersysteme nicht mehr effizient arbeiten können, können eingeatmete Partikel viel eher eine schädigende Wirkung entfalten.

Um diese Überlegungen zu prüfen, wurde die Reaktion auf PMA und die Einwirkung des ultrafeinen Partikelsystems EC90 an humanen Alveolarmakrophagen gesunder freiwilliger Spender und denen von Patienten mit einem Gerüstprozeß der Lunge miteinander verglichen (Abb. 2.29). Die Alveolarmakrophagen reagierten auf PMA mit einer 2,25-fachen Erhöhung des Oxidativen Bursts, gemessen an der Grundaktivität der Zellen. EC90 löste immerhin noch einen 1,5-fachen Burst aus. Waren die Lungen der Spender vorgeschädigt (Gerüstprozeß), reagierten die Alveolarmakrophagen mit einem verminderten Burst auf die Stimuli PMA und EC90. Nach PMA-Stimulation konnten die Alveolarmakrophagen aus der erkrankten Lunge nur mit einem 1,5-fachen Anstieg der reaktiven Sauerstoffspezies-Produktion reagieren, und waren damit signifikant niedriger als Alveolarmakrophagen gesunder Lungen. Nach EC90-Stimulation war bei Alveolarmakrophagen von Patienten mit Gerüstprozeß der Lunge ebenfalls eine (nicht signifikante) Verminderung des Oxidativen Bursts zu beobachten.

Cortikosteroide sind antiinflammatorisch wirkende Hormone, die auf Immunfunktionen wie den Oxidativen Burst hemmend wirken können. Goulding und Koautoren [110] berichten über die Burst-reduzierende Wirkung von Glucocorticoiden bei Neutrophilen Granulozyten. Bei den hier untersuchten Patienten hatten zwei vor und am Tag der BAL keine Corticoide erhalten. Nur bei einem Patienten wurde am gleichen Tag eine Kortikosteroid-Therapie eingeleitet (Ultralan®). Es ist sehr wahrscheinlich, daß das systemisch gegebene Medikament zum Zeitpunkt der BAL nicht in ausreichend hoher Konzentration in der Lunge vorlag, um die Alveolarmakrophagen zu beeinflussen. Gestützt wird diese Annahme durch die Meßergebnisse, die von denen der unbehandelten Patienten nicht stark abweichen (geringere Standardabweichung der Meßergebnisse der Patienten gegenüber der Kontrollpersonen). Zudem berichten Hoeben et al. [111], daß die therapeutisch angewandten Mengen der meisten Glukokortikoide keinen ungünstigen Effekte auf den Oxidativen Burst von (Rinder-) Granulozyten haben.

Die Fähigkeit der Alveolarmakrophagen, auf äußere Reize hin mit einem Oxidativen Burst zu reagieren, ist bei Patienten, die an einem Gerüstprozeß der Lunge leiden, vermindert. Ebenso ist ihre Abwehrfähigkeit, sich gegen die Wirkung eingeatmeter ultrafeiner Partikel zu schützen, möglicherweise vermindert.

Zusammenfassend sei festgehalten: Substanzen oder Partikel, die mit Zytoskelett-komponenten, voran mit Aktin-Filamenten, interagieren und diese in ihrer Funktion einschränken, greifen modulierend in die Regulation des Oxidativen Bursts und damit in eine wichtige Komponente der immunologischen Abwehr des Körpers ein [102, 104, 108, 109]. In Folge

werden auch zelluläre Prozesse, die mit dem Oxidativen Burst in Verbindung stehen, beeinflußt, wie z.B. Regulation der Genexpression durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren [112, 113] oder die Beeinflussung der Zytoskelettdynamik über die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration durch ultrafeine Partikeln [114].

3.4 Zytomagnetometrische Untersuchung zur Wirkung von feinen und ultrafeinen Partikeln auf das Zytoskelett

Für immunologische Prozesse wie die Phagozytose und den Oxidativen Burst besitzt, wie bisher gezeigt werden konnte, das Zytoskelett der Zellen eine wichtige Funktion. Es ergaben sich bisher deutliche Hinweise, daß durch die Interaktion der Alveolarmakrophagen mit partikulären Fremdstoffen sich Auswirkungen auf das Zytoskelett der Zellen und damit auf die mit ihm verbundenen Funktionen ergeben können. Untersucht wurde der Einfluß von ultrafeinem elementarem Kohlenstoff (ufEC90), mit Benzo[a]pyren belegtem ufEC90 (ufEC90B), Printex 90 (ufP90), Titandioxid fein und ultrafein (f und uf TiO_2) auf das Zytoskelett von J774A.1-Mausmakrophagen und primäre Alveolarmakrophagen von Beagle-Hunden.

Mit Hilfe der Zytomagnetometrie kann die Funktion des Zytoskeletts an lebenden Zellen untersucht werden [115, 116]. In einem ersten Schritt werden ferromagnetische Partikeln von den Makrophagen in Phagosomen aufgenommen (Kapitel 5.9.1). Die Phagosome sind mit dem Zytoskelett verknüpft, weshalb durch Applikation eines externen Magnetfeldes die Partikeln mitsamt den Phagosomen gedreht und dadurch eine Kraft auf die Zytoskelettstrukturen übertragen werden kann [116, 117].

Die Eigenschaften des Zytoskeletts werden aus zwei verschiedenen Blickwinkeln untersucht. Mit der Relaxation betrachtet man direkt die Ankopplungseigenschaften der Phagosome an das Zytoskelett und die Dynamik, mit der die Phagosomen entlang des Zytoskeletts bewegt werden. Durch Drehen der Phagosomen durch ein äußeres Magnetfeld werden Kräfte auf die Bereiche des Zytoskeletts ausgeübt, die mit den Phagosomen verknüpft sind. Mit dem daraus abgeleiteten Parameter Steifigkeit lassen sich so die mechanischen Eigenschaften des Zytoskeletts untersuchen.

Relaxation (Phagosomentransport) und Steifigkeit (Zytoskelett-Integrität) werden bei Konzentrationen der ultrafeinen Partikeln ab $100 \mu\text{g pro ml}$ und Million Zellen nachweisbar beeinträchtigt.

Wirkung von ultrafeinen Partikeln auf den Relaxationsprozess bei J774A.1-Mausmakrophagen

An J774A.1-Mausmakrophagen (eine Zell-Linie) wurden die Zytoskelett-Parameter Relaxation und Steifigkeit unter dem Einfluß von feinen und ultrafeinen Teilchen nach 4,5 bzw. 24 Stunden Inkubationsdauer gemessen (zur Meßmethode siehe Kapitel 5.9.4). Nach 4,5 Stunden Inkubationsdauer zeigen ufEC90 und ufP90 einen deutlichen Effekt (Abb. 2.30). Das Zytoskelett der Zellen, die mit ufEC90 behandelt wurden, zeigen konzentrationsabhängig

eine Verlangsamung der Relaxation, d.h. eine Verlangsamung des Phagosomentransportes. Dieser Effekt verstärkt sich, wenn die ufEC90-Partikeln 24 Stunden mit den Zellen inkubiert wurden (Abb. 2.31). Möglicherweise kommt es zu einer Verminderung der Energie in den Zellen (gemessen am ATP-Gehalt), da sehr viele Phagosome bewegt werden müssen. Nemoto und Mitarbeiter [118] konnten nachweisen, daß der Phagosomentransport durch Blockieren der ATP-Synthese gestoppt werden kann. Dies betrifft auch die Motorproteine, die die Phagosome mit den Zytoskelett-Filamenten verbinden und energieabhängig daran entlangtransportieren. D'Arcy Hart und Mitarbeiter [119] berichten von einfachen chemischen Substanzen (NH_4Cl), die den Lysosomen-Transport in Maus-Peritonealmakrophagen hemmen. Der Mechanismus ist unklar, vielleicht entwickelt die chemisch reaktive Oberfläche der ultrafeinen Partikeln eine ähnliche Wirkung, die zur Hemmung des Transportes führt.

Eine Verlangsamung der Relaxation könnte auch auf Schäden an den Aktin-Filamenten hinweisen. Möller und Koautoren [31] fanden bei J774A.1-Mausmakrophagen nach Zerstörung der Aktin-Filamente mit CytoD ebenfalls eine Verlangsamung der Relaxation und darüber hinaus eine höhere Steifigkeit (vgl. nächster Abschnitt), die auch bei den vorliegenden Untersuchungen mit den ultrafeinen Partikeln auftrat.

Das in einem anderen Labor (aber mit den gleichen Geräten) hergestellte, sonst mit ufEC90 vergleichbare Partikelsystemen ufEC90W zeigte keine Phagosomentransport-verlangsamende Wirkung bei kurzer Inkubationsdauer (4,5 Stunden), eher eine leichte Beschleunigung des Phagosomentransports (Abb. 2.30). Für ufEC90W gab es keine Messung bei 320 $\mu\text{g}/\text{ml}$, die man mit der korrespondierenden Messung bei ufEC90 hätte vergleichen können. Da sich bei längerer Inkubationsdauer der Zellen mit den Partikeln (24 Stunden, Abb. 2.31) deutlichere Ergebnisse gewinnen lassen und diese für ufEC90 und ufEC90W und 320 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gleich hoch sind, ist die Wirkung der beiden Partikelsorten als gleich einzustufen.

Einen interessanten Vergleich erlauben feine und ultrafeine TiO_2 -Partikeln. Wenn die Oberfläche für die gemessenen Zytoskelett-Effekte maßgeblich sein sollte und nicht das Material der Partikeln an sich, sollten sich Unterschiede zwischen f und ufTiO_2 ergeben. Bei kurzer Inkubationsdauer ergeben sich keine Reaktionen der Relaxation auf uf und fTiO_2 (Abb. 2.30). Bei der längeren Inkubationsdauer (24 Stunden, Abb. 2.31) ist eine deutliche Verlangsamung des Phagosomentransports (also eine Erhöhung der Relaxationsparameters) unter Einwirkung von ufTiO_2 zu messen, der sich bei fTiO_2 nicht zeigt. Der Einfluß der TiO_2 -Partikeln auf die Relaxation ist demnach mit der Größe der Oberfläche der Partikeln korreliert.

Die verlangsamende Wirkung auf den Phagosomentransport zeigen (außer P90) alle ultrafeinen Teilchen. Die ufP90 haben im Gegensatz dazu bereits nach 4,5 Stunden Inkubationszeit (Abb. 2.30) eine Verminderung des Relaxationswertes, d.h. eine Beschleunigung des Phagosomentransports zur Folge. Dieser Effekt ist nach längerer Inkubationszeit (Abb. 2.31) nicht, wie bei den anderen uf-Partikeln, deutlicher geworden, sondern schwächer. Nur bei der Partikelkonzentration von 320 $\mu\text{g}/\text{ml}$ war eine geringe Beschleunigung des Phagosomentransports noch nachweisbar.

Wieso führen die ufP90 nicht zu den gleichen Effekten wie die übrigen uf-Partikeln, wie sie in den vorigen Absätzen diskutiert wurden? Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte,

habe die uFP90-Partikeln einen starken Effekt auf den Oxidativen Burst (Abb. 2.25), wobei die Zellen immunologisch aktiviert und zahlreiche Folgereaktionen in den Zellen gestartet werden (z.B. Genexpression). Möglicherweise kommt es durch den Anstieg der Konzentration an ROS zu Beeinträchtigungen oder Schäden an den Phagosomen und Motorproteinen, so daß die Koppelung zwischen Phagosom und Zytoskelett nicht mehr fest ist. Dies würde im Meßsystem zu einem leichteren Drehen der Phagosome durch das von Außen angelegte Magnetfeld führen und damit eine schnellere Relaxation vortäuschen.

Wirkung von ultrafeinen Partikeln auf die Steifigkeit des Zytoskeletts bei J774A.1-Mausmakrophagen

Der Parameter „Steifigkeit“ erlaubt eine Aussage über die mechanischen Eigenschaften des Zytoskeletts. Eine Erhöhung des Wertes zeigt eine Versteifung, eine Verringerung eine verminderte Steifigkeit an. Je steifer das Zytoskelett ist, desto geringer ist seine Umbaudynamik und damit die Mobilität der Zelle. Bei der Messung der Steifigkeit wird durch ein von außen angelegtes Magnetfeld an den Phagosomen gedreht, wobei die Kraft auf das Zytoskelett weitergegeben wird, mit dem die Phagosomen über Bindeproteine verknüpft sind. Durch Variation eines Magnetfeldes kann unterschiedlich stark an den Phagosomen gedreht werden (vgl. Kapitel 5.9.4). Bei geringer Auslenkung der Phagosomen drehen diese sich wieder in ihre alte Position zurück (elastisches Rückdrehen). Werden sie stärker ausgelenkt, kehren sie nicht mehr ganz in ihre Ausgangsposition zurück, es bleibt ein „Rest“, der auf eine plastische Verformbarkeit des Zytoskeletts hindeutet.

Bei kurzer Inkubationsdauer zeigen sich für Messungen bei „low stress“ (Abb. 2.32) und bei „high stress“ (Abb. 2.34) keine eindeutigen Effekte (Meßmethode vgl. Kapitel 5.9.4). Bei „low stress“ (Abb. 2.32) ergaben sich für fTiO₂, uFP90 und uFC90 z.T. signifikante Veränderungen, die aber z.T. gering waren und keinem eindeutigen Trend folgten und deshalb nicht weiter interpretiert wurden. Auch die bei „high stress“ gemessene Steifigkeit des Zytoskeletts (Abb. 2.34) zeigte keine eindeutigen Veränderungen nach Partikel-Inkubation. Einzig die uFC90B-Partikeln zeigten in Abb. 2.32 eine Verminderung des Steifigkeitswertes, d.h. eine erhöhte Zytoskelettdynamik und Mobilität. Die Betrachtung dieser Partikeln ist interessant, da es sich um die gleichen Partikeln wie uFC90 handelt und sich nur in einer Veränderung ihrer Oberfläche unterscheiden. Die uFC90B sind mit Benzo[a]pyren belegt, was möglicherweise in der Lage ist, die „Oberflächeneigenreaktivität“ zu blockieren. Da für uFC90B-Messungen bei langen Inkubationszeiten fehlen, bleibt nur der direkte Vergleich zu uFC90 (Abb. 2.32). uFC90 folgt dem Trend (der bei 24-stündiger Inkubationszeit bestätigt wird; Abb. 2.33), die Steifigkeit zu erhöhen, die Zytoskelettdynamik und Mobilität der Zelle also einzuschränken. Ein gegenläufiger Effekt auf die Steifigkeit zeigt uFC90B: Die Zytoskelettdynamik ist erhöht, das Zytoskelett weniger steif.

Aus dieser Beobachtung und dem unterschiedlichen Verhalten der Zelle im Bezug auf die Relaxation bei feinen und ultrafeinen TiO₂-Partikeln (Abb. 2.31) wird abgeleitet, daß die spezifische Oberfläche der Partikeln eine entscheidende Rolle bei ihrer Wirkung auf das Zytoskelett spielen.

Die Steifigkeit des Zytoskeletts vermindert sich, wenn die Zellen mit uFC90B inkubiert wurden (Abb. 2.32). Dies könnte zumindest zum Teil auf einen toxischen Effekt auf die

Motorproteine beruhen, wie oben bereits diskutiert wurde. Möglicherweise ist Benzo[a]pyren das ausschlaggebende Agens dieser Toxizität. Studien von Barhoumi und Koautoren [120] haben gezeigt, daß Benzo[a]pyren sich in Zellen besonders in zytoplasmatischen Membranen, zu denen auch die Phagosomen-Membranen gehören, anreichert und dort ihre toxische Wirkung entfaltet. Eine toxische Wirkung von Benzo[a]pyren z.B. auf die Motorproteine wäre denkbar. In der Studie von Barhoumi wurde das Benzo[a]pyren jedoch gelöst in Dimethylsulfoxid den Zellen im Kulturmedium angeboten. In der vorliegenden Arbeit war das Benzo[a]pyren den Partikeln aufgelagert, die von ihrer Chemie her relativ hydrophob sind und das Benzo[a]pyren deshalb gut binden. Untersuchungen von Tornquist et al. [121] betrachteten die Abgabe von Benzo[a]pyren auf Umweltpartikeln in der Lunge und gaben die Bioverfügbarkeit von Benzo[a]pyren mit 10 pmol pro ml Alveolarflüssigkeit und Minute an. Ein Effekt, hervorgerufen durch Benzo[a]pyren, scheint möglich.

Bei langer Inkubationszeit (24 Stunden) zeigten sich deutliche Effekte der getesteten Partikeln auf die Steifigkeit des Zytoskeletts (Abb 2.33 und 2.35). Feines und ultrafeines TiO_2 unterscheiden sich stark in ihren Effekten auf das Zytoskelett. Bei „low stress“ wie auch bei „high stress“ hat nur ufTiO_2 einen deutlich versteifende Wirkung auf das Zytoskelett. Es bestätigt sich der Einfluß der spezifischen Oberfläche bei der Wirkung der Partikeln auf die gemessenen Parameter. Auch die ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln (ufEC90 und ufEC90W , Abb. 2.33 und 2.35) haben eine versteifende Wirkung. Nur ufP90 zeigt wie bei der Relaxations-Messung keinen Effekt. Eine mögliche Erklärung wurde bereits dort diskutiert.

Ultrafeine Partikeln (außer ufP90) führen zu einer Verlangsamung des Phagosomen-transportes und zu einer Versteifung des Zytoskeletts (Verminderung der Dynamik bzw. Motilität). fTiO_2 zeigte diese Effekte im Gegensatz zum ultrafeinen Partikeln gleichen Materials (ufTiO_2) nicht.

Beagle-Alveolarmakrophagen

Die Alveolarmakrophagen vom Beagle-Hund wurden durch bronchoalveoläre Lavage (BAL) gewonnen. Da es sich um primäre Zellen handelt, und Zellen von verschiedenen Hunden untersucht wurden, ist evtl. mit größeren Schwankungen bei den Untersuchungsergebnissen gegenüber den Zell-Linien zu rechnen.

Um die Versuchsergebnisse der verschiedenen Hunde untereinander vergleichbar zu machen, wurden die bei der BAL gewonnenen Zellen gefärbt und differenziert. Bei allen Hunden wurden vergleichbare Mengen an Alveolarmakrophagen lavagiert, wobei bei zwei Hunden eine leichte Erhöhung an Neutrophilen Granulozyten zu beobachten war (H411 und H426). Diese Hunde hatten eine leichte Entzündung der Atemwege, was bereits bei der Bronchoskopie durch eine leicht gerötete Schleimhaut aufgefallen war. Bei den zytomagnetometrischen Untersuchungen unterschieden sich die Ergebnisse der unbehandelten Zellen (Kontrollen) dieser Hunde nicht von denen der gesunden Hunde. Deshalb ist nicht mit einem aus diesem Grund unterschiedlichen Verhalten der Zellen dieser beiden Hunde zu rechnen.

Relaxation des Zytoskeletts bei Beagle-Alveolarmakrophagen

Während bei den J774A.1-Mausmakrophagen eine deutliche Reaktion der Zellen erst nach 24 Stunden Inkubation mit den Partikeln zu messen war, reagierten die primären Hunde-Alveolarmakrophagen bereits nach 4,5 Stunden. So war für f und $ufTiO_2$ bei hoher Partikelkonzentration (320 $\mu\text{g/ml}$) ein Anstieg des Relaxationswertes, d.h. eine Verlangsamung des Phagosomentransports, zu messen (Abb. 2.37). Diese Verlangsamung konnte nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit den Partikeln nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 2.38). Der Unterschied von f und $ufTiO_2$, wie er sich bei den J774A.1-Mausmakrophagen durchwegs zeigt, ist hier nicht zu sehen. Der Grund dafür könnte sein, daß primäre Zellen empfindlicher reagieren, als an Zellkultur angepaßte Zellen. Der Streß der Anpassung an die Kulturbedingungen kommt zusätzlich zur Belastung mit den Partikeln hinzu.

Dies größere Belastung könnte auch der Grund dafür sein, daß nicht nur $ufP90$ (wie bei den J77A.1-Zellen), sondern auch $ufEC90$ den Relaxationparameter vermindern, d.h. den Phagosomentransport beschleunigen (Abb. 2.37 und 2.38). Bei $ufP90$ wurde bereits über einen Zusammenhang nachgedacht, daß das hohe Potential des P90, einen Oxidativen Burst auszulösen, für eine toxische Wirkung auf das Phagosomentransportsystem verantwortlich ist. Damit würden die Ergebnisse fälschlicherweise als Verlangsamung des Phagosomentransports bewertet, obwohl sie eine massive Schädigung des Transportsystemes bedeuten könnten.

Steifigkeit des Zytoskeletts bei Beagle-Alveolarmakrophagen

Die Ergebnisse bei den Untersuchungen zur Steifigkeit des Zytoskeletts bei „low stress“ (Abb. 2.39 und 2.40) entsprachen denen bei „high stress“ (Abb. 2.41 und 2.42), wobei die Ergebnisse beim letzteren deutlicher waren. f und $ufTiO_2$ unterschieden sich in ihrer Auswirkung auf die Zytoskelettsteifigkeit nicht. Beide Partikelsysteme führten nach 4,5-stündiger Inkubation zu einem Anstieg der Steifigkeit und damit zu einer verminderten Zytoskelettdynamik und Motilität der Zelle (Abb. 2.39 und 2.41). Nach 24 Stunden waren bei beiden keine Effekte auf die Steifigkeit mehr zu beobachten. $ufP90$ führte im Gegensatz zu den J774A.1-Mausmakrophagen nur nach 24-stündiger Inkubation bei der Untersuchung mit „high stress“ zu einem Anstieg der Steifigkeit (Verminderung der Zytoskelettdynamik, Abb. 2.42). Bei allen anderen Untersuchungen war kein Einfluß von $ufP90$ auf das Zytoskelett zu messen. Dieses inkonsistente Verhalten der Zellen ist nur schwer zu interpretieren und deuten am ehesten auf eine Schädigung der Zellen hin.

$ufEC90$ zeigte bei „low stress“ als auch bei „high stress“ nach 4,5-stündiger Inkubation mit den Partikeln eine Verminderung der Steifigkeit (Abb. 2.39 und 2.41). Nach 24-stündiger Inkubation mit $ufEC90$ wurde dagegen bei „low stress“ (Abb. 2.40) und „high stress“ (Abb. 2.42) eine starke Zunahme der Steifigkeit gemessen (Inhibition der Zytoskelettdynamik).

Die Beagle-Alveolarmakrophagen wurden nach der Gewinnung durch BAL eine Stunde transportiert. Zwar wurde auf einen schonenden Umgang geachtet, dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß bei primären Zellen durch die Milieuänderung so schwere Störungen eintreten, daß sie durch eine zusätzliche Belastung wie die Inkubation mit den Partikeln nicht mehr adäquat reagieren können. Ein Hinweis darauf könnte sein, daß die von den J774A.1 bekannte Erhöhung der Steifigkeit nach 4,5-stündiger $ufEC90$ -Inkubation ausbleibt, weil die

Zelle massiv, aber nicht letal geschädigt ist und sich nach 24 Stunden soweit erholt hat (trotz Partikeln), daß sie die von den J774A.1-Zellen erwartete Reaktion zeigt. Der schädigende Einfluß der Partikeln auf die primären Zellen war nicht letal, denn ein nach Abschluß der Versuche durchgeführter Vitalitätstest mit Trypanblau zeigte keine erhöhte Letalität.

Oxidativer Burst bei Beagle-Alveolarmakrophagen

Zur vergleichenden Untersuchung wurden vor dem Start der zytomagnetometrischen Experimente ein Teil der Zellen für Untersuchungen zum Einfluß der Partikeln auf den Oxidativen Burst herangezogen. Die Burst-Daten wurden nach 30- (Abb. 2.43) und nach 130-minütiger (Abb. 2.44) Inkubation mit den Partikeln ermittelt. Die Ergebnisse decken sich mit bereits zuvor ermittelten Daten (Kapitel 2.3).

Feines und ultrafeines TiO_2 lösten keinen Oxidativen Burst in den Zellen aus, während ufp90 einen starken Burst provozierte. Dies stützt die Hypothese, daß durch ufp90 vermehrt gebildete reaktive Sauerstoffspezies Einfluß auf Komponenten des Zytoskeletts haben und damit bei der Interpretation der zytomagnetometrischen Daten berücksichtigt werden müssen.

Nach 24-stündiger Inkubation der Beagle-Alveolarmakrophagen zeigten ufp90 und in stärkerem Umfang ufEC90 eine Verringerung des Relaxationswertes, also einer Erhöhung des Phagosomentransports. Die Steifigkeit des Zytoskeletts wurde bei Inkubation mit ufp90 und stärker bei ufEC90 erhöht, d.h. die Zytoskelettdynamik und Motilität der Zelle vermindert. Diese Ergebnisse sind nur sehr zurückhaltend zu werten, da ihre inkonsistente Reaktion in den Versuchen eine Schädigung der Zellen wahrscheinlich macht.

3.5 cDNA-Expressions-Array-Technik

In den letzten Jahren hat sich eine neue Methode etabliert, mit der die Expression einer Vielzahl von Genen innerhalb kurzer Zeit untersucht werden können, die cDNA-Expressions-Array-Technik [122]. Die große Zahl an DNA-Sequenzen, die von tierischen und humanen Genen mittlerweile bekannt sind, haben diese Technik erst möglich gemacht.

Die Gene werden, wenn sie aktiv sind, in mRNA übersetzt, die den Kern verläßt und im Zytoplasma an den Ribosomen zu Proteinen umgesetzt werden. Die gebildete mRNA ist also ein Marker für die Expression von Genen.

Die cDNA-Expressions-Arrays sind Membranen, auf die eine Vielzahl von cDNA-Stückchen bekannter Gene in Form eines kleinen Punktes aufgetragen sind. Um die in einem Gewebe oder einer Anzahl von Zellen exprimierten Gene zu identifizieren, wird ihre mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben (revers transkribiert) und dabei radioaktiv markiert. Diese Probe wird mit dem cDNA-Expressions-Array inkubiert, wobei sich übereinstimmende cDNA-Stücke (vom gleichen Gen) miteinander verbinden (hybridisieren). Durch Detektion der radioaktiven Strahlung, z.B. durch einen Röntgenfilm, kann man die Stelle finden, an denen eine Hybridisierung stattgefunden hat. Da man die Lage der Gene in dem Array kennt, kann man sie identifizieren.

Interessant wird es, wenn man eine unbehandelte Zellprobe mit einer behandelten vergleicht. Die Zellen der mit z.B. Dieselmotorenruß behandelten Probe könnten ein anderes Expressionsmuster als die unbehandelten Zellen aufweisen. Durch einen einfachen Vergleich der beiden Muster können Gene identifiziert werden, die durch den Dieselmotorenruß in ihrer Expression beeinflusst wurden. Diese Beeinflussung kann eine Erhöhung (Induktion) oder Verminderung (Repression) der Expression sein.

Die cDNA-Expressions-Technik wird in immer stärkerem Umfang, z.B. zur Identifizierung von Genen, die an der Entstehung bestimmter Krebsarten beteiligt sind [123] oder bei der Aufdeckung von Virulenzfaktoren von Krankheitserregern, die auch auf der Ebene der Genexpression wirken [124], eingesetzt.

Es ist zu erwähnen, daß die cDNA-Expressions-Array-Technik eine Screening-Methode darstellt, um einen ersten Hinweis auf veränderte Expressionen zu geben. Hierbei handelt es sich bereits um starke Hinweise, die jedoch durch RT-PCR verifiziert werden müssen.

Das Zytoskelett hat wichtige biologische Funktionen in allen eukaryotischen Zellen zu erfüllen. Dies sind z.B. Aufrechterhaltung der Zellgestalt, der Zellpolarität, die Zellteilung, die Migration, Phagozytose, den Oxidativen Burst usw. [125]. Das Zytoskelett wird deshalb durch Regulationsproteine fein reguliert [125, 126] und gibt seinerseits Signale weiter, die zur Induktion von Genen führen können (z.B. Einleitung der Apoptose durch Schädigung der Mikrotubuli [127]).

Erste Hinweise auf Zytoskelett-abhängige Änderungen der Genexpression bei MM6-Zellen ergaben sich bei der Untersuchung der TNF- α -Produktion auf mRNA-Ebene (Abb. 2.45). Durch RT-PCR war eine schwache Expressionserhöhung des Zytokins TNF- α nach Cytochalasin D- bzw. nach EC90-Behandlung der Zellen nachzuweisen. Colchicin löste eine starke Expressionserhöhung an mRNA für TNF- α aus. LPS diente als Kontrolle der Stimulierbarkeit der Zellen, denn hier ist eine starke Erhöhung des Zytokins zu erwarten. Interleukin-8 (IL-8) wurde durch EC90 auf mRNA-Ebene schwach erhöht (Abb. 2.46).

Diese Ergebnisse gaben den Anlaß, die Wirkung von Zytoskelettgiften (Cytochalasin D und Colchicin), sowie die Wirkung von ultrafeinen Partikeln (EC90, P90 und SDR) auf ihre expressionsverändernde Eigenschaft hin zu untersuchen.

Einfluß von Cytochalasin D und Colchicin auf die Genexpression

Da es sich um eine relativ neue Technik handelt, werden die einzelnen Schritte des Ablaufs der Untersuchung und die Ergebnisse der Zwischenuntersuchungen einmal exemplarisch dargestellt.

Die von den Zellen gebildete mRNA ist ein Maß für die Aktivität des dazugehörigen Gens. Um sicherzustellen, daß während der Präparationen die mRNA-Menge nicht verändert wird (z.B. Verdau durch ubiquitär vorhandene RNasen), werden nach kritischen Schritten im Verlauf der Präparation mRNA-Kontrollgele hergestellt (Abb. 2.47 und 2.48). Kritische Schritte sind hier die Isolierung der RNA aus den Zellen und die Behandlung der RNA-Lösung mit DNaseI. Letztere ist ein Enzym, das DNA verdaut, die als Verunreinigung in der RNA-Lösung mitgeführt werden kann. Genomische DNA würde aber im Expressionsarray zu fal-

schen Ergebnissen führen. Die Abb. 2.47 und 2.48 zeigen solche Gele, bei denen zwei scharf abgegrenzte RNA-Banden zu erkennen sein müssen. Ein Hinweis auf Verdau und damit Unbrauchbarkeit der Probe würde ein Fehlen einer Bande oder die Aufsplitterung einer scharfen Bande in viele kleine, dünne geben. Um Kontamination der RNA mit genomischer DNA (gDNA) auszuschließen, wird nach DNaseI-Verdau und nach dem RNA-Gel eine PCR durchgeführt (Abb. 2.49). In dieser PCR wird ein sog. „housekeeping“-Gen (ein Gen, das in relativ konstantem Maß andauernd in der Zelle exprimiert wird) amplifiziert. Als Templat wird die RNA-Lösung eingesetzt. Wäre immer noch Verunreinigung von gDNA in der RNA-Lösung, so müßte in der PCR eine Bande für das „housekeeping“-Gen, in unserem Fall für GAPDH, erscheinen. Abb. 2.49 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung. Die Probe mit Wasser darf keine Bande zeigen; sie wird mitgeführt, um die Reinheit der eingesetzten Lösungen zu zeigen. Die Probe mit gDNA dient als Positivkontrolle um zu zeigen, daß eine erfolgreiche PCR möglich war. Die Probe mit mRNA darf keine Bande für GAPDH zeigen, wenn sie nicht mit gDNA verunreinigt ist. Eine Probe aus der Kombination von gDNA und RNA-Lösung wird mitgeführt, da es möglich ist, daß eine hohe RNA-Konzentration die Amplifikation von GAPDH trotz Anwesenheit von gDNA durch kompetitive Hemmung verhindert. Das Fehlen der Bande bei der mRNA-Probe könnte falsch negativ sein.

Nach dem Hybridisieren der cDNA-Expression-Array-Membranen (Abb. 2.50 und 2.51) und ihrer autoradiographischen Abbildung auf einem Röntgenfilm, wurde in einem Computerprogramm ein Netz über das Punktemuster der Autoradiographiefilme der unbehandelten und der behandelten Probe gelegt, das die Positionen und Zuordnung der einzelnen Gene enthält und gleichzeitig innerhalb der Kreise die Schwärzung und damit die Stärke der Genexpression densitometrisch erfaßt (Abb. 2.52). Nach Abzug der Hintergrundschwärzung von jedem Punkt wird ein Schwellenwert definiert, nach dessen Überschreitung erst eine Expressionsänderung angezeigt wird. Das Ergebnis ist ein Computerbild mit einem Farbcode (Abb. 2.53), wobei rot für Gene steht, die in ihrer Expression erhöht sind, blau für expressionsverminderte Gene, grün für Gene gleicher Expression und grau für Gene, für die keine Expression gemessen werden konnte. Grüne Rechtecke mit einem schwarzen Punkt repräsentieren Gene, die zur Normierung der beiden Autoradiographiefilme untereinander dienen. So können Unterschiede in der Grundschwärzung zwischen den beiden Probeansätzen ausgeglichen werden (z.B. höhere Menge an eingesetzter Radioaktivität bei einer Probe). Zur Normierung dienen wegen ihrer gleichmäßigen Expression in der Zelle normalerweise wiederum „housekeeping“-Gene. Im Array sind sie in zwei Dreiergruppen und einer Vierergruppe am unteren Rand der Array-Membran aufgetragen. Da die Auswahl an „housekeeping“-Genen aber auch Aktin und Tubulin enthielt, die durch Cytochalasin D und Colchicin sehr wohl in ihrer Expression beeinflusst werden, wurde nur bei diesen Ansätzen auf Gene im Array ausgewichen, die in ihrer Expression im Vergleich zur unbehandelten Probe nicht verändert waren.

Die Zahlenwerte, die sich aus diesen Berechnungen ergeben (vgl. Kapitel 2.5.2), sind keine absoluten Werte, da sie sich von der Schwärzung des Röntgenfilms, d.h. den densitometrischen Daten ableiten. Ein hoher Betrag der prozentualen Expressionsänderung kann zustande kommen durch eine moderate Expressionserhöhung eines zuvor nicht exprimierten Gens, als auch durch eine starke Expressionserhöhung eines schon zuvor hoch

exprimierten Gens. Sind die Schwärzungen auf dem Röntgenfilm im Vergleich der unbehandelten mit der behandelten Probe um den Faktor 2 erhöht (verdoppelt), entspricht dies einer Expressionsänderung von 100 %. Eine Verminderung auf die Hälfte (Faktor 1/2) entspricht - 50 % (Rechenbeispiel siehe Kapitel 2.5.2). Eine Kontrolle der durch das Computerprogramm ausgegebenen Ergebnisse durch Vergleich der Expressionsmuster auf dem Röntgenfilm mit dem Auge ist unerlässlich.

Tabelle 2.4 zeigt Gene, die durch die Behandlung von Cytochalasin D (depolymerisiert Aktin-Filamente) bzw. Colchicin (depolymerisiert Mikrotubuli) in ihrer Expression verändert sind. Es ist auffällig, daß im Gegensatz zu Colchicin die Cytochalasin D-behandelten Zellen hauptsächlich eine Expressions-Erhöhung von Genen zeigen, die zudem (bis auf wenige Ausnahmen) andere als bei Colchicin-behandelten Zellen sind. Bei beiden Zytoskelettgiften wird in Übereinstimmung die Expression für Interleukin-1 α [128] und der Transkriptionsfaktor AP-1 erhöht. Beim Transkriptionsrepressor YY1 und der Caspase-10 wird die Expression nach Cytochalasin D-Inkubation erhöht, nach Colchicin-Behandlung vermindert. Beide Zytoskelettnoxen lösen mit der Aktivierung von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 α) und der Aktivierung eines Transkriptionsfaktors ein Muster vergleichbar zu dem einer Entzündung aus. Die Entzündungsreaktion nach Cytochalasin D-Behandlung ist viel ausgeprägter, denn zusätzlich zu IL-1 α werden weitere proinflammatorische Gene in ihrer Expression erhöht: IL-1 β , IL-8, IL-12 und Macrophage inflammatory protein 1 α . Die Expressionserhöhung der anderen Gene läßt auf eine Aktivierung der Zelle in Richtung Abwehr und Einleitung der Reparatur schließen. Es werden jedoch auch andere Mechanismen aktiviert, die in Richtung Zelltod führen. Nach Cytochalasin D-Behandlung werden auch der Transkriptionsrepressor YY1 und die Caspase-10 in ihrer Expression erhöht. Caspasen sind Teil des Apoptose-Regulationssystems, das bei zu großen, irreparablen Schäden die Zelle in den kontrollierten Zelltod führt. Bei diesem Regulationssystem handelt es sich um eine Vielzahl von Proteinen, die Teils pro- und teils anti-apoptotisch wirken und sich so gegenseitig regulieren [129, 130].

Bei den Colchicin-behandelten Zellen herrscht eine Verminderung der Genexpression vor. Die Zelle scheint in eine Art „Stase“ zu fallen, wobei gleichzeitig durch Expressionsverminderung der Caspase-10 (pro-apoptotisch) und Erhöhung von bcl-2 (anti-apoptotisch) [131, 132] eine frühzeitige Einleitung der Apoptose verhindert werden soll. Eine Ruhe der Zelle ist wichtig, würde sie sich in diesem Zustand z.B. in einen Zellteilungszyklus begeben, könnten die Chromosomen nicht mehr getrennt werden und es entstünden polyploide Zellen, was das Entartungs-Risiko erhöht.

Einfluß von P90, EC90 und SDR auf die Genexpression bei MM6-Zellen

Untersuchungen zur Zytokinexpression an MM6-Zellen in unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, daß bei Vorinkubation der Zellen mit EC90 eine durch LPS-Behandlung induzierte Erhöhung der TNF- α -Expression geringer ist als ohne Vorbehandlung mit Teilchen. Die Partikeln hatten also eine modulierende Wirkung auf die TNF- α -Expression nach Stimulation mit LPS. Diese Ergebnisse führten dazu, nicht nur nach direkter expressionsverändernder

Wirkung der Partikeln zu suchen, sondern auch nach ihrer modulatorischer Wirkung auf die Aktivierung der Zellen durch LPS.

Bei jeder Partikelart wurde deshalb das genexpressionsverändernde Potential auf die Zellen alleine, die Wirkung von LPS alleine und die Kombination aus Partikeln-Vorinkubation und anschließender LPS-Stimulation mit unbehandelten Zellen verglichen.

Tab. 2.5 zeigt die Ergebnisse für die Inkubation mit P90, Tab. 2.6 die Ergebnisse für EC90 und in Tab. 2.7 sind die Resultate für SDR zusammengefaßt. Bei den aufgelisteten Genen handelt es sich um eine Auswahl derer, die in der Computerauswertung und nach visueller Kontrolle der Autoradiographiefilme die stärkste Expressionsänderung zeigten. Abbildungen von den Autoradiographiefilmen der einzelnen Versuche und die vom Auswerteprogramm erstellte Liste befindet sich im Anhang dieser Arbeit (Kapitel 8). Aus den bereits auf eindeutige Expressionsveränderung geprüften Genen der drei Versuche wurde nochmals eine Auswahl getroffen, die in Tabelle 2.8 zusammengestellt ist. Diese Gene zeigen eine sehr deutliche Änderung ihrer Expression unter dem Einfluß der Partikeln. Die Wirkung der Partikeln alleine stand also im Vordergrund.

Auch Zellen einer Zell-Linie können an verschiedenen Tagen unterschiedlich auf den gleichen Reiz reagieren. Diese Variationen sind jedoch viel geringer als bei primären Zellen, bei denen sich z.B. große interindividuelle Unterschiede zeigen können. Deshalb war es bei den cDNA-Expressions-Array-Versuchen hilfreich, jedesmal eine LPS-Probe mitzuführen und die Reaktionen der Zellen der verschiedenen Versuche zu vergleichen (Kapitel 7. Anhang, Tab. 7.3, 7.6 und 7.9). Von mit LPS stimulierten MM6-Zellen wird ein Anstieg an Entzündungsmediatoren erwartet. Wichtige Marker für eine solche Reaktion sind z.B. die Erhöhung der Expression für „Macrophage inflammatory protein 1 und 2“ (MIP-1, MIP-2) und Interleukine. Die MM6-Zellen aus dem EC90-Versuch waren insgesamt stärker durch LPS stimuliert. Das Expressionsmuster, besonders für die sehr stark in ihrer Expression veränderten Gene aber stimmte zwischen den einzelnen Versuchen (P90, EC90, SDR) überein. Somit sind die Ergebnisse gut vergleichbar.

In der Literatur finden sich einige Hinweise, die die Wirkung von Partikeln meist auf Makrophagen oder Epithelzellen untersuchen. Dabei handelt es sich um eng eingekreiste Fragestellungen, z.B. Apoptose-Induktion durch urbane Umweltpartikeln [133]. Nach der Literatur wurde noch kein breit angelegtes Screening nach Genen, deren Expression durch Partikeln verändert wird, durchgeführt. Deshalb stellen die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse einen wichtigen Anhaltspunkt für die Wirkung von Partikeln auf der Ebene der Genexpression und dar und geben Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen. Aus der Vielzahl der in ihrer Expression veränderten Gene wurden 15 zur weiteren Untersuchung herausgesucht, die nachfolgend diskutiert werden.

Wirkung von P90 auf die Genexpression

P90 erhöhte in MM6-Zellen die Expression des Gens für Cyclin H. Dies ist ein regulatorisches Protein, das bei der Steuerung des Zellzyklus und der Transkription von Genen eine wichtige Rolle spielt [134, 135]. Es wird z.B. im Zellzyklus für den Eintritt in die Mitose, d.h. Zellteilung, benötigt. Seine Expressionserhöhung könnte Ausdruck einer allge-

meinen inflammatorischen Mobilisierungsreaktion sein. Bowden und Koautoren [24] beschrieben eine Aktivierung der Zellteilung von Alveolarmakrophagen als ein Mechanismus, im Rahmen einer Entzündungsreaktion rasch Zellen zur Verfügung zu stellen.

Die Expression von Ephrin R-Rezeptoren wird ebenfalls von P90 erhöht. Ihre Funktion sind die Steuerung von Zell-Zell-Kontakten, über die Signale an intrazelluläre Signalwege weitergeleitet werden. Das Aktin-Zytoskelett ist eine Hauptkomponente der mit dem Rezeptor verbundenen Signalwege [136]. Diese Signalwege regulieren Funktionen des Aktin-Zytoskeletts, die bei einer Immunreaktion eine wichtige Rolle spielen wie z.B. Motilität der Zelle (Bewegung zum Entzündungsherd) und Phagozytose.

Wirkung von EC90 auf die Genexpression

EC90-Partikeln hatten eine expressionserhöhende Wirkung auf das Gen für I-rel. I-rel (RelB) ist eine wichtige Komponente des Rel/NF-kB-Transkriptionsfaktor-Systems. Dieses System reguliert wichtige zelluläre Prozesse wie Zellteilung, Differenzierung und immunologische Funktionen [137].

Wirkung von SDR auf die Genexpression

Mit dem SDR wurden die meisten Veränderungen in der Genexpression gefunden, während EC90 die geringsten Effekte zeigte. Möglicherweise sind für EC90 und P90, bei denen eine deutliche Wirkung auf den Oxidativen Burst bzw. bei der Beeinflussung der Zytoskelettparameter gezeigt werden konnte, Effekte auf die Genexpression erst nach einer längeren Inkubationsdauer als zwei Stunden nachweisbar.

SDR erhöhte die Expression des Gens für die Poly-(ADP-ribose)-Polymerase. Diese Enzym katalysiert das Anhängen einer Polyadenosin-Kette an fast alle eukaryotischen mRNAs und nimmt somit Einfluß auf die Genexpression [138]. Es ist insbesondere für die ADP-Ribosylierung von Proteinen innerhalb von Signaltransduktionsprozessen verantwortlich, die in Entzündungsprozessen eine Rolle spielen (Gefäßpermeabilität, TNF- α - und IFN- γ Sekretion usw.) [139].

Das Excision Repair Protein ist am Reparaturprozeß bei DNA-Schäden beteiligt [140]. Möglicherweise ist seine Expressionserhöhung Folge der Einbringung polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe mit den SDR (z.B. Benzo[a]pyren; auf eine Liste der aromatischen Kohlenwasserstoffe, die sich auf den SDR-Partikeln befinden, wird in Kapitel 5.1.7 verwiesen). Die Aromaten lösen sich z.T. von den Partikeln, sind bioverfügbar und können DNA-Addukte bilden [121].

TNF- α ist ein proinflammatorisches Zytokin, das wichtige Funktionen bei der Infektabwehr, Immunreaktionen und Entzündungsprozessen besitzt [141]. TNF- α scheint durch SDR nicht direkt beeinflußt zu werden. Es beeinflußt jedoch die LPS-Stimulierbarkeit der Zellen. Die MM6-Zellen antworten nach Vorbehandlung mit SDR mit einer deutlich geringeren LPS-induzierten Bildung von TNF- α als bei LPS allein.

Der P2X Purinoceptor 1 ist ein ATP-bindender Rezeptor mit Ionenkanal-Funktionalität (Ca²⁺). Er spielt in Signaltransduktionsprozessen eine Rolle [142 - 144]. Diese Eigenschaften machen ihn besonders interessant, denn z.B. hat die Ca²⁺-Konzentration in der Zelle Einfluß

auf den Oxidativen Burst, die O^{2-} -Konzentration wiederum auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B, der die Expression vieler inflammatorischer Proteine steuert [145].

Ets Transcription Factor sind transkriptionsaktive und sequenzspezifische DNA-Bindeteine, und verantwortlich für normales Zellwachstum und Differenzierung. Auch in der Entwicklung und der Funktion des Immunsystems kommt ihm eine wichtige Rolle zu [146]. Es werden viele Gene oder Promotoren für Gene über ETS gesteuert, die für immunologisch wichtige Proteine kodieren, wie z.B. MIP-1 α , IL-1b Promotor, IL-2 Rezeptor α enhancer usw. ETS Transcription Factors werden auch als Onkogene bezeichnet, denn ihre Deregulation führt zu verschiedenen Formen von Leukämie und anderen Krebsformen [147]. Eine Überaktivierung durch den Einfluß von SDR könnte ein Krebsauslöser sein.

Cadherine sind Ca^{2+} -abhängige, transmembrane interzelluläre Adhäsionsproteine mit morphoregulatorischer Funktion bei der Entwicklung und der Aufrechterhaltung der Organisation von Gewebe. M-Cadherine haben bei der Entwicklung von Skelettmuskelzellen eine wichtige Funktion [148] und spielen möglicherweise auch bei Makrophagen eine Rolle.

Serine/threonine protein kinase receptor R2 (SKR2) ist ein Aktivin Typ I-Rezeptor, der in der Signaltransduktion in einer Vielzahl zelluläre Prozesse vorkommt [149].

MSX homeobox protein ist ein Transkriptionsfaktor, der bei der Entwicklung von Geweben eine Rolle spielt [150, 151]. Welche Rolle er bei reifen, d.h. differenzierten Makrophagen spielen könnte, ist nicht klar.

Complement component 5 (C5) ist ein Protein aus der Komplementkaskade und in der humoralen Immunabwehr beteiligt. Während des Aktivierungsprozeß entsteht aus C5 das C5a (Anaphylatoxin), ein extrem potentes proinflammatorisches Protein, das u.a. Neutrophile Granulozyten zum Infektionsort lockt (Chemotaxis). Zusammen mit weiteren Komplement-Komponenten wird ein „membrane attack complex“ gebildet (MAC, C5b-9), der zur Lyse von Zellen führt. Makrophagen von Mäusen, die kein C5 bilden können, ist die Menge an TNF- α reduziert, was Auswirkung auf den Ablauf der Immunreaktion hat [152, 153]. Eine Erhöhung der C5-Konzentration könnte einen Entzündungsprozeß weiter fördern und ein Überschießen der Reaktion begünstigen.

α 1-Antichymotrypsin ist ein Plasma-Protein, das zur Gruppe der Serin-Proteinase-Inhibitoren gehört. Es inhibiert proteolytische Enzyme von z.B. Neutrophilen Granulozyten (Cathepsin G) oder Mastzellen (Chymasen), die bei Entzündungsprozessen an das umliegende Gewebe abgegeben werden und schützt somit das Gewebe vor Schädigung durch Verdau. Fehlt das Protein oder ist es in seiner Konzentration vermindert, kommt es zu vielen Krankheitsbildern, wie z.B. Bildung von Plaques im Gehirn (Alzheimer), chronischen Entzündungsprozessen, Zirrhosen der Leber, Entwicklung von COPD [154, 155 - 157].

Interleukin-1 β (IL-1 β) ist ein proinflammatorisches Zytokin, das eine breite Wirkung in biologischen Systemen besitzt. Es lockt z.B. wie TNF- α Neutrophile Granulozyten an und stimuliert bei ihnen die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Makrophagen kann es zu erhöhter Bildung von ROS veranlassen. In Hinblick auf die Lunge ist IL-1 β bei der Neutrophilen-abhängigen akuten endematösen Lungenerkrankung und bei dem „acute respiratory distress syndrome“ (ARDS) beteiligt [128, 158].

Interleukin-8 (IL-8) ist ebenfalls ein proinflammatorisches Zytokin und als wichtiger Mediator bei akuten Entzündungsprozessen u.a. in der Lunge beteiligt [159, 160]. Während

SDR-behandelte Zellen keine erhöhte Mengen an IL-8 bilden, wirkt die Vorstimulation mit SDR und die anschließende Gabe von LPS synergistisch. IL-8 wird bei Anwesenheit von SDR in erhöhtem Maße gebildet und entfaltet möglicherweise entsprechend übermäßig seine chemotaktische aktivierende Wirkung.

Durch den Einsatz der cDNA-Expressions-Array-Technik konnte auf breiter Basis der Einfluß von ultrafeinen Partikeln, die in der Umwelt vorkommen und vom Menschen eingeatmet werden, auf die Genexpression gezeigt werden. Es wurden Gene identifiziert, die in einem Zusammenhang mit der Zellaktivität von Immunzellen und der Regulation von Entzündungsprozessen stehen. Damit sind die Voraussetzungen gegeben, das Potential von urbanen, ultrafeinen Umweltpartikeln gezielt zu untersuchen, Krankheiten wie chronisch entzündliche Lungenveränderungen, COPD oder gar Krebs auszulösen.

4. Zusammenfassung

Verbrennungsprozesse sind in den modernen Industriestaaten Europas allerorts zu finden, sei es in Industrieanlagen, im Autoverkehr oder bei der Wohnungszheizung. Durch Steigerung der Produktion und des Verkehrs finden sich immer mehr Partikeln in der Atemluft. Abhängig vom Verbrennungsprozeß und einer immer feiner entwickelten (Verbrennungs-) Technik, steigt der Anteil ultrafeiner Partikeln (Durchmesser unter $0,1 \mu\text{m}$) an, obwohl der gesamte Massenausstoß zurückgeht. Bis vor wenigen Jahren hat man den ultrafeinen Partikeln wenig Beachtung geschenkt, denn, gemessen an ihrer Masse, ist ihr Anteil unter den partikulären Bestandteilen der Luft verschwindend gering. Betrachtet man aber ihre Anzahl oder ihre spezifische Oberfläche, ist ihr Anteil groß.

In den vergangenen zehn Jahren ergaben mehrere Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen entzündlichen Reaktionen nach Einbringen von ultrafeinen Titandioxidpartikeln (Durchmesser 20 nm) in die Lunge, nicht aber bei feinen Partikeln (Durchmesser 250 nm) des gleichen Materials [4]. Bei Verabreichung von Kohlenstoffpartikeln wurden die gleichen Ergebnisse gefunden [3]. Eingeatmete Partikeln interagieren direkt mit dem Lungengewebe oder werden von Alveolarmakrophagen phagozytiert.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, in welchem Maße feine und ultrafeine Partikeln, abhängig von ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften, schädigende Wirkungen auf Alveolarmakrophagen haben. Die Untersuchungen der Interaktion zwischen Zellen und Partikeln konzentrierten sich auf die Phagozytose von Partikeln und die dabei beteiligten Rezeptoren, auf die Fähigkeit der Partikeln, einen Oxidativen Burst auszulösen, auf ihre Wirkung, die mechanische Integrität des Zytoskeletts zu beeinflussen und auf ihre Fähigkeit, die Genexpression in den Zellen zu verändern.

Die Inkubation der Makrophagen mit Partikeln führt, je nach chemischer Beschaffenheit der Partikeln und je nach Belegung der Oberfläche mit immunkompetenten Proteinen (Opsonierung), zur Phagozytose über Fc-, Komplement- und Scavenger-Rezeptoren und damit zur Aufnahme in die Zellen. Opsonierte Partikeln werden sehr rasch phagozytiert. Nicht opsonierte urbane Umweltpartikeln werden etwas langsamer vor allem über Rezeptoren des Scavenger-Typs aufgenommen. Dazu ist ein intaktes Zytoskelett der Zellen notwendig. Vor allem die Zerstörung der Aktin-Filamente durch die Modellnoxo Cytochalasin D bringt die Phagozytose der opsonierten als auch der nicht opsonierten Partikeln fast vollständig zum Erliegen.

Während feine und ultrafeine Titandioxid-Partikeln keinen oder nur einen geringen Oxidativen Burst auslösten, führten ultrafeine Kohlenstoffpartikeln mit großer spezifischer Oberfläche wie Printex 90 (P90; $300 \text{ m}^2/\text{g}$) zu einem starken Burst. Hochreine ultrafeine Partikeln aus Kohlenstoff (EC90; $600 \text{ m}^2/\text{g}$) erzeugten nur einen geringen Oxidativen Burst.

Ein intaktes Aktin-Zytoskelett ist Voraussetzung für die effektive Produktion von Sauerstoffradikalen beim Oxidativen Burst. Durch Zerstörung der Aktin-Filamente durch

Cytochalasin D war der durch opsoniertes Zymosan induzierte Burst und damit die Abwehrfähigkeit der Zellen um mehr als 50% vermindert.

Die Resultate zeigen, daß ultrafeine Kohlenstoffpartikeln einen erhöhten Oxidativen Burst in monozytären Zellen provozieren. Durch die erhöhte Konzentration an Sauerstoffradikalen können die Systeme in den Zellen und im Gewebe, die das Redoxgleichgewicht aufrecht erhalten (z.B. das Glutathion-System), zusätzlich belastet werden. Daraus resultiert eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber zusätzlichen (z.B. bakteriellen) Belastungen.

Für bestimmte immunologische Funktionen der monozytären Zellen ist die Integrität des Zytoskeletts eine wichtige Voraussetzung, wie z.B. für die Phagozytose oder den Oxidativen Burst gezeigt werden konnte. Um funktionelle Eigenschaften des Zytoskeletts zu erfassen, wurden zytomagnetometrische Meßmethoden eingesetzt. Als Parameter wurden die Relaxation (Phagosomentransport) und die Steifigkeit (Zytoskelettdynamik) in primären Alveolarmakrophagen von Beagle-Hunden und in einer Makrophagen-Zell-Linie (J774A.1) gemessen.

Nur ultrafeines Titandioxid führt zu einer Verlangsamung der Relaxation und einer Erhöhung der Steifigkeit (d.h. zu einer Inhibition der Phagosomentransportprozesse und einer Verminderung der Zytoskelettdynamik). Bei EC90-Partikeln unterscheiden sich die Reaktionen der beiden untersuchten Zelltypen. Während die Maus-Makrophagen-Zell-Linie auf EC90-Partikeln mit einer Verlangsamung des Phagosomentransports und einer Versteifung des Zytoskeletts reagierten, war die Reaktion bei den Beagle-Hunde-Alveolarmakrophagen umgekehrt. Einzig bei Langzeitinkubation (24 h) dieser Zellen kam es auch hier zu einer Versteifung des Zytoskeletts. Mit Benzo[a]pyren beschichtete EC90-Partikeln wurde nur bei der Maus-Makrophagen-Linie getestet, hier führte es zu einer Verminderung der Steifigkeit des Zytoskeletts (und damit zu einer Erhöhung der Mobilität und der Umbaudynamik). Bei P90 war die Reaktion des Zytoskeletts der beiden Zelltypen einheitlich. P90 induzierte eine verschleunerte Relaxation (Beschleunigung von Transportprozessen) und verminderte die Steifigkeit des Zytoskeletts (Erhöhung der Zytoskelett-Umbaudynamik und damit Erhöhung der Zell-Mobilität). Ultrafeine Partikeln wirken in hohen Konzentrationen (ab 100 µg pro ml und pro 10⁶ Zellen) zytotoxisch auf Zytoskelettfunktionen.

Eine verändernde Wirkung auf die Genexpression kann von den Partikeln selbst oder von ihrer Interaktion mit dem Zytoskelett ausgehen. Nach Zerstörung der Aktin-Filamente durch die Modellnoxe Cytochalasin D kam es bei humanen MM6-Makrophagen in großem Umfang zu einer Aktivierung von Genen, die hauptsächlich Entzündungsmediatoren, Transkriptionsfaktoren und regulatorisch wirksame Proteine betraf. Nach Zerstörung der Mikrotubuli-Filamente durch die Modellnoxe Colchicin wurde eher eine Verminderung der Genexpression beobachtet. Neben der Erhöhung von Entzündungsmediatoren, von Transkriptionsfaktoren und von Proteinen, die mit der Apoptose in Verbindung stehen, wurde hauptsächlich einer Verminderung der Expression vieler anderer Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktoren, gemessen.

Als Referenz für eine Entzündungsreaktion wurde die Genexpression nach Behandlung der MM6-Zellen mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) untersucht. Entzündungsmediatoren wie „Macrophage inflammatory protein 1 und 2“ sowie Zytokine (TNF-α, IL-8, IL-1

usw.) und intrazelluläre Regulationsproteine und werden stark in ihrer Expression erhöht.

Die Fähigkeit der Partikeln, Gene in ihrer Expression zu beeinflussen, konnte nicht ohne weiteres den physikalischen Eigenschaften der Partikeln (z.B. ihrer spezifischen Oberfläche) zugeordnet werden. Die Kohlenstoffpartikeln P90 und EC90 beeinflussten die Expression oder Repression unterschiedlicher Gene, wie z.B. intrazelluläre Signalproteine, insgesamt in geringerem Maße als dies bei Partikeln, die bei der Verbrennung von Dieselkraftstoff in einem Dieselmotor entstehen (Standard-Diesel-Ruß; SDR), der Fall war. SDR erhöht die Expression von Oberflächenrezeptoren, Regulationsproteinen und Proteinen mit immunologischen Funktionen.

Einige Gene wurden direkt durch die Partikeln in ihrer Expression beeinflusst, auch kam es durch Partikeln zur Modulation der Expression LPS-induzierter Gene im Sinne einer Verminderung aber auch einer Erhöhung. Direkt oder indirekt (über das Zytoskelett und damit verbundene Signaltransduktionswege) wirken ultrafeine Partikeln (P90, EC90 und SDR) sowie das Zytoskelett schädigende Stoffe (Cytochalasin D und Colchicin) modifizierend auf die Genexpression von Alveolarmakrophagen.

Zusammenfassend weisen die Daten darauf hin, daß ultrafeine Partikeln in biologische Systeme eingreifen und die Balance der hier untersuchten physiologischen Prozesse stören. Dies gilt bei Alveolarmakrophagen für den Oxidativen Burst und für die Funktionsweise des Zytoskeletts, von der weitere Prozesse wie die Phagozytose abhängen. Dabei erzeugen ultrafeine Partikeln deutlichere Effekte als feine Partikeln des gleichen Materials. Ultrafeine Partikeln beeinflussen auch die Genexpression von monozytären Zellen. Durch Modifikation der Expression von regulatorisch wirkenden Enzymen, von Oberflächenrezeptoren und vor allem von Transkriptionsfaktoren greifen sie tief in das Zellgeschehen ein. Die hier erhobenen Daten geben erste Anhaltspunkte, den phenomenologischen Untersuchungen ihre molekularbiologische Basis zuzuordnen.

5. Experimenteller Teil

5.1 Material

5.1.1 Reagenzien

| | |
|--|--|
| [α - ³² P]dATP | 3.000 Ci/mmol; 10 mCi/ml, Kat.Nr. PB10204, Amersham, Freiburg |
| A. dest. / A. deion. | bidestilliertes Wasser / Ionenaustauscher-Wasser |
| Agarose Gold | Qualex Gold, AGS, Heidelberg |
| Ammoniumacetat | 7,5 M Lösung, Kat.Nr. A-2706, Sigma, Taufkirchen |
| Ammoniumthiocyanat | Kat.Nr. A-7149, Sigma, Taufkirchen |
| Atlas cDNA Array | cDNA Expressions-Array human 1.2, 1.176 Gene Kat.Nr. 7852-1, Clontech, Heidelberg |
| H ₃ BO ₃ | Kat.Nr. 1.12015, Merck, Darmstadt |
| Bromphenolblau | 3', 3'', 5', 5''-Tetrabromophenolsulfonphthalein Kat.Nr. B-5525, Sigma, Taufkirchen |
| BSA | Kat.Nr. A-2153, Sigma, Taufkirchen |
| BSA, FITC-markiert | Kat.Nr. A-841, Molecular Probes, Leiden, Niederlande |
| Chloroform | Kat.Nr. C-2432, Sigma, Taufkirchen |
| Chloroform/Isoamyl- alkohol-Gemisch | Mischungsverhältnis 24:1, Kat.Nr. X205, Amresco, Solon, USA |
| Colchicin | Kat.Nr. C-9754, Sigma, Taufkirchen |
| Cytochalasin D | Kat.Nr. C-8273, Sigma, Taufkirchen |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindol, Kat.Nr. D-9542, Sigma, Taufkirchen |
| DCFH-DA | 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat, Kat.Nr. D-399, Molecular Probes, Leiden, Niederlande |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat, Kat.Nr. D-5758, Sigma, Taufkirchen |
| Dextransulfat | Kat.Nr. D-4911, Sigma, Taufkirchen |
| DiffQuick | Kat.Nr. 130832, Dade Behring, Marburg |
| DiI | 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin-Perchlorat, Kat.Nr. D-282 Molecular Probes, Leiden, Niederlande |
| DNA Marker VI | Molecular Weight Marker VI, 0,15-2,1 kbp, Kat.Nr. 1062590, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim |
| DNaseI | 10 U/ μ l, Kat.Nr. 776785, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim |
| DNeasy Tissue Kit | DNA-Extraktions-Kit, Kat.Nr. 69504, Quiagen, Hilden |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure, Kat.Nr. E-5134, Sigma, Taufkirchen |
| EGTA | Ethylenglycol-bis[b-aminoethylether]-N,N',N'-tetraessigsäure Kat.Nr. E-3889, Sigma, Taufkirchen |
| Einmalspritze | 10 ml, Plastipak, Kat.Nr. 300865, Becton Dickinson, Heidelberg |

5. EXPERIMENTELLER TEIL

| | |
|--|---|
| Ethanol | absolut, Kat.Nr. 1.00983, Merck, Darmstadt |
| Ethidiumbromid | Kat.Nr. E-2515, Sigma, Taufkirchen |
| FCS | Seromed FCS, low Endotoxin, Kat.Nr. S 0115, Lot 371 S, Biochrom KG, Berlin |
| Formaldehyd | Kat.Nr. F-8775, Sigma, Taufkirchen |
| Formamid | Kat.Nr. F-9037, Sigma, Taufkirchen |
| Glutaraldehyd | 50 %ige wässrige Lösung, Kat.Nr. G-7651, Sigma, Taufkirchen |
| Glycogen | Kat.Nr. G-0885, Sigma, Taufkirchen |
| Glycerin | Kat.Nr. G-5516, Sigma, Taufkirchen |
| Guanidinthiocyanat | Kat.Nr. G-9277, Sigma, Taufkirchen |
| Hammelblut | Kat.Nr. ORAW 31, Dade Behring, Liederbach |
| Heparin | Heparin-Natrium-25000-ratiopharm, Ratiopharm, Ulm |
| HBSS-Puffer | ohne Phenolrot, Kat.Nr. 14025-050, Life Technologies, Leopoldshafen |
| Isopropanol | Kat.Nr. I-9516, Sigma, Taufkirchen |
| Kanüle | Venofix, Kat.Nr. 04048083, B. Braun, Melsungen |
| KCl | Kat.Nr. P-3911, Sigma, Taufkirchen |
| KH_2PO_4 | Kat.Nr. 1.04873, Merck, Darmstadt |
| Lachs-Sperma-DNA | Kat.Nr. D-7656, Sigma, Taufkirchen |
| Lipopolysaccharid | von Salmonella minnesota, Kat.Nr. L-6261, Sigma, Taufkirchen |
| Lymphoprep | Dichte 1,077 g/ml, Kat.Nr. 1053980, Nycomed Pharma, Oslo, Norwegen |
| MES | 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure, Kat.Nr. M-8250, Sigma, Taufkirchen |
| Methanol | Kat.Nr. 1.06009, Merck, Darmstadt |
| $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ | Kat.Nr. M-0250, Sigma, Taufkirchen |
| Mineralöl | Kat.Nr. M-5904, Sigma, Taufkirchen |
| MOPS | 3-[N-Morpholino]-propansulfonsäure Kat.Nr. M-8899, Sigma, Taufkirchen |
| NaBH_4 | Kat.Nr. S-9125, Sigma, Taufkirchen |
| $\text{Na}_3\text{Citrat} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | Kat.Nr. C-8532, Sigma, Taufkirchen |
| NaCl | Kat.Nr. S-9625, Sigma, Taufkirchen |
| NaCl | DNase-, RNase-frei, Kat.Nr. S-3014, Sigma, Taufkirchen |
| NaH_2PO_4 | Kat.Nr. S-3139, Sigma, Taufkirchen |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | Kat.Nr. 1.06580, Merck, Darmstadt |
| NaOH | Kat.Nr. S-0899, Sigma, Taufkirchen |
| NaN_3 | Kat.Nr. S-8032, Sigma, Taufkirchen |
| NaOH-Plätzchen | Kat.Nr. S-0899, Sigma, Taufkirchen |
| Natriumacetat | Kat.Nr. S-2889, Sigma, Taufkirchen |
| Nocodazol | Kat.Nr. M-1404, Sigma, Taufkirchen |
| Opsonierungs- reagenz | für E. coli, Kat.Nr. E-2870, Molecular Probes, Leiden, Niederlande für S. aureus, Kat.Nr. S-2860, Molecular Probes, Leiden, Niederlande |

| | |
|---------------------|--|
| pAW109 | Kat.Nr. N8080037, PE Applied Biosystems, Weiterstadt |
| Paclitaxel | Kat.Nr. T-7402, Sigma, Taufkirchen |
| Paraformaldehyd | Kat.Nr. 19200, Electron Microscopy Sciences, München |
| Phalloidin | Kat.Nr. P-3457, Molecular Probes, Leiden, Niederlande |
| Phenol | Kat.Nr. P-1037, Sigma, Taufkirchen |
| Phenol/Chloroform/ | pH 8,0, Mischungsverhältnis 25:24:1, |
| Isoamylalkohol | Kat.Nr. P-2069, Sigma, Taufkirchen |
| PIPES | Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure), Kat.Nr. P-8658, Sigma, Taufkirchen |
| PMA | Phorbol-12-myristat-13-acetat, Kat.Nr. P-8139, Sigma, Taufkirchen |
| RNA-Clean | Kat.Nr. RC200, Hybaid, Teddington, UK |
| Polyinosinsäure | Kat.Nr. P-4154, Sigma, Taufkirchen |
| Polymorphprep | Kat.Nr. 1001971, Nycomed Pharma, Oslo, Norwegen |
| Prolong Antifade | Kat.Nr. P-7481, Molecular Probes, Leiden, Niederlande |
| Rhodamin-Phalloidin | Kat.Nr. R-415, Molecular Probes, Leiden, Niederlande |
| RNaseZAP | Kat.Nr. R-2020, Sigma, Taufkirchen |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat, Kat.Nr. L-5750, Sigma, Deisenhofe |
| Sucrose | Kat.Nr. S-0389, Sigma, Taufkirchen |
| Tris-Base | Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Kat.Nr. T-6791, Sigma, Taufkirchen |
| Tris HCl | Kat.Nr. 100840, Paesel-Lorei, Hanau |
| Triton X-100 | Kat.Nr. 807423, ICN, Eschwege |
| Trizma-Puffer | besteht aus Tris(hydroxymethyl)aminomethan und Tris HCl, Kat.Nr. T-4003, Sigma, Taufkirchen |
| tRNA | aus Brauhefe, Kat.Nr. 109517, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim |
| Trypanblau | Kat.Nr. T-6146, Sigma, Taufkirchen |
| Trypsin/EDTA | 0,25 % Lösung, Kat.Nr. T-4049, Sigma, Taufkirchen |
| Wasser, reinst | Kat.Nr. W-4502, Sigma, Taufkirchen |
| Ziegenserum | Kat.Nr. 16210-064, Life Technologies, Leopoldshafen |
| Zymosan A | Kat.Nr. Z-4250, Sigma, Taufkirchen |

5.1.2 Lösungen und Medien

| | |
|--|--|
| Abdil-Puffer | TBS-Puffer supplementiert mit 0,1 % Triton X-100 und 2 % Ziegenserum |
| Agarosegel, denaturie- rend für RNA | 4,57 g Agarose ad 400 ml (H ₂ O / 0,1 % DEPC); erhitzen bis Agarose geschmolzen 1,7 ml 10-fach MOPS-Lösung 2,5 ml Formaldehyd (12,3 M) |
| Aminosäuren, n.e. | nicht essentielle Aminosäuren MEM 100-fach, Kat.Nr. 11140-035, Life Technologies, Leopoldshafen |

5. EXPERIMENTELLER TEIL

| | | |
|-----------------------------------|---|--|
| BB80 Brinkley Buffer | 80 mM | PIPES (pH 6,8) |
| | 1 mM | MgCl ₂ • 6 H ₂ O |
| | 5 mM | EGTA |
| | pH 6,8, als 5-fach Stammlösung bei 4 °C lagern | |
| CB Zytoskelett-Puffer | 10 mM | MES (pH 6,1) |
| | 138 mM | KCl |
| | 3 mM | MgCl ₂ • 6 H ₂ O |
| | 2 mM | EGTA |
| | pH 6,1, als 5-fach Stammlösung bei 4 °C lagern | |
| CB mit Sucrose | CB + 0,32 M Sucrose; Sucrose stets frisch zugeben | |
| DAPI-Stammlösung | 0,5 mg/ml in PBS-Puffer | |
| DCFH-DA | 5 mM in EtOH absolut Stammlösung, Endkonzentration 10 µM | |
| 10-fach DNaseI-Puffer | 6,3 g | Tris HCl (400 mM) |
| | 0,584 g | NaCl (100 mM) |
| | 1,2 g | MgCl ₂ • 6 H ₂ O (60 mM) |
| | ad 100 ml (Reinstwasser); pH 7,5 | |
| 10-fach DNA-Denaturierungs-Lösung | 4 g | NaOH (1 M) |
| | 0,372 g | EDTA (10 mM) |
| | ad 100 ml (Reinstwasser) | |
| 10-fach DNaseI-Terminationsmix | 3,72 g | EDTA (0,1 M) |
| | 0,1 g | Glycogen (1 mg/ml) |
| | ad 100 ml (Reinstwasser); pH 8,0 | |
| EDTA-Lösung 0,1 M | 3,72 g | EDTA (0,1 M) |
| | ad 100 ml (H ₂ O / 0,1 % DEPC); pH 7,5 | |
| H ₂ O / 0,1 % DEPC | unter Rühren über Nacht bei RT inkubieren, vor Gebrauch autoklavieren | |
| DI | 10 mg/ml in EtOH absolut | |
| FCS | Seromed low endotoxin, Kat.Nr. S 0115, Lot 371 S, Biochrom KG, Berlin | |
| gDNA | genomische DNA, extrahiert aus 2 x 10 ⁷ MM6-Zellen mit DNeasy Tissue Kit, Quiagen, Hilden | |
| J774 Medium | RPMI-1640 | |
| | 5 % | FCS |
| | 2 mM | L-Glutamin |
| | 100 IU/ml Penicillin | |
| | 100 µg/ml Streptomycin | |
| L-Glutamin | 200 mM, Kat.Nr. G-7513, Sigma, Deisenhofen | |
| MM6 Medium | RPMI-1640 | |
| | 10 % | FCS |
| | 2 mM | L-Glutamin |
| | 200 IU/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin, 1 vial / L OPI | |
| | 5 ml | nicht-essentielle Aminosäuren |
| | pH 7,4 | |

| | | |
|--------------------------------|--|---|
| 10-fach MOPS-Puffer | 83,72 g | MOPS (0,4 M) |
| | 8,2 g | Natriumacetat (0,1 M) |
| | 3,7 g | EDTA (10 mM) |
| | ad 1 L (H_2O / 0,1 % DEPC); pH 7,0; vor Gebrauch autoklavieren | |
| Natriumacetat-Lösung 1 M | 8,2 g | Natriumacetat |
| | ad 100 ml (Reinstwasser); pH 4,5 | |
| Natriumacetat-Lösung 2 M | 16,41 g | Natriumacetat |
| | ad 100 ml (Reinstwasser); pH 4,5 | |
| 2-fach Neutralisierungs-Lösung | 12 g | NaH_2PO_4 (1 M) |
| | ad 100 ml (Reinstwasser) | |
| O.D.-Messpuffer | 788 mg | Tris HCl (50 mM) |
| | 3,72 mg | EDTA (0,1 mM) |
| | ad 100 ml (H_2O / 0,1 % DEPC); pH 7,5 | |
| OPI | 0,15 g | Oxalacetat, 0,05 g Pyruvat, 0,0082 g Insulin |
| | (ca. 24 IU/mg), Kat.Nr. O-5003, Sigma, Taufkirchen | |
| PBS (LPS-frei) | 57 mM | $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ |
| | 18 mM | KH_2PO_4 |
| | 75 mM | NaCl |
| | pH 7,4 | |
| PBS | Dulbeccos PBS, pH 7,4, LPS-frei, Kat.Nr. 14040, Life Technologies, Leopoldshafen | |
| Pen/Strep | Penicillin 10.000 IU/ml, Streptomycin 10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Kat.Nr. 15140-114, Life Technologies, Leopoldshafen | |
| Phalloidin | 1 mg/ml Methanol, lagern bei -20°C | |
| Phenol-Lösung, gesättigt | 100 g | Phenol (schmelzen bei 70°C) |
| | 65 ml | Sättigungspuffer für Phenol |
| | pH 4,0 | |
| Rhodamin-Phalloidin | 200 U/ml Methanol, lagern bei -20°C | |
| RNA-Ladepuffer | 45 μl | Formaldehyd 12,3 M |
| | 45 μl | Formamid |
| | 5 μl | 10-fach MOPS-Puffer |
| | 3,5 μl | Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) |
| | 1,5 μl | EDTA-Lösung (0,1 M; pH 7,5) |
| | 8 μl | Bromphenolblau-Lösung (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) |
| RPMI-1640 | low endotoxin, 2 g/L NaHCO_3 , Kat.Nr. F1415, Biochrom KG, Berlin | |
| Sättigungspuffer für Phenol | 12,3 ml | Glycerin (19 %) |
| | 16,25 ml | Natriumacetat-Lösung 1 M; pH 4,0 (entspr. 0,25 M) |
| | ad 65 ml (Reinstwasser); pH 4,0 | |
| 20 % SDS-Lösung | 200 g | SDS, ad 1 L |
| 20-fach SSC-Lösung | 175 g | NaCl |
| | 88,2 g | $\text{Na}_3\text{Citrat} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ |
| | ad 1 L; pH 7,0 | |

5. EXPERIMENTELLER TEIL

| | | |
|--------------------------------|-----------|----------------------------------|
| TBE-Puffer 0,5-fach | 45 mM | Tris-Base |
| | 45 mM | H ₃ BO ₃ |
| | 1 mM | EDTA |
| | pH 8,0 | |
| TBS-Puffer | 20 mM | Trizma-Puffer (pH 7,4) |
| | 150 mM | NaCl |
| | pH 7,4 | |
| Waschlösung I (Array) | 2-fach | SSC, 1 % SDS |
| Waschlösung II (Array) | 0,1-fach | SSC, 0,5 % SDS |
| Zell-Denaturierungs- Lösung | 31,9 g | Guanidinthiocyanat |
| | 9,9 g | Ammoniumthiocyanat |
| | 10 ml | Natriumacetat-Lösung 1 M; pH 4,0 |
| | ad 100 ml | (Reinstwasser); pH 4,0 |

5.1.3 Lösungsgemische für die Polymerasekettenreaktion

| | | |
|---|-------------------------------------|---|
| dNTP-Mix | 320 µl | dATP (10mM), Kat.Nr. G1667 |
| | 320 µl | dCTP (10mM), Kat.Nr. G1668 |
| | 320 µl | dGTP (10mM), Kat.Nr. G1669 |
| | 320 µl | dTTP (10mM), Kat.Nr. G1670 |
| | | alle von PE Applied Biosystems, Weiterstadt |
| Reverser Trans- kriptions-Mix | 4 µl | MgCl ₂ (25mM), Kat.Nr. A00649 |
| | 2 µl | 10-fach PCR-Puffer, Kat.Nr. J0226 |
| | 1 µl | Oligo dT ₁₆ (50 µM), Kat.Nr. N8008-0128 |
| | | alle von PE Applied Biosystems, Weiterstadt |
| | 8 µl | dNTP-Mix (10 mM) |
| | 1 µl | RNase Inhibitor (20U/µl) |
| 1 µl | MuLV reverse Transkriptase (50U/µl) | |
| Verdünnungs- Puffer (Dilution Buffer) | 2 µl | tRNA (6,5 µg/ml) |
| | 28 µl | H ₂ O / 0,1 % DEPC |
| | 20 µl | MgCl ₂ (25mM), Kat.Nr. A00649, PE Applied Biosystems, Weiterstadt |
| | 10 µl | 10-fach PCR-Puffer, Kat.Nr. J0226, PE Applied Biosystems, Weiterstadt |
| | 40 µl | dNTP-Mix |
| Amplifikations- Mix | 8 µl | MgCl ₂ (25mM), Kat.Nr. A00649, PE Applied Biosystems, Weiterstadt |
| | 8 µl | 10-fach PCR-Puffer, Kat.Nr. J0226, PE Applied Biosystems, Weiterstadt |

| | |
|---------|--|
| 59,5 µl | H ₂ O / 0,1 % DEPC |
| 0,5 µl | AmpliTaQ DNA Polymerase (5 U/µl), Kat.Nr. G1362, PE Applied Biosystems, Weiterstadt |
| 2 µl | 5' Primer |
| 2 µl | 3' Primer |

5.1.4 Zellkulturmaterial und Reagenzgefäße

| | |
|-----------------------|--|
| Deckgläschen | 15 mm Durchmesser, Normalglas, Hecht Assistent, Sondheim |
| Gewinde-Glasgläschen | 35 x 12 mm, Kat.Nr. 3562123, Fa. Schütt Labortechnik, Göttingen |
| Küvetten | Acryl, Kat.Nr. 67.740, Sarstedt, Nümbrecht |
| Objektträger | 76 x 26 mm, Kat.Nr. 2407/1, Hecht Assistent, Sondheim |
| PP-Röhrchen | Durchflußzytometer-Röhrchen, aus Polypropylen, Kat.Nr. 55.526, Sarstedt, Nümbrecht |
| Reaktionsgef. 1,5 ml | Kat.Nr. 0030120086, Eppendorf, Hamburg |
| Reaktionsgef. 0,5 ml | Kat.Nr. 0030121023, Eppendorf, Hamburg |
| Zellkulturflaschen | 250 ml, 75 cm ² Wachstumsoberfläche, Kat.Nr. 658175, Greiner, Frickenhausen |
| Zellkulturpetrischale | 55 mm Durchmesser, 21,5 cm ² Wachstumsoberfläche, zellkulturbehandelt, Nunc, Wiesbaden |
| Zellkulturplatte | 6 Vertiefungen, Kat.Nr. 3506, Costar, Bodenheim |
| Zellkulturplatte | 24 Vertiefungen, Kat.Nr. 3524, Costar, Bodenheim |
| Zentrifugenröhrchen | 50 ml Volumen, Polypropylen, Kat.Nr. 227.261, Fa. Greiner, Frickenhausen |

5.1.5 Antikörper und fluoreszenzmarkierte Antikörper

| | |
|----------------|--|
| Ambozeptor | anti sheep IgG (rabbit), Kat.Nr. ORLC 25, Dade Behring, Liederbach |
| Anti b-Tubulin | Maus, monoklonal, Klon Tub 2.1, IgG1, Kat.Nr. T-4026, Sigma, Taufkirchen |
| Anti BSA | Maus, monoklonal, Klon BSA-33, IgG2a, Kat.Nr. B-2901, Sigma, Taufkirchen |
| Anti Maus-IgG | Ziege, FITC-konjugiert (494/518) ¹ , Kat.Nr. F-0257, Sigma, Taufkirchen |
| Anti Maus-IgG | Ziege, TRITC-konjugiert (544/572) ¹ , Kat.Nr. T-7782, Sigma, Taufkirchen |

¹ Die Zahlen in Klammern geben das Anregungs- und das Emissionsmaximum des Fluoreszenzfarbstoffes in nm an (Anregungsmaximum [nm] / Emissionsmaximum [nm])

5.1.6 Partikeln

| | |
|--|--|
| Fe ₃ O ₄ | ferromagnetische sphärische Eisenoxidpartikeln, Durchmesser 1,78 µm, eigene Herstellung [161] |
| Polystyrollatex 0,9 µm | Fluoresbrite Carboxylate Microspheres YG, fluoreszent (458/540) ¹ , Kat.Nr. 15705, Polysciences, Warrington, USA |
| Polystyrollatex, Durchmesser 1 µm | Fluospheres, carboxyliert, fluoreszent (580/605) ¹ , Kat.Nr. F-8821, Molecular Probes, Leiden, Niederlande |
| Polystyrollatex, Durchmesser 1,5 µm | Polybead Polystyrene Microspheres, nicht fluoreszent, Kat.Nr. 17133, Polysciences, Warrington, USA |
| Polystyrollatex, Durchmesser 1,5 µm | Fluoresbrite Carboxylate Microspheres YG, fluoreszent (458/540) ¹ , Kat.Nr. 09719, Polysciences, Warrington, USA |
| Polystyrollatex, Durchmesser 2,2 µm | Fluoresbrite Carboxylate Microspheres YG, fluoreszent (458/540) ¹ , Kat.Nr. 09847, Polysciences, Warrington, USA |
| S. aureus | Bioparticles <i>Staphylococcus aureus</i> , Stamm Wood, ohne Protein A, Bodipy FL- (505/513) ¹ bzw. FITC- (494/518) ¹ markiert, Kat.Nr. S-2854 bzw. S-2851, Molecular Probes, Leiden, Niederlande |
| E. coli | Bioparticles <i>Escherichia coli</i> , Stamm K-12, FITC- (494/518) ¹ bzw. Texas red- (595/615) ¹ markiert, Kat.Nr. E-2861 bzw. E-2863, Molecular Probes, Leiden, Niederlande |
| EC90 | elementarer Kohlenstoff, Durchmesser 90 nm, spezifische Oberfläche 600 m ² /g, aus eigener Produktion in einem Funkengenerator (Pari, Karlsruhe) [162] bzw. hergestellt von Prof. Niessner, Institut für Wasserchemie, Technische Universität München wie oben, jedoch belegt mit Benzo[a]pyren |
| EC90B | elementarer Kohlenstoff, Durchmesser 30 nm, spezifische Oberfläche 250 - 300 m ² /g, aus eigener Produktion in einem Funkengenerator (Pari, Karlsruhe) [162] |
| EC30 | |
| Printex 90 (P90) | Kohlenstoff, Durchmesser 90 nm, spezifische Oberfläche 300 m ² /g, Gehalt an Metallen 0,02 Vol. %, organische Verunreinigungen 0,7 - 1 Vol. %, Kat.Nr. 25.10680000, Degussa, Frankfurt |
| Dieselmotoren-Ruß | Standard Reference Material 1650, National Institute of Standards and Technology, National Bureau of Standards, Washington, USA http://ois.nist.gov/srmcatalog/certificates/view_cert2.cfm?certificate=1650 |
| TiO ₂ -ultrafein | Durchmesser 20 nm, spezifische Oberfläche 48 m ² /g, Kat.Nr. 23.8595, Degussa, Frankfurt |

TiO₂-fein Durchmesser 200 nm, spezifische Oberfläche 6 m²/g,
 Kat.Nr. T-315, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA

¹ Die Zahlen in Klammern geben das Anregungs- und das Emissionsmaximum des Fluoreszenzfarbstoffes in nm an (Anregungsmaximum [nm] / Emissionsmaximum [nm])

5.1.7 Geräte

| | |
|-----------------------|--|
| Agfa FotoLook 3 | Snapscan Scansoftware, Version 1.2.0.5, Agfa, Köln |
| Agfa Snapscan 1212 | Flachbettscanner, Agfa, Köln |
| Atlas Image 1.01 | cDNA-Array-Auswerteprogramm, Ver. 1.01, Clontech, Heidelberg |
| Axioplan 2 | Fluoreszenzmikroskop, Zeiss, Jena Filtersatz Kat.Nr. 487909-0000, Anregung BP450-490, Emission LP520 Filtersatz Kat.Nr. 487915-9901, Anregung BP 546/12, Emission LP 590 Filtersatz Kat.Nr. 487901-9901, Anregung BP 365/12, Emission LP 397 |
| Biomax MS Film | 20 x 25 cm, Kat.Nr. 1165893, Kodak, Stuttgart |
| Biomax MS Screen | Verstärkerfolie, 20 x 25 cm, Kat.Nr. 8518706, Kodak, Stuttgart |
| Epics XL | Durchflußzytometer, Beckman-Coulter, Krefeld |
| Filmkassette | 20 x 25 cm, Kat.Nr. 1007327, Kodak, Stuttgart |
| Horizon 11.14 | Elektrophoresegerät, horizontal, Life Technologies, Leopoldshafen |
| Horizon 58 | Elektrophoresegerät, horizontal, Life Technologies, Leopoldshafen |
| Hybridisierungsöfen | Modell 7601, GFL, Burgwedel |
| Hybridis.-Flaschen | GFL, Burgwedel |
| Impator „Centripeter“ | Bird and Tole Ltd., Buckinghamshire, UK |
| Lambda 16 | Spektralphotometer, UV/VIS, Perkin-Elmer, München |
| LSM 410 | konfokales Laser Scanning Mikroskop, Zeiss, Jena |
| MP4 Land Camera | s/w Sofortbildkamera, Polaroid, Cambridge, USA |
| Optimas | Bildverarbeitungsprogramm, Version 6.5, Media Cybernetics, Silver Spring, USA |
| Polapan 400 | Polaroidsofortbilder s/w, 9x12 cm, Polaroid, Cambridge, USA |
| Power Supply ST606T | Elektrophorese-Netzgerät, Life Technologies, Leopoldshafen |
| Q-Prep | Erythrozytenlysegerät, Beckman-Coulter, Krefeld |
| Scintillationszähler | Modell TriCarb 2100TR, Canberra-Packard, Dreieich |
| Sonorex RK100H | Ultraschalltauchbad, Bandelin, Berlin |
| STAG | Spinning-Top Aerosolgenerator, Research Engineers Ltd., London, UK |
| Thermomixer 5437 | Schüttel-Heizblock, Eppendorf, Hamburg |
| Touchdown Cycler | PCR-Gerät, Hybaid, Teddington, UK |
| Tri-Carb 2100TR | Scintillationszähler, Canberra-Packard, Dreieich |

| | |
|-------------------|---|
| UVP TS20 | Gelbetrachter, Uni Equipe, Martinsried |
| Zentrifuge 1-15 | Zentrifuge, für Eppendorf-Reaktionsgefäße, Sigma, Osterode |
| Zentrifuge 1 K 15 | Zentrifuge, für Eppendorf-Reaktionsgefäße, kühlbar, Sigma, Osterode |
| Zentrifuge 3 K 15 | Zentrifuge, kühlbar, Sigma, Osterode |
| Zentrifuge 5417C | Tischzentrifuge, Eppendorf, Hamburg |
| Zählkammer | nach Neubauer, Hecht Assistent, Sondheim |

5.2 Zellkultur

5.2.1 Separation von peripheren monozytären Zellen aus dem Blut (PBMC)

Freiwilligen, gesunden Spendern (ca. 25 - 35 Jahre) wurden aus der Armvene 50 ml Blut entnommen und mit 150 I.E. Heparin versetzt. In Zentrifugenröhrchen wurde das Blut mit der gleichen Menge an PBS gemischt und davon jeweils 40 ml auf 20 ml Lymphoprep überschichtet. Die nach der Dichtegradientenzentrifugation (800 g, RT, 20 min, Beschleunigung und Bremse klein) entstandene gelblich-weiße Interphase, die aus Monozyten, Lymphozyten und wenigen Thrombozyten bestand, wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und zur Entfernung des Plasmas und des mitgeführten Lymphopreps erneut bei 800 g für 20 min bei RT zentrifugiert. Nach gründlichem Aufsuspendieren des Zellsediments wurden die Zellen einmal mit PBS, dann mit PBS + 2 % FCS gewaschen (Zentrifugation 400 g, RT, 10 min), in MM6-Medium aufgenommen und vor ihrer weiteren Verwendung in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

5.2.2 Gewinnung von Alveolarmakrophagen vom Menschen und vom Hund

Alveolarmakrophagen wurden durch die sogenannte bronchoalveoläre Lavage (BAL) gewonnen. Gesunden, freiwilligen Spendern und Patienten, die im Rahmen diagnostischer Untersuchungen an der Asklepios Fachklinik für Thoraxchirurgie München-Gauting untersucht wurden, wurden mit Hilfe eines Endoskops ca. 150 bis 200 ml physiologischer Kochsalzlösung (0,9 %) portionsweise in einen Lungenlappen eingebracht und sofort wieder abgesaugt. Die so gewonnene Lavageflüssigkeit enthält ca. 90 % Alveolarmakrophagen. Diese wurden einmal in MM6-Medium gewaschen und vor ihrer weiteren Verwendung in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die BAL bei Beagle-Hunden erfolgte genauso. Zur Zelldifferenzierung wurden 5 x 10⁴ Zellen der Hunde-BAL-Zellsuspension durch Zentrifugation auf einen Objektträger aufgebracht und nach der Differenzialfärbung (DiffQuick,

Dade Behring, Marburg) der Anteil der Makrophagen, Lymphozyten, Neutrophile und Eosinophile Granulozyten am Mikroskop (Zeiss Axioplan 2) ausgezählt. Für die Versuche wurden, wenn nicht anders erwähnt, die Zellen in einer Konzentration von 10^6 pro ml eingesetzt.

Zur Durchführung von Lavagen an gesunden Personen wurde die Genehmigung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München erteilt. Patienten der Asklepios Fachklinik wurden nur lavagiert, wenn dies der behandelnde Arzt für rein diagnostische Zwecke als erforderlich erachtete. Dabei anfallendes, überzähliges Zellmaterial konnte für die hier beschriebenen Untersuchungen genutzt werden.

5.2.3 Gewinnung von Pleuramakrophagen vom Menschen

Pleuramakrophagen wurden bei Patienten, bei denen wegen eines zentralen Lungentumors eine Thorakotomie durchgeführt wurde, gewonnen. Nach Öffnen des Brustkorbes und noch vor Öffnen der Lunge wurde dabei der Pleuraraum mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 %) gespült. Mit der so gewonnenen Lavageflüssigkeit verfährt man wie oben bei den Alveolarmakrophagen. Eine Genehmigung der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München liegt hierfür vor.

5.2.4 J774A.1-Mausmakrophagen

J774A.1 (ATCC Nr. TIB-67) ist eine monozytäre Makrophagen (Tumor-) Zell-Linie aus dem peripheren Blut einer weiblichen BALB/c-Maus. An die Zellkultur angepasst, besitzt die Linie folgende makrophagenähnlichen Eigenschaften: makrophagenartige Morphologie, Phagozytose [163, 164], Oberflächenrezeptoren für Immunglobuline (Fc-Rezeptoren) und für Komplementfaktoren (C3), Sekretion von IL-1 und Lysozym (ATCC, USA cytologische Datenbank).

Die J774A.1-Zellen wuchsen als Monolayer in RPMI-1640-Medium und in 250 ml Greiner-Zellkulturflaschen. Sie wurden zweimal pro Woche mit 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung für 2 - 5 min abgelöst und mit einer Zelldichte von 10^6 Zellen in 20 ml frischem Medium im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ weiterkultiviert. Zur Durchführung der Versuche wurden die Zellen in der Neubauer Zählkammer mit Trypanblau gezählt und, soweit nicht anders erwähnt, in einer Zellkonzentration von 10^6 pro ml in den Versuchen eingesetzt. Verwendet wurden nur Zellen, deren Vitalität (getestet mit Trypanblau) über 90 % lag.

5.2.5 Mono Mac 6 (MM6)

MM6 ist ein humaner Zellklon, der aus einem Patienten mit monoblastischer Leukämie isoliert wurde [165] und Eigenschaften reifer Blutmonozyten besitzen.

MM6-Zellen wuchsen in Suspension in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen und wurden zweimal pro Woche subkultiviert. Dabei wurden jeweils 8×10^6 Zellen in 48 ml frisches MM6-Medium suspendiert und pro Vertiefung 2 ml der Zellsuspension pipettiert. Inkubiert wurden die Zellen bei 37°C und 5 % CO_2 im Brutschrank. Zur Durchführung der Versuche wurden die Zellen in der Neubauer-Zählkammer mit Trypanblau gezählt und, soweit nicht anders erwähnt, in einer Zellkonzentration von 10^6 pro ml in den Versuchen eingesetzt. Verwendet wurden nur Zellen, deren Vitalität (getestet mit Trypanblau) über 90 % lag.

5.2.6 Instillationsexperimente bei WKY-Ratten

Den Ratten wurden in einem Volumen von 200 μl A. dest. LPS (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht) bzw. 320 μg Partikeln durch die Luftröhre in die Lunge instilliert. Die Partikeln wurden dreimal hintereinander dreimal intensiv gemischt und 1 min im Ultraschallbad behandelt. Nach 24 h wurden die Lungen der Tiere lavagiert und die gewonnenen Alveolarmakrophagen nach einem 40-minütigen Transport bis zur weiteren Verwendung ca. 1 Stunde im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

5.2.7 Vitalitätstest mit Trypanblau

0,5 g Trypanblau wurden in 100 ml Kochsalzlösung (0,9 %) gelöst und vor Gebrauch sterilfiltriert. 100 μl Zellsuspension wurden mit 100 μl Trypanblau-Lösung vermischt und nach 2 min in einer Neubauer-Zählkammer im Durchlichtmikroskop (Zeiss Axioplan 2) ausgezählt. Der Farbstoff drang nur in Zellen ein, deren Membranintegrität gestört war, die also geschädigt oder tot waren. Die Vitalität der Zellen wurde wie folgt berechnet: Vitalität [%] = $\frac{\text{Zahl der lebenden Zellen}}{\text{Zahl der lebenden Zellen} + \text{Zahl der geschädigten Zellen}} \times 100$.

5.3 Zytoskelettmarkierung

5.3.1 Kultivierung von J774A.1 auf Deckgläschen

Die Deckgläschen wurden 30 min in Methanol gespült, anschließend dreimal mit steriler PBS gewaschen und nebeneinander in eine Zellkulturpetrischale ausgelegt. Nach Zugabe von 8 ml J774-Medium wurden 10^6 Zellen angeimpft und für zwei bis drei Tage im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert, bis sich die Zellen bis nahe der Konfluenz vermehrt hatten.

5.3.2 Herstellung frischer Formaldehydlösung

In einem Becherglas wurde 2 g Paraformaldehyd in 10 ml A. deion. unter ständigem Rühren in einem Wasserbad 30 min auf 70 °C erhitzt. Danach wurden 2 - 4 Tropfen 1 M NaOH Lösung unter weiterem Rühren zugegeben, bis die Formaldehyd-Lösung klar wurde. Diese 20 %ige Stammlösung wurde nach Abkühlen sofort gebraucht.

5.3.3 Markierung von Aktin (Mikrofilamente)

Die auf Deckgläschen kultivierten J774A.1-Mausmakrophagen wurden in der Kulturpetrischale zweimal mit vorgewärmter PBS gewaschen und in CBS-Puffer, der mit 1 µg/ml Phalloidin und 0,5 % Triton X-100 supplementiert war, für 60 sec inkubiert. Dabei machte das Triton X-100 die Zytoplasmamembran der Zellen permeabel, während das Phalloidin das Aktin-Zytoskelett stabilisierte. Die Zellen wurden danach in 4 % Formaldehyd fixiert (Zugabe von 20 % frischer Stammlösung zum CBS-Puffer bis zur gewünschten Endkonzentration), dann dreimal je 5 min mit 0,1 % Triton X-100 supplementiertem TBS-Puffer (Waschpuffer) gewaschen. Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen für 10 min in Abdil-Puffer inkubiert und danach mit Rhodamin-Phalloidin (Stammlösung 1 : 750 verdünnt in Abdil-Puffer) für 20 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer markiert. Nach viermaligem Waschen für jeweils 5 min in Waschpuffer wurden die Zellen zum Anfärben der Zellkerne 10 min bei 37 °C mit DAPI (Endkonzentration 1 µg/ml) inkubiert. Die Zellen wurden viermal für je 5 min in Waschpuffer und zweimal für je 5 min in TBS gewaschen und mit Prolong Antifade (Molecular Probes, Leiden, NL) auf Objektträger montiert.

Die Präparate wurden in einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Jena) und einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM 410, Zeiss, Jena) untersucht und auf Film (Ektachrome EPY 64T, Kodak, Stuttgart) bzw. als tif-Bilddatei dokumentiert.

5.3.4 Markierung von Tubulin (Mikrotubuli)

Die auf Deckgläschen kultivierten J774A.1-Mausmakrophagen wurden zweimal mit vorgewärmter PBS gewaschen und in mit 0,5 % Triton X-100 und 160 nM Paclitaxel supplementiertem BB80-Puffer für 30 sek inkubiert. Dieser Schritt dient dem durchlässig machen der Zellmembran bei gleichzeitiger Stabilisierung der Mikrotubuli durch das Paclitaxel. Die Zellen wurden für 10 min in 0,5 % Glutaraldehyd fixiert (Zugabe von 50 % Stammlösung in den BB80-Puffer bis zur gewünschten Endkonzentration) und einmal für 5 min in PBS gewaschen. Um nicht vernetztes Glutaraldehyd aus den Zellen zu entfernen, wurden die Zellen zweimal für jeweils 5 min mit frisch hergestellter 0,1 %iger NaBH₄-Lösung behandelt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS für je 5 min und dreimaligem Waschen mit TBS + 0,1 % Triton X-100 (Waschpuffer) für je 5 min wurden die Zellen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 10 min in Abdil-Puffer inkubiert. Um die Mikrotubuli zu markieren, wurden die Zellen zuerst 30 min mit dem primären Antikörper Anti-β-Tubulin, der 1 : 200 mit Abdil-

Puffer verdünnt wurde, in einer feuchten Kammer bei 37 °C behandelt. Nach weiterem viermaligen Waschen (Waschpuffer, je 5 min) wurden mit dem sekundären, Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörper Anti Maus-IgG in einer Verdünnung von 1 : 20 (FITC-konjugiert) bzw. 1 : 300 (TRITC-konjugiert) in Abdil-Puffer der primäre Antikörper und somit indirekt die Mikrotubuli markiert. Nach viermaligem Waschen mit Waschpuffer (je 5 min), wurde wie unter 5.3.3 mit DAPI die Kernfärbung durchgeführt, gewaschen und die Zellen mit Prolong Antifade auf Objektträger montiert.

Die Präparate wurden in einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Jena) und einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM 410, Zeiss, Jena) untersucht und auf Film (Ektachrome EPY 64T, Kodak, Stuttgart) bzw. als tif-Bilddatei dokumentiert.

5.3.5 Doppelmarkierung von Aktin (Mikrofilamente) und Tubulin (Mikrotubuli)

Zur Markierung der Mikrotubuli wurden die auf den Deckgläschen kultivierten Zellen wie unter 5.3.4 beschrieben in BB80-Puffer permeabel gemacht (zusätzlich supplementiert mit 1µg/ml Phalloidin), fixiert, mit NaBH₄ behandelt und mit dem primären und sekundären Antikörper markiert. Nach viermaligem Waschen mit Waschpuffer für jeweils 5 min wurden die Mikrofilamente wie unter 5.3.3 beschrieben mit Rhodamin-Phalloidin markiert, mit DAPI der Kern gefärbt und nach den angegebenen Waschschritten die Zellen mit dem Deckglas auf dem Objektträger montiert.

Die Präparate wurden in einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Jena) und einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM 410, Zeiss, Jena) untersucht und auf Film (Ektachrome EPY 64T, Kodak, Stuttgart) bzw. als tif-Bilddatei dokumentiert.

5.4 Partikeln

5.4.1 Bakterien

Zur Phagozytose wurden J774A.1-Mausmakrophagen abgetötete und fluoreszenz-markierte Bakterien angeboten (*Staphylococcus aureus*, FITC- oder Bodipy FL-markiert bzw. *Escherichia coli*, FITC- oder Bodipy FL-markiert). Die Oberfläche der Bakterien war entscheidend über die Art der Phagozytose. Unbehandelte Bakterien wurden hauptsächlich über Scavenger-Rezeptoren phagozytiert, während Antikörper-opsonierte Bakterien hauptsächlich über den Fc-Rezeptor aufgenommen werden.

Zur Antikörper-Opsonierung der Bakterien wurden vorgefertigte Opsonierungs-Reagenzien (gereinigte polyklonale Anti *S. aureus* bzw. Anti *E. coli* Antikörper aus Kaninchen) von Molecular Probes benutzt und die Bakterien nach Anleitung des Herstellers damit opsoniert.

In den Versuchen wurden, wenn nicht anders erwähnt, auf eine Zelle vier Bakterien eingesetzt.

5.4.2 Fluoreszenzmarkierung und Opsonierung von Schafererythrozyten

5 ml Hammelblut wurden dreimal in 10 ml LPS-freiem PBS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (8 min, 800 g, RT). Nach Resuspendieren des Sediments in 5 ml PBS, Überschichten der Blutzellen über 3,5 ml Polymorphprep und Zentrifugation (25 min, 475 g, RT) wurden die sedimentierten, nun von anderen Zellen freien Erythrozyten mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und zweimal mit PBS-Puffer gewaschen (8 min, 800 g, RT). In 1 ml Endvolumen wurden 2×10^9 Erythrozyten mit 40 μ l DiI-Farbstoff (30 min bei 50 °C vorinkubiert) zwei Stunden bei 37 °C und unter ständiger Bewegung (Heizblock, Schüttler-Stufe 10, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Die Erythrozyten wurden mit PBS gewaschen, bis der Überstand klar blieb (min. 3 Waschgänge, Zentrifugation 8 min, 800 g, 4 °C) und der Färbeerfolg am Durchflußzytometer (Epics XL, Beckman-Coulter, Krefeld) überprüft.

Zur Opsonierung mit anti sheep IgG (rabbit) wurden 10^9 Erythrozyten in einem Volumen von 500 μ l mit 1 μ l Ambozeptor (1 : 500 Endverdünung) eine Stunde bei 37°C unter ständiger Bewegung (Eppendorf Heizblock, Schüttler-Stufe 7) inkubiert, danach zweimal mit PBS gewaschen (8 min, 800 g, 4 °C) und in einem Volumen von 1 ml PBS aufgenommen. Eine zweite Kontrolle der Fluoreszenzmarkierung erfolgte am Durchflußzytometer und unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Filtersatz Kat.Nr. 487915-9901, Zeiss, Jena).

5.4.3 Polystyrolatex-Partikeln

Die fluoreszenten Polystyrolatex-Partikeln wurden für Phagozytosestudien eingesetzt. Da sie nicht mit Antikörpern opsoniert waren, wurden sie von den Zellen hauptsächlich über den Scavenger-Rezeptor aufgenommen. Um eine Aufnahme über den Fc-Rezeptor zu erreichen, wurden nicht fluoreszente Polystyrolatex-Partikeln mit fluoreszente FITC-markierten Rinderserumalbumin (BSA) beschichtet und anschließend mit Anti-BSA-Antikörpern opsoniert. Dazu wurden 100 μ l der Polystyrolatex-Partikelsuspension (entspricht etwa $1,5 \times 10^9$ Partikeln) dreimal in TBE-Puffer (pH 8,0) gewaschen (Zentrifugation bei 10.000 g, 2 min, RT) und in 1 ml TBE-Puffer, in dem 2,5 mg FITC-markiertes BSA gelöst war, über Nacht unter ständiger Bewegung bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in TBE, das mit nichtfluoreszente BSA (10 mg/ml) supplementiert war, wurden die Partikeln nach dem Zentrifugieren (10.000 g, 2 min) in PBS-Puffer, in dem 10 mg/ml BSA, 0,1 % NaN_3 und 5 % Glycerin gelöst wurden, aufgenommen [166].

Zur Antikörper-Opsonierung wurden 100 μ l der BSA-beschichteten Polystyrolatex-Partikelsuspension (ca. $1,5 \times 10^9$ Partikeln) zweimal in PBS-Puffer gewaschen, der Anti-BSA-Antikörper in einer Verdünnung von 1 : 100 zugesetzt und 45 min bei RT und ständiger Bewegung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS und zweimaligem Waschen in PBS mit 10 mg/ml nichtfluoreszente BSA (Zentrifugation jeweils 10.000 g, 2 min, RT) wurden die opsonierten Polystyrolatex-Partikeln in PBS-Puffer, der mit 10 mg/ml BSA, 0,1 % NaN_3 und 5 % Glycerin supplementiert war, aufgenommen.

In den Versuchen wurden, wenn nicht anders erwähnt, auf eine Zelle vier Polystyrolatex-Partikeln eingesetzt.

5.4.4 Komplement-Opsonierung von Zymosan

Zur Komplement-Opsonierung von Zymosan wurden 25 mg Zymosan A in 10 ml steriler Kochsalzlösung (0,9 %) 30 min bei 90 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlen wurde bei 1.600 g, 10 min bei RT zentrifugiert, mit steriler Kochsalzlösung gewaschen und nach erneutem Zentrifugieren mit einer Konzentration von 2,5 mg/ml in Kochsalzlösung (0,9 %) aufgenommen. Die Zymosan-Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Serum vermischt und 60 min bei 37 °C inkubiert. Das Serum war nicht hitzeinaktiviert und stammte aus der gleichen Spezies, aus der die Phagozyten gewonnen wurden. Das opsonierte Zymosan wurde mit steriler Kochsalzlösung gewaschen und in steriler PBS aufgenommen.

5.5 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Das Laser-Scanning-Mikroskop erlaubt eine dreidimensionale Darstellung von fluoreszenzmarkierten Objekten. Dazu wird der in der Fokusebene liegende Fluoreszenzfarbstoff durch einen rasterartig über das Objekt geführten Laserstrahl (X-Y-Scan) zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt und das emittierte Licht von einem Photodetektor aufgenommen. Lochblenden sorgen dafür, daß Fluoreszenzlicht aus über- oder unterhalb des Fokus liegenden Schichten ausgeblendet werden. Diese Scans wurden in Schichtdicken von 0,5 µm durch das gesamte Objekt geführt (Z-Scan) und die Einzelbilder im Computer zu einem dreidimensionalen Bild zusammengefügt.

Vorteil dieser aufwendigen Methode war es, räumliche Strukturen, wie das Zytoskelett, in seiner komplexen Anordnung in der Zelle sichtbar machen zu können. So liess sich bei der Untersuchung der Phagozytose von Zellen abschätzen, ob ein fluoreszentes Partikeln (z.B. ein Bakterium) aussen an der Zelle anhaftete oder bereits phagozytiert worden war, oder es liess sich erkennen, mit welchen Strukturen des Zytoskeletts das Phagosom verknüpft war.

Die Proben wurden je nach verwendetem Fluoreszenzfarbstoff mit einem Argon-Laser (488 nm), Argon-UV-Laser (351/364 nm) oder Neon-Helium-Laser (543 nm bzw. 633 nm) zur Fluoreszenz angeregt und über einen Photodetektor in ein 512 x 512 Pixel großes Bild umgesetzt, das als tif-Datei gespeichert werden konnte. Bei Mehrfachmarkierungen des Objektes mit Fluoreszenzfarbstoffen wurde je Farbe ein Bild aufgenommen und dies später je einem Farbkanal eines gemeinsamen RGB-tif-Bildes zugeordnet. Die Zellen wurden in 0,5-µm-Schritten durchgescannt und aufgenommen. Gezeigt werden ausgewählte Schnitte.

5.6 Durchflußzytometrie

Zellen, die mit fluoreszierendem Material beladen sind, werden in einem Flüssigkeitsstrahl an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Der Flüssigkeitsstrahl, bestehend aus einem Proben- und einem Hüllstrom, wird durch eine feine Düse gebündelt. Der Hüllstrom ermöglicht eine exakte Ausrichtung des Strahles (hydrodynamische Fokussierung), damit die im Probenstrom befindlichen Zellen einzeln und zuverlässig vom Laser bestrahlt werden können.

Im Epics XL-Durchflusszytometer (Beckman-Coulter, Krefeld) wurden die Zellen mit einem Argonlaser angeregt (Lichtemission bei 488 nm) und die Emission in den Wellenlängenbereichen von 505 bis 635 nm gemessen. Dies erlaubte den Einsatz folgender Fluoreszenzfarbstoffe: 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat - DCFH-DA (510/535)^{1,2}, Fluorescein-Isothiocyanat - FITC (495/525)¹ und Phycoerythrin - PE (488/575)¹. Neben der Fluoreszenz wurde die durch die Zelle erzeugte Lichtstreuung erfasst. Die Vorwärtsstreuung (Forward Scatter - FSC) war ein Maß für die Größe der Zelle, die Seitwärtsstreuung (Side Scatter - SSC) ein Maß für deren intrazelluläre Granularität.

Die Fluoreszenz- und Streusignale werden von Photoverstärkern aufgenommen und elektronisch weiterverarbeitet. Diese Impulse werden je nach Intensität und Anzahl üblicherweise zwei zweidimensionalen Diagrammen zugeordnet: dem Lichtstreudiagramm und dem Fluoreszenzdiagramm. Im Lichtstreudiagramm war auf der Abszisse der FSC aufgetragen, auf der Ordinate der SSC. Aus den entstandenen Punktwolken konnte man die untersuchte Zellpopulation ableiten. Wurden nicht einheitliche Zell-Linien untersucht, sondern Mischpopulationen wie z.B. PBMC-Isolate, konnten Monozyten deutlich von Lymphozyten unterscheiden werden, da erstere größer und stärker granuliert waren. Tote Zellen und Zelltrümmer wurden aufgrund ihrer geringeren Vorwärtsstreuung erkannt und konnten durch das Setzen sogenannter Fenster („gates“) ausgeschlossen werden.

Im Fluoreszenzdiagramm war auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität des eingesetzten Farbstoffes und auf der Ordinate die Anzahl der Fluoreszenzereignisse eingetragen. Durch Setzen entsprechender Fenster konnte das Fluoreszenzprofil einer bestimmten Population bestimmt werden.

¹ Die Zahlen in Klammern geben das Anregungs- und das Emissionsmaximum des Fluoreszenzfarbstoffes in nm an (Anregungsmaximum [nm] / Emissionsmaximum [nm]).

² Fluoreszent ist nur das oxidierte Derivat 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF), nicht aber DCFH-DA (Kapitel 5.8).

5.7 Phagozytosemessung

5.7.1 Phagozytosemessung mit dem Fluoreszenzmikroskop und dem CLSM

J774A.1-Mausmakrophagen wurden wie oben beschrieben auf Deckgläschen kultiviert. Um die Abhängigkeit der Phagozytose von der Integrität des Zytoskeletts (Mikrofilamente und Mikrotubuli) zu zeigen, wurden die Zellen mit 1 (oder 5) μM Cytochalasin D (zerstört Mikrofilamente) bzw. mit 10 μM Colchicin (beeinflusst Mikrotubuli) für 30 min im Brutschrank (37 °C, 5 % CO_2) vorinkubiert. Den Zellen wurden 4×10^7 fluoreszenzmarkierte Bakterien (*S. aureus*, FITC-markiert) in 8 ml Medium zur Phagozytose angeboten. Nach 2 Stunden im Brutschrank wurden die Zellen wie oben beschrieben fixiert und die Mikrofilamente bzw. Mikrotubuli fluoreszenzmarkiert.

Zur Auswertung wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Jena) bzw. im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 410, Zeiss, Jena) untersucht und auf Film (Ektachrome EPY 64T, Kodak, Stuttgart) bzw. als tif-Bilddatei dokumentiert. Die Bilddateien wurden zur weiteren Analyse in das Bildverarbeitungsprogramm Optimas (Version 6.5, Media Cybernetics, Silver Spring, USA) eingelesen und über die Erfassung der Fluoreszenzintensität der intrazellulären Bakterien die Phagozytosekapazität der Zellen ermittelt.

5.7.2 Phagozytosemessung mit Hilfe des Durchflußzytometers

J774A.1, MM6, primäre PBMC oder primäre Alveolarmakrophagen vom Hund (Beagle) und der WKY-Ratte wurden in einer Zellkonzentration von 10^6 Zellen in 1 ml Medium in Polypropylen-Röhrchen aufgenommen und ca. 30 min im Brutschrank ($37\text{ }^\circ\text{C}$, 5 % CO_2) inkubiert. Zu Untersuchungen über den Einfluß des Zytoskeletts auf die Phagozytose wurde $1\text{ }\mu\text{M}$ Cytochalasin D (soweit nicht anders angegeben) oder $10\text{ }\mu\text{M}$ Colchicin (soweit nicht anders angegeben) zugegeben. Um die Rolle der Oberflächenrezeptoren der Zelle bei der Phagozytose zu erfassen, wurde $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ Polyinosinsäure oder $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ Dextransulfat (beide Substanzen blockieren den Scavenger-Rezeptor) zugegeben. Die Zellen wurden 20 min im Brutschrank bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 inkubiert.

Als Phagozytose-Testpartikeln wurden den Zellen im Verhältnis 1: 4 Polystyrollatex-Partikeln, Bakterien oder Erythrozyten angeboten und weitere 30 min inkubiert. Nach Stoppen der Phagozytose durch Kühlen der Zellen auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ wurde die Fluoreszenz der extrazellulär verbliebenen Polystyrollatex-Partikeln und Bakterien durch Zugabe von Trypanblau (Endkonzentration 0,5 %) überdeckt, so dass nur noch die phagozytierten, intrazellulären Partikeln fluoreszierten. Nicht phagozytierte Erythrozyten wurden in einem Coulter Q-Prep Erythrozyten-Lysegerät nach dem Protokoll des Herstellers lysiert und vor der Messung im Durchflußzytometer (Epics XL, Beckman-Coulter, Krefeld) einmal in PBS + 2 % FCS gewaschen.

5.8 Messung des Oxidativen Bursts im Durchflußzytometer

Die durchflußzytometrische Messung des Oxidativen Bursts bei Leukozyten beruht auf einer Methode von Bass et al. [167], bei der die von den Zellen freigesetzten Sauerstoffradikale (O_2^- etc.) durch den Fluoreszenzfarbstoff Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFH-DA) detektiert wurden.

Bei der Inkubation der Zellen mit dem unpolaren DCFH-DA diffundierte der Farbstoff in die Zelle und wurde dort durch im Zytoplasma befindliche Esterasen zum polaren 2',7'-Dichlorofluorescein deacetyliert und dadurch in der Zelle gefangen (Ionenfallenprinzip). Das nunmehr intrazelluläre 2',7'-Dichlorofluorescein, ein nichtfluoreszentes Fluorescein-Analog, wurde durch die freigesetzten Sauerstoffradikale zum fluoreszenten 2',7'-Dichlorofluorescein oxidiert und dessen Fluoreszenz im Durchflußzytometer gemessen (Abb. 5.1). Durch diese

Methode wird also die nach intrazellulär und nicht die von der Zelle nach extrazellulär abgegebenen reaktiven Sauerstoffspezies gemessen.

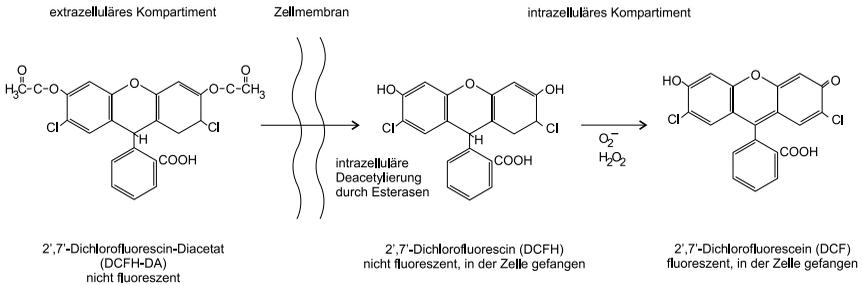


Abb. 5.1 Mechanismus des Nachweises von reaktiven Sauerstoffspezies durch DCFH-DA.

Zur Durchführung der Versuche wurden 10^6 Zellen in 1 ml Medium in Polypropylen-Röhrchen suspendiert und bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert. Um den Einfluss der Integrität des Zytoskeletts beim Oxidativen Burst zu bestimmen, wurden bestimmte Probenansätze mit $1\mu M$ Cytochalasin D (schädigt Mikrofilamente) bzw. $10\mu M$ Colchicin (schädigt Mikrotubuli) 15 min vorinkubiert, $10\mu M$ DCFH-DA hinzugefügt und weitere 15 min inkubiert. Der Versuch wurde durch Zugabe von LPS ($1\mu g/ml$) oder PMA (100 ng/ml) als Positivkontrollen bzw. durch Zugabe der Testsubstanzen gestartet. Als Testsubstanzen wurden eingesetzt: Schaferythrozyten ($4 \times 10^6 / ml$), Bakterien ($4 \times 10^6 / ml$), Polystyrollatex-Partikeln ($4 \times 10^6 / ml$) und die Partikelsysteme ufEC90, ufP90, ufTiO₂ und fTiO₂. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Zellen nach 30-minütiger Inkubation im Brutschrank im Durchflußzytometer untersucht.

5.9 Zytomagnetometrie

Färbemethoden für Immunfluoreszenz und konfokale Laserscanningmikroskopie eignen sich dazu, die Komponenten des Zytoskeletts (Mikrofilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente) sichtbar zu machen. Diese Methoden erlauben jedoch nur Momentaufnahmen des Zytoskeletts. Um die dynamischen Eigenschaften des Zytoskeletts und seiner Komponenten bei wichtigen zellulären Funktionen von Makrophagen, wie z.B. Migration, Phagozytose und den Oxidativen Burst zu verstehen, müssen andere Untersuchungstechniken angewandt werden.

Mit der Zytomagnetometrie wurde eine Methode entwickelt, bei der phagozytierte ferromagnetische Partikeln (ca. 1 - 2 μm Durchmesser) innerhalb der Zelle mit nichtinvasiven Methoden über das Anlegen eines äusseren Magnetfeldes gedreht werden können [117, 168]. Durch diese Drehung wird eine Dreh- bzw. Scherkraft auf die umgebenden zellulären Strukturen übertragen, die man messen und daraus die mechanischen Eigenschaften der beteiligten Strukturen ableiten kann [169, 170].

5.9.1 Herstellung und Charakterisierung der sphärischen ferromagnetischen Fe_3O_4 -Partikeln

Zur Herstellung der kugelförmigen ferromagnetischen Eisenpartikeln wurde ein Spinning-Top-Aerosolgenerator eingesetzt. Sein Aufbau und seine Funktionsweise sind in Möller et al. [161] beschrieben. In Kürze sei die Herstellung dieser Partikeln umrissen: Eine nicht-magnetische kolloidale Fe_2O_3 (Hämatit)-Lösung wurde unter N_2 Atmosphäre in einem modifizierten Spinning-Top-Aerosolgenerator (STAG, Research Engineers Ltd., London, UK) in monodisperse Tropfen versprüht (Standardabweichung $\sigma_g < 1,1$). Nach Trocknung des Lösungsmittels (A. dest.) bildeten sich solide, kugelförmige Fe_2O_3 -Partikeln, die über einen Impaktor (Centripeter, Bird and Tole Ltd., Buckinghamshire, UK) um den Faktor 20 konzentriert wurden. Nach Zugabe von 2 Vol.% H_2 wurde das Aerosol bei 800 °C durch einen Rohrofen geleitet und die Partikeln dabei zu Fe_3O_4 (Magnetit) reduziert. Die in den Experimenten eingesetzten Partikeln besaßen eine Dichte von 4,9 g/cm^3 und einen Durchmesser von 1,78 μm . Die Partikeln zeigen nach Kreyling et al. [171] eine geringe Löslichkeit: 84 % verbleibendes ferromagnetisches Material nach 155 Tagen in physiologischer Kochsalzlösung.

5.9.2 Vorbehandlung der Zellen

2×10^5 J774A.1-Mausmakrophagen bzw. primäre Hundealveolarmakrophagen (BAL vom Beagle-Hund) wurden mit 8×10^5 Fe_3O_4 -Partikeln in 400 μl RMPI 1640 Medium (5 % FCS) vermischt und in Gewinde-Gläschen (35 x 12 mm, Fa. Schütt Labortechnik, Göttingen) über Nacht inkubiert. Nach dieser Zeit haften die Zellen fest auf dem Boden des Gläschens und haben die Fe_3O_4 -Partikeln phagozytiert. Am nächsten Morgen wurde das Medium und damit auch nichtphagozytierte Partikeln abgezogen und 200 μl frisches Medium aufgefüllt. Neben den Kontrollen (Zellen ohne weitere Behandlung) wurden den Zellen in verschiedenen Ansätzen folgende Testsubstanzen verabreicht: uFEC90, uFEC90B, uFP90, f und uFTiO₂. Inkubiert wurde mit 10, 32, 100 und 320 μg Teilchen je ml Medium bzw. Mio Zellen für 4,5 und 24 h. Die jeweilige Kombination der genannten Parameter sind den einzelnen Experimenten zu entnehmen. Es wurden mindestens 5 Parallelansätze gemessen.

5.9.3 Zytomagnetometer

Eine Skizze des Zytomagnetometers und des Meßprinzips zeigt Abb. 5.2 und 5.3. Zu Beginn der Messung werden die Fe_3O_4 -Partikeln in den Zellen durch einen kurzen Puls (10 μs) eines homogenen, 0,1 Tesla starken Magnetfeldes ausgerichtet [30, 117]. Das schwache, remanente magnetische Feld, das nun von den zellassozierten Partikeln ausgeht (ca. 1 nTesla), wird von vier Sensoren (Fluxgate Detektoren, Förster Instruments Inc., Corapolis, USA), die sich auf Probenhöhe befinden, gemessen. Die Sensoren befinden sich in einer speziellen

Anordnung (Gradiometer 2. Ordnung), die die Messung schwacher Magnetfelder gegenüber dem in der Umgebung herrschenden Magnetfeld von ca. 10^4 nTesla ermöglicht (Abb. 5.3).

Das Probengläschen und damit die Zellen werden während der Messung mit 6 Umdrehungen pro Minute um ihre Längsachse gedreht. Diese Anordnung dient nochmals der Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses, indem nur Signale verstärkt werden, die synchron mit der Drehung der Proben vom Sensor detektiert werden (Lock-in-Technik). Das Zytomagnetometer ist nach außen hin durch drei ferromagnetische Schichten (Mumetall) abgeschirmt.

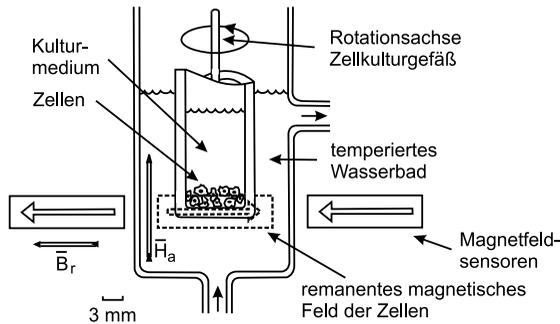


Abb. 5.2 Zytomagnetometer zur Messung des remanenten magnetischen Feldes in Zellen. B_r beschreibt die Komponente des remanenten magnetischen Feldes der Zellprobe entlang der Sensorausrichtung während der Drehung des Probengefäßes. H_a gibt die Lage des drehenden magnetischen Feldes an, das senkrecht zu den Sensoren und dem Pulsfeld liegt. Nach [30].

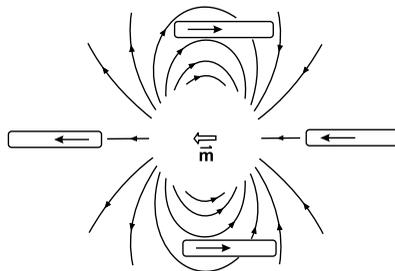


Abb. 5.3 Ansicht auf das Zytomagnetometer von oben. Die mit Magnetpartikel beladenen Zellen sind durch ihr magnetisches Moment m repräsentiert, die ein durch die Linien symbolisiertes remanentes magnetisches Feld erzeugen. Die Zellen werden längs einer senkrecht zur Papierebene stehenden Achse gedreht, was ein alternierendes Signal in den vier Sensoren (Rechtecke) erzeugt. Nach [30].

5.9.4 Meßprinzip

Die Magnetisierung der Partikeln kann auf zwei Arten geschehen:

1. Durch einen 10 μs kurzen Puls eines homogenen 0,1 Tesla starken Magnetfeldes (Abb. 5.4). Nach diesem primären Magnetisierungsprozeß [172] werden in den Fe_3O_4 -Partikeln magnetische Dipole gebildet und parallel zu dem äußeren Magnetfeld ausgerichtet. Nach

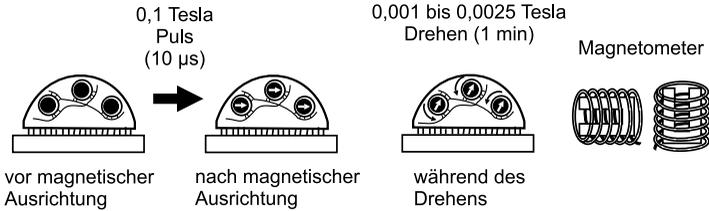


Abb. 5.4 Schematische Ansicht der auf Plastik adhärennten Makrophagen. Die weißen Pfeile innerhalb der in Phagosome verpackten ferromagnetischen Fe_3O_4 -Teilchen repräsentieren ihre magnetischen Dipole und deren Ausrichtung. Erklärung im Text. Nach [173].

Abschalten des äußeren Magnetfeldes kann weiterhin ein nunmehr schwaches remanentes Magnetfeld, das von den zellassoziierten Fe_3O_4 -Partikeln ausgeht, gemessen werden. Führt man die Messung kontinuierlich fort, zeigt sich ein Abbau dieses remanenten Magnetfeldes (Abb. 5.5). Dieser Vorgang wird hier als Relaxation bezeichnet und spiegelt die stochastischen Desorientierung der Dipole wider, die mit Bewegungsvorgängen am und Umbauvorgängen im Zytoskelett (Phagosomentransport bzw. Reorganisation) zusammenhängt. Je höher der Wert der Relaxation ist, desto langsamer ist der Phagosomentransport. Die Relaxation wird durch die relative Abnahme der Ausrichtung der Dipole nach 5 min ($b_5 = B(t = 5 \text{ min})$) charakterisiert.

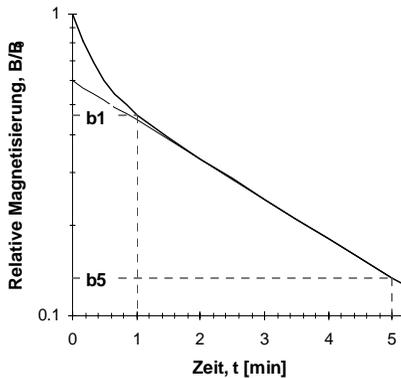


Abb. 5.5 Abnahme des remanenten magnetischen Feldes (als Relaxation bezeichnet), nachdem die Magnetpartikel in einem starken magnetischen Feld ausgerichtet wurden. Bestimmt wurde die Relaxation nach 5 min (b_5). Nach [31].

2. 20 sec nach dem primären, starken Magnetfeldpuls wird ein sekundäres Magnetfeld für die Dauer von 10 sec angelegt, das viel schwächer ist (0,001 - 0,0025 Tesla) und senkrecht (parallel zur Achse, in der die Zellen gedreht werden) zum ersten Magnetfeldpuls steht (Abb. 5.6). Das sekundäre Magnetfeld ändert nicht die Magnetisierung der Partikeldipole, sondern induziert eine Scherkraft (Schubspannung). Dadurch werden die Partikel mitsamt den

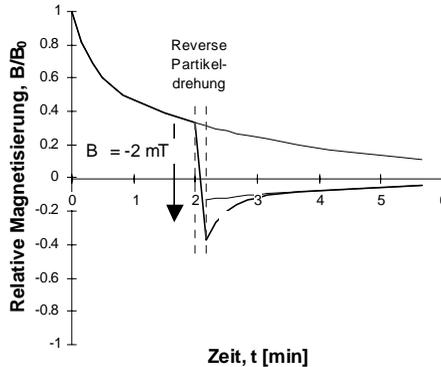


Abb. 5.6 Nach zwei Minuten Relaxation folgt das Drehen der Partikel in einem schwachen, um 180° gedrehten Magnetfeld (Abknicken der Kurve in der gestrichelten Zone. Nach dem Drehen drehen sich die Partikel wieder elastisch zurück. Nach [31].

Phagosomen gedreht und entsprechend ändert sich der Betrag des von den Partikeln detektierten remanenten magnetischen Feldes. Die Drehgeschwindigkeit (Scherungsrate) der Partikeln wiederum hängt bei gegebener Stärke des drehenden Magnetfeldes von der Viskosität [117] und Elastizität der Strukturen ab, die die Partikeln umgeben (Zytoskelett, Zytoplasma). Die Steifigkeit des Zytoskeletts wurde aus der mittleren Scherkraft, dividiert durch den Betrag der Scherung, ermittelt. Je höher der Wert der Steifigkeit ist, desto geringer ist die Zytoskelettdynamik (ständige Umbauprozesse des Zytoskeletts) und damit auch die Motilität der Zelle.

Das Magnetfeld, mit dem die Scherkraft auf die Phagosomen ausgeübt wird, ist 0,001 Tesla („low stress“) bzw. 0,0025 Tesla („high stress“) stark und erzeugt eine Scherkraft von 3,10 bzw. 7,75 Pa.

Die Ergebnisse der Relaxations- bzw. Steifigkeitsmessungen sind in den Graphiken 2.30 bis 2.35 und 2.37 bis 2.42 (Kapitel 2.4) folgendermaßen dargestellt:

Auf der Abszisse sind die verschiedenen Partikelarten aufgetragen, mit denen die Zellen inkubiert wurden. Auf der Ordinate sind die Mittelwerte der Relaxation bzw. die der Steifigkeit zusammen mit den Standardabweichungen (S.D.) dargestellt, wobei die Ergebnisse von mindestens vier Proben mit Partikeln auf die parallel mitgeführten, unbehandelten Proben (Kontrollen) normiert wurden. Die Fehlerbalken der mit Partikeln behandelten Proben be-

rücksichtigen aufgrund des Fehlerfortpflanzungsgesetzes den Fehlerbalken der Kontrollproben und der Partikelproben (für die normierte Größe $a = b / c$ gilt: $\Delta a = \sqrt{\Delta b^2 + \Delta c^2}$).

Für die Ermittlung der Signifikanz wurden die Meßwerte der mit Partikeln behandelten Proben im Vergleich zu den Kontrollproben verwendet (siehe Kapitel 5.12).

5.9.5 Rotation der ferromagnetischen Fe_3O_4 -Partikeln und damit der Phagosomen

Bei der Phagozytose werden die Partikeln in Phagosome aufgenommen. Wie Abb. 5.7 zeigt, befinden sich bei den sphärischen Eisenoxidpartikeln die Phagosomenmembran im engen Kontakt mit dem Partikel. Es ist anzunehmen, daß eine magnetisch verursachte Rotation des Partikels gleichzeitig mit der Rotation des gesamten Phagosoms geschieht [175]. Von Möller und Koautoren [168] durchgeführte *in vitro*-Experimente mit J774A.1-Mausmakrophagen zeigen, daß nicht alle applizierten Partikeln an der Drehbewegung teilnehmen. Dieser Anteil wird durch eine Methode von Barth und Mitarbeitern [176] bestimmt und die Rohdaten bei ihrer Analyse korrigiert.

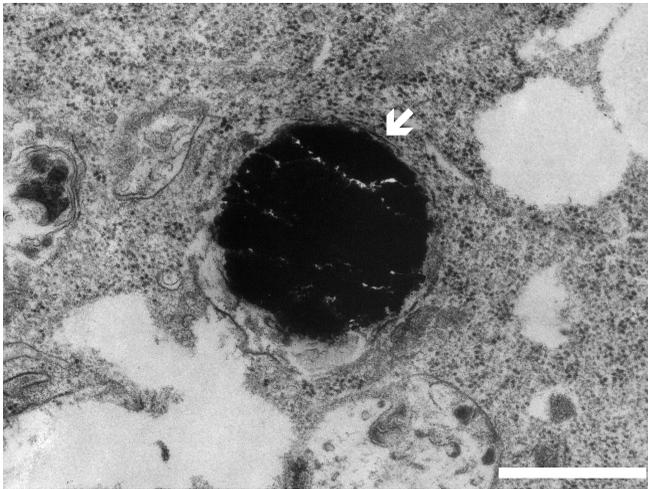


Abb. 5.7 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines sphärischen Fe_3O_4 -Partikels (Durchmesser $1,46 \mu\text{m}$) im Phagolysosom einer J774A.1-Mausmakrophage. Die Phagosomenmembran (Pfeil) liegt eng um den Partikel und nur wenig lysosomale Flüssigkeit befindet sich darin. Es wurden keine Phagolysosome gefunden, die mehr als ein Partikel enthielten. Foto: Shinji Takenaka, IHB, GSF Forschungszentrum, München. Maßbalken $1 \mu\text{m}$.

Durch die oben beschriebene Methode der Partikelrotation und damit Rotation der Phagosome lassen sich die Strukturen untersuchen, die mit den Phagosomen assoziiert sind: Mikrofilamente (Aktin) und Mikrotubuli [116].

Die zu untersuchenden Zellen müssen adhären sein. Sie wurden in sterile Gläsern in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen in 400 μl angesetzt und ferromagnetische Eisenoxidpartikeln (Fe_3O_4) zugesetzt (Endkonzentration 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Während der Inkubation über Nacht (Brutschrank, 37 °C, 5 % CO_2) phagozytieren die Zellen alle Magnetpartikeln. Im Mittel erscheinen zwei Partikeln pro Zelle. Am nächsten Tag wurden die Zellen gewaschen und 150 μl frisches Medium zugesetzt. Zu Beginn des Experiments wurden für die Negativkontrollen 50 μl frisches Medium, für die Proben 50 μl Suspension der jeweiligen Partikeln zugesetzt, die durch Ultraschall in einer Konzentrationen von 32, 100 und 320 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dispergiert waren.

5.10 Reverse Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Das Reaktionsprinzip der PCR beruht auf der Wiederholung eines zyklischen Reaktionsablaufs, dessen einzelne Schritte bei bestimmten Temperaturen in bestimmter Dauer durchgeführt werden. Zuerst wird die isolierte Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben (reverse Transkription). Diese cDNA wird zunächst denaturiert, wobei sich nun an den Einzelsträngen spezifische Oligonucleotide (Primer) anlagern können (Annealing). Ein thermostabiles Enzym, z.B. die Taq-Polymerase, verlängert die Primer an ihrem 3'-Ende komplementär gemäß der DNA-Vorlage (Elongation). Diese Schritte (Denaturierung, Annealing und Elongation) werden nun 30 bis 40 mal wiederholt, wobei die gewünschte und durch die spezifische Wahl des Primers festgelegte DNA-Sequenz (z.B. ein bestimmtes Gen) exponentiell vervielfacht wird. Die entstandenen PCR-Produkte werden auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Interkalation von Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht und abphotografiert werden.

5.10.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Im einzelnen läuft die RT-PCR zum Nachweis spezifischer mRNA-Mengen wie folgt ab: Zur Isolierung der RNA wurden 2×10^4 Zellen mit 200 μl RNA Clean (Hybaid, Teddington, UK) lysiert. Zur besseren Fällbarkeit der RNA wurde 2 μl tRNA (isoliert aus Hefe, 6,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und als internen Standard bei der Bestimmung von TNF bzw. IL-1 β 3 μl pAW109 cDNA (1×10^5 Kopien/ μl) zugegeben. Zu dieser Suspension wurde 20 μl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) hinzupipettiert, für 30 sec intensiv gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (10.000 g, 4 °C, 10 min, Eppendorfszentrifuge 5417C) wurde die obere wässrige Phase (ca. 100 μl) in ein neues Eppendorfgefäß (1,5 ml Volumen) überführt und durch Zugabe von 120 μl Isopropanol die RNA für 45 min auf Eis gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (20.000 g, 4 °C, 20 min) wurde der Überstand verworfen und das RNA-Pellet in 80 μl H_2O / 0,1 % DEPC gelöst und durch Zugabe von 20 μl 1 M NaCl und 120 μl Isopropanol nochmals wie oben gefällt und zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das RNA-Pellet mit 200 μl 75 % Ethanol gewaschen, nach der Zentrifugation (13.000 g, 4 °C, 10 min) und nach Entfernen des Überstandes unter dem Steril-Abzug getrocknet. Die RNA wurde in 20 μl H_2O / 0,1 % DEPC gelöst und für 10 min bei 65 - 70 °C im

Eppendorf-Heizblock denaturiert, bevor man sie wieder auf Eis lagert. Um für die nachfolgende reverse Transkription von allen Proben gleich viel RNA einzusetzen, wurden 5 µl der gewonnenen RNA-Lösung mit 995 µl H₂O/0,1 % DEPC gemischt und ihre O.D. bei λ = 260 nm bestimmt. Durch Multiplikation des O.D.-Wertes mit einem Faktor läßt sich der RNA-Gehalt (µg/µl) errechnen.

5.10.2 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurden 4 µl der RNA-Lösung mit der niedrigsten gemessenen Konzentration und entsprechende Volumina der anderen Proben (Volumenausgleich mit H₂O / 0,1 % DEPC) verwendet. Zur RNA wurde 17 µl des reversen Transkriptions-Mixes pipettiert. Nach Überschichtung des Gemisches mit 30 µl Mineralöl wurde die RNA in Thermocycler (Touchdown, Hybaid Ltd., Teddington, UK) 30 min bei 42 °C in cDNA umgeschrieben und abschließend 5 min bei 99 °C die reverse Transkriptase entfernt.

5.10.3 PCR

Zur Durchführung der Amplifikation wurden 10 µl der cDNA mit 10 µl Verdünnungspuffer und 80 µl Amplifikations-Mix vermischt und mit 60 µl Mineralöl überschichtet. Das Amplifikationsprofil für TNF-α folgt nachstehendem Schema:

| | | | | | |
|-----|-------|--------|---|----------|-----------|
| 1. | 94 °C | 4 min | } | 1 Zyklus | |
| 2.1 | 94 °C | 30 sec | | } | 40 Zyklen |
| 2.2 | 60 °C | 30 sec | | | |
| 2.3 | 72 °C | 40 sec | | | |
| 3. | 72 °C | 5 min | | 1 Zyklus | |

Für andere Zytokine wurden folgende Modifikationen des Profils vorgenommen: Für IL-8 beträgt die Temperatur in Schritt 2.2 54 °C nur 38 Zyklen in Schritt 2, für Enolase (als Standard) 59 °C in Schritt 2.2.

5.10.4 Gel-Elektrophorese

Die Analyse der amplifizierten DNA-Stücke erfolgte in einem 2 %igen Agarosegel mit 0,5-fachen TBE-Laufpuffer und 0,5 mg/ml Ethidiumbromid. Es wurden pro Probetasche 10 - 20 µl Probe und 2 µl Auftragspuffer auf das Gel aufgetragen. Als Längstandard wurde DNA-Molecular-Weight-Marker VI (0,15 - 2,1 kbp) aufgetragen. Der Gellauf erfolgte für ca. 60 bis 90 min bei 150 Volt und wurde danach mit einem Polaroid-Film (Polapan, 9 x 12 mm) unter UV-Beleuchtung fotografiert.

5.10.5 Primer

Sämtliche Primerpaare für die PCR wurden im Syntheselabor des GSF Forschungszentrums in Neuherberg bei München hergestellt.

TNF- α

5'-Primer: 5'-CAG AGG GAA GAG TTC CCC AG-3'

3'-Primer: 3'-CCT TGG TCT GGT AGG AGA CG-5'

IL-8

5'-Primer: 5'-ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG GCT-3'

3'-Primer: 3'-TCT CAG CCC TCT TCA AAA ACT TCT C-5'

α -Enolase

5'-Primer: 5'-GTT AGC AAG AAA CTG AAC GTC ACA-3'

3'-Primer: 3'-TGA AGG ACT TGT ACA GGT CAG-5'

5.11 Genexpressions-Array

Die Exposition von Organismen (Mensch, Tier) mit Partikeln (z.B. Verbrennungs-Aerosole) kann in den betroffenen Zielzellen zu einer Erhöhung oder Verringerung der Expression bestimmter Gene führen, wodurch messbare physiologische oder pathologische Veränderungen induziert werden können.

Mit der Expressionsarray-Technik wird auf mRNA-Ebene das Expressionsmuster einer großen Zahl von Genen (1.176 Gene) erfaßt. Expositionsabhängige Änderungen in der Expression wichtiger Gene oder Genfamilien liefern erste Ansatzpunkte zur Identifizierung der an der Reaktion beteiligten Mechanismen (z.B. proinflammatorisches Potential). Untersucht werden die Expressionsmuster in einer humanen monozytären Zelllinie als potentielle Zielzellen für Aerosolpartikeln in der Lunge. Um Änderungen der Genexpression durch Aerosolpartikeln erkennen zu können, werden parallel unbehandelte Kontrollen, sowie Kontrollen, die einer standardisierten Noxe (LPS) ausgesetzt wurden, mitgeführt.

Zur Durchführung dieser Experimente wurde der Atlas cDNA-Expression-Array Human 1.2 (Clontech, Heidelberg) verwendet. Folgendes Ablaufschema gibt einen Überblick über die Durchführung des Experiments (Abb. 5.8).

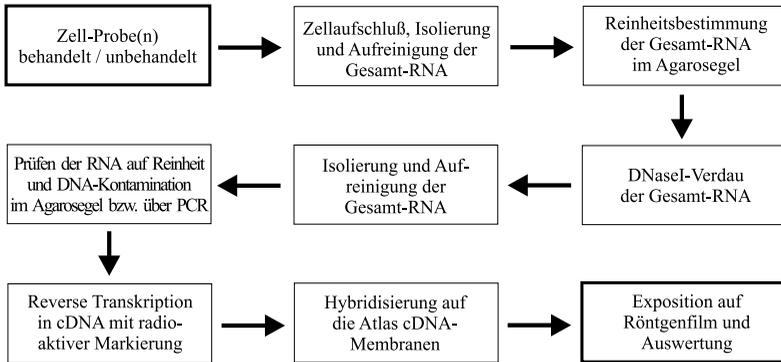


Abb. 5.8 Ablaufschema zur Durchführung eines Atlas cDNA Expression Arrays.

Die Durchführung des Versuchs erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers. Aufgrund eigener Modifikationen sei diese im folgenden kurz zusammengefaßt.

In einem Versuchsdurchgang wurden für die Inkubationszeit von 2 Stunden je vier 50-ml-Zentrifugenröhrchen mit jeweils $1,5 \times 10^7$ MM6-Zellen in 30 ml MM6-Medium für folgende Versuchsordnung angesetzt:

1. Unbehandelte Zellen (Negativkontrolle - NK);
2. mit LPS (1µg/ml) behandelte Zellen;
3. mit Cyotchalasin D (2 µM), Colchicin (10 µM), Printex90-Partikeln, EC90-Partikeln bzw. Standard-Diesel-Ruß (jeweils 32 µg/ml) behandelte Zellen;
4. mit der Kombination aus LPS und einem der Partikeln bzw. Standard-Diesel-Ruß behandelte Zellen.

Die Zellen in Ansatz 3 und 4 wurden eine Stunde mit den Partikeln bzw. dem Standard-Diesel-Ruß vorinkubiert (im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂), bevor LPS in Ansatz 2 und 4 zugegeben und die Inkubation für weitere 2 bzw. 4 Stunden weitergeführt wurde. Während der Inkubation wurden die Zellen, die sich langsam absetzten, durch Schütteln alle 30 min wieder in Suspension gebracht. Die Zellen in den Versuchsansätzen mit Cytochalasin D bzw. Colchicin wurden ohne Vorinkubation 1,5 h mit den Zytoskelettgiften inkubiert.

5.11.1 RNA-Isolierung und Aufreinigung

Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal in kalter PBS-Lösung gewaschen, in 10 ml kalter Zell-Denaturierungs-Lösung aufgeschlossen und die Lösung dreimal mit einer 10 ml-Spritze durch eine 18 Gauge-Kanüle gezogen. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurde die Lösung zur Entfernung grober Zelltrümmer abzentrifugiert (3.500 g, 2 °C, 20 min)

und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Es wurden 10 ml gesättigte Phenollösung zugegeben, gut gemischt und 5 min auf Eis inkubiert, dann 1,8 ml Chloroform hinzupipettiert und wieder wie oben gemischt und auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (3.500 g, 2 °C, 20 min) wurde der Überstand ohne die untere, organische Phase zu berühren, in ein neues 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Der obige Reinigungsschritt wurde nochmals mit 4,8 ml Phenollösung und 1,8 ml Chloroform wiederholt. 20 ml kaltes Isopropanol wurden portionsweise und unter ständigem Mischen zugegeben, 10 min auf Eis inkubiert, abzentrifugiert (3.500 g, 2 °C, 60 min) und den Überstand abpipettiert. Das verbliebene RNA-Pellet wurde in 3 ml Ethanol (80 %) gewaschen und nach erneuter 10-minütiger Zentrifugation der Alkohol entfernt und das RNA-Pellet 10 min luftgetrocknet. Die RNA wurde in 300 µl Reinstwasser gelöst und mit Hilfe der Absorption bei $\lambda = 260$ und 280 nm der RNA-Gehalt der einzelnen Proben bestimmt (2 µl RNA in 398 µl O.D.-Messpuffer). Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

5.11.2 Reinheitsbestimmung im Agarosegel

In einem denaturierenden Agarose/Formaldehyd/Ethidiumbromid-Gel wurden je Probe 2 µg RNA in 10 µl Ladepuffer aufgetragen und mit 1-fachem MOPS-Laufpuffer bei 75 Volt ca. 1,5 h elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Kontrolle wurde DNA Molecular Weight Marker VI mit aufgetragen. Bei unverdauten, reinen RNA-Proben sollten zwei scharfe Banden bei 4,5 und 1,9 kpb auftauchen, die die 28S bzw. 18S rRNA repräsentieren. Das Verhältnis von 28S zu 18S rRNA soll dabei im Bereich von 1,5 bis 2,5:1 liegen. Das Experiment wurde nur mit reiner und unverdauter RNA fortgesetzt.

5.11.3 DNaseI-Verdau

Die RNA-Proben können zu diesem Zeitpunkt noch Verunreinigungen mit DNA enthalten. Diese muß entfernt werden, um sicherzustellen, daß die spätere reversen Transkription der RNA in cDNA nicht durch genomische DNA kompetitiv gehemmt wird. Deshalb wird ein DNaseI-Verdau durchgeführt: Etwa 300 bis 350 µg RNA jeder Probe in einem Volumen von 80 µl wurden in einem Gemisch von 125 µl Reinstwasser, 24 µl DNaseI-Puffer, 1,2 µl DNaseI (10 U/µl) und 10 µl RNase-Inhibitor (20 U/µl) eine Stunde im Brutschrank (37 °C) inkubiert und danach die Reaktion mit 24 µl 10-fachen Terminationsmix gestoppt.

5.11.4 RNA-Isolierung und Aufreinigung nach dem DNaseI-Verdau

Zur erneuten Isolierung und Aufreinigung der RNA wurde zu jeder Probe 140 µl eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) zugegeben, gut gemischt und abzentrifugiert (Eppendorffzentrifuge, 14.000 rpm, RT, 10 min). Der wäßrige Überstand wird ohne die untere, organische Phase zu berühren, in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und erneut wie im vorherigen Schritt behandelt. Zum abgenommenen Überstand wurden 140 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) pipettiert, gemischt und abzentrifugiert. Zu dem in ein

neues Reaktionsgefäß überführten Überstand wurden 24 µl Ammoniumacetat-Lösung (7,5 M) und 360 µl Ethanol (96 %) hinzugefügt, gut gemischt und bei 14.000 rpm, RT und 20 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierte RNA mit 80 %igem Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet 10 min luftgetrocknet und in 40 µl Reinstwasser aufgenommen.

5.11.5 Prüfung der RNA auf DNA-Kontamination durch PCR

Um den Erfolg des DNaseI-Verdau (daß die RNA-Probe nicht mit genomischer DNA (gDNA) kontaminiert ist) zu überprüfen, wurde mit der RNA als Vorlage ohne reverse Transkription eine PCR durchgeführt. Als Primer wurde ein gut charakterisiertes Gen, die GAPDH gewählt, die als sog. „housekeeping“ Gen in allen Zellen in konstant hoher Rate exprimiert wird. Die Primer wurden so gewählt, daß sie innerhalb und zu Anfang eines Exon-Stückes des GAPDH-Genes lagen und nicht von einer Exon-Intron-Grenze unterbrochen wurden:

GAPDH

5'-Primer: 5'-AGT CCA TGC CAT CAC TGC CAC-3'

3'-Primer: 3'-GTC GCT GTG GGT GAG GAG GT-5'

Das Primerpaar wurden im Syntheselabor des GSF Forschungszentrums in Neuherberg bei München hergestellt.

Jeder einzelne Versuchsansatz muß mit vier PCR-Ansätzen überprüft werden:

1. Ansatz mit der zu prüfenden RNA
2. Ansatz mit Reinstwasser als Negativkontrolle
3. Ansatz mit genomischer DNA (gDNA) als Positivkontrolle
4. Ansatz mit RNA und gDNA

Der letzte PCR-Ansatz dient dazu, abschätzen zu können, ob RNA die erfolgreiche Amplifikation von vorhandener gDNA durch kompetitive Hemmung unterdrückt. Bei RNA-Proben, die frei von gDNA sind, würde man nur in Ansatz 3 und 4 eine erfolgreiche Amplifikation von GAPDH erwarten.

Für die PCR wurde 1 µg RNA und 1 µg gDNA eingesetzt. Zu den PCR-Ansätzen 1 und 4 wurde 4 µl RNase-Inhibitor (20 U/µl) zugegeben und das Gesamtvolumen mit Reinstwasser auf 8 µl aufgefüllt. Zu den PCR-Ansätzen wurden 10 µl Verdünnungs-Puffer und 80 µl Amplifikationsmix pipettiert und mit 60 µl Mineralöl überschichtet. Das Amplifikationsprofil für GAPDH folgt nachstehendem Schema:

| | | | |
|-----|-------|--------|-------------|
| 1. | 94 °C | 4 min | 1 Zyklus |
| 2.1 | 94 °C | 30 sec | } 40 Zyklen |
| 2.2 | 60 °C | 40 sec | |
| 2.3 | 72 °C | 40 sec | |
| 3. | 72 °C | 5 min | 1 Zyklus |

Die Analyse der amplifizierten DNA-Stücke erfolgte in einem 2 %igen Agarosegel mit 0,5-fachem TBE-Laufpuffer und 0,5 mg/ml Ethidiumbromid. Es wurden pro Probetasche 10 µl Probe und 2 µl Auftragspuffer auf das Gel aufgetragen. Als Längenstandard wurde DNA-Molecular-Weight-Marker VI (0,15 - 2,1 kbp) aufgetragen. Der Gellauf erfolgte für ca. 60 bis 90 min bei 150 Volt und wurde danach mit einem Polaroid-Film (Polapan, 9 x 12 mm) unter UV-Beleuchtung fotografiert.

5.11.6 Reverse Transkription in cDNA mit radioaktiver Markierung

Zur reversen Transkription wurden je Probe 5 µg der gereinigten RNA in 2 µl Volumen eingesetzt. Dazu wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 1 µl 10-fachen CDS Primer Mix¹ pipettiert, gut gemischt und kurz abzentrifugiert. Nach 2 minütiger Inkubation im Heizblock bei 70 °C wurden die Ansätze weitere 2 min bei 48 °C inkubiert und danach je 8 µl Mastermix hinzugegeben. Der Mastermix hat folgende Zusammensetzung:

| | |
|--------|---|
| 2 µl | 5-fach Reaction Buffer ¹ |
| 1 µl | 10-fach dNTP Mix ¹ |
| 3,5 µl | [α- ³² P]dATP (3.000 Ci/mmol; 10 mCi/ml) |
| 0,5 µl | DTT (100 mM) ¹ |
| 1 µl | MMLV Reverse Transcriptase (50 U/µl) ¹ |

Nach gutem Durchmischen wurde die Probe weitere 25 min bei 48 °C im Heizblock inkubiert und dann die Reaktion durch Zugabe von 10-fachem RT-Terminationsmix¹ gestoppt. Um die Probe von nicht eingebauten Nukleotiden zu befreien, wurde die nunmehr radioaktiv markierte cDNA-Probe auf Chroma-Spin-200-Säulchen¹ aufgetragen und 6 Fraktionen zu je 100 µl gesammelt (Elutionsmittel Reinstwasser). Die Aktivität der einzelnen Fraktionen wurden im Szintillationszähler (Packard) gemessen und ein Elutionsprofil erstellt. Die radioaktiv markierte cDNA eluiert meist mit Fraktion 2 und 3, die freien Nukleotide später (Fraktion 5 und 6). Die beiden Fraktionen mit dem höchsten cDNA-Peak wurden zusammenpipettiert. Die Probe muß eine Aktivität von 1 - 10 x 10⁶ Zerfälle pro Minute haben, um eine erfolgreiche Markierung zu erreichen.

¹ Diese Reagenzien sind im Atlas cDNA-Expression-Array-Kit der Fa. Clontech enthalten.

5.11.7 Hybridisierung auf die Atlas-cDNA-Membranen

Die cDNA-Membranen (je Probe eine Membran) wurden mit Reinstwasser benetzt und in Hybridisierungsflaschen eingelegt. Ohne die Membranen trocknen zu lassen, wurde 10 ml ExpressHyb-Hybridisierungslösung¹, die mit 100 µg/ml Lachs-Sperma-DNA (vor Gebrauch mit 18 Gauge-Nadel scheren) supplementiert war, eingefüllt und unter ständigem Drehen (ständige und gleichmäßige Benetzung der Membranen) die Flaschen im Hybridisierungssofen 30 min bei 68 °C inkubiert. Die radioaktiv markierten cDNA-Proben (200 µl Volumen) wurden mit 22 µl 10-facher DNA-Denaturing-Solution versetzt, gut gemischt und 20 min bei 68 °C im Heizblock inkubiert. 5 µl c₀t-1 DNA¹ und 225 µl 2-facher Neutralization-Solution wurden zugegeben, gut gemischt und die Probe weitere 10 min bei 68 °C inkubiert. Diese cDNA-Probe wurde mit 5 ml ExpressHyb-Lachs-Sperma-DNA-Mischung vermischt und nach Verwerfen der alten Hybridisierungslösung in die Hybridisierungsflaschen gefüllt. Die Hybridisierung läuft über Nacht bei 68 °C unter ständigem Drehen der Flaschen.

Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung verworfen und 200 ml auf 68 °C vorgewärmte Waschlösung I zugegeben und die Membran damit gewaschen. Die cDNA-Membran wurde von den Flaschen in einen Waschtrog überführt und dreimal mit Waschlösung I, dann zweimal mit Waschlösung II bei 68 °C jeweils 30 min gewaschen. Nach einem abschließenden Waschschrift in 2-facher SSC-Lösung für 5 min bei RT wurden die Membranen in dünne Kunststoff-Folie eingeschweißt und in Filmkassetten mit Verstärkerfolie (Biomax MS Screen, Kodak, Stuttgart) auf Biomax MS Film (Kodak, Stuttgart) ein, zwei und drei Tage bei -80 °C exponiert.

Nach Abschluß des Experiments kann durch „Strippen“, d.h. Abwaschen der vorherigen DNA-Probe die cDNA-Membran gereinigt und anschließend wiederverwendet werden.

¹ Diese Reagenzien sind im Atlas cDNA-Expression-Array-Kit der Fa. Clontech enthalten.

5.11.8 Versuchsauswertung

Die Schwärzung des Filmes ist ein Maß für die Expression des entsprechenden Gens. Die verschiedenen Ansätze aus dem Versuch (siehe oben) werden mit dem Expressionsmuster der zugehörigen Kontrolle (unbehandelte Zellen) verglichen. So kann man bestimmen, ob die Expression eines gegebenen Gens sich verändert, d.h. verstärkt oder abgeschwächt hat. Dazu wurden die exponierten Röntgenfilme mit 300 dpi im Durchlichtmodus eingescannt (Agfa Snapscan 1236 mit Durchlichteinheit, Scansoftware ScanWise Version 1.20, Agfa, Köln). Die densitometrische Auswertung wurde mit dem Computerprogramm Atlas Image Version 1.01 (Clontech, Heidelberg) mit den Einstellungen „background-based threshold“: 200 %, „linear image contrast“, „ratio threshold“: 2,0 % und „difference threshold“: 5.000 durchgeführt. Als Basis für die Normalisierung der einzelnen densitometrischen Daten dienten sieben als Kontrolle aufgetragene konstitutionell exprimierte Gene („Housekeeping“-Gene).

5.12 Statistik

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Meßergebnisse als arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung (S.D.) angegeben. Sie wurden mit dem F-Test auf homogene bzw. heterogene Verteilung und mit dem Student-t-Test auf Signifikanz überprüft (signifikant: $p \leq 0,05$; hoch signifikant: $p \leq 0,01$; Statistik-Software „WinStat“, Fa. Fitch Software, USA, Version 1999.2).

6. Abkürzungen

| | |
|-----------|---|
| % | Prozent |
| A. deion. | deionisiertes Wasser |
| A. dest. | destilliertes Wasser |
| AK | Antikörper |
| B | Benzo[a]pyren |
| BAL | Bronchoalveoläre Lavage |
| BSA | Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin) |
| CLMS | konfokales Laser-Scanning-Mikroskop |
| Col | Colchicin |
| CytoD | Cytochalasin D |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| EC90 | elementarer Kohlenstoff |
| f | fein |
| FITC | Fluorescein-Isothiocyanat |
| g | Erdbeschleunigung |
| GAPDH | D-Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase |
| gDNA | genomische DNA |
| h | Stunde |
| IgG | Immunglobulin G |
| λ | Wellenlänge |
| M | Mol pro Liter |
| mRNA | Messenger-RNA |
| min | Minute |
| o. | opsoniert |
| O.D. | optische Dichte |
| OxB | Oxidativer Burst |
| P90 | Printex 90 |
| Pa | Pascal |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PBMC | periphere mononukleäre Zellen aus dem Blut (Lymphozyten, Monozyten) |
| RNA | Ribonucleinsäure |
| RT | Raumtemperatur (ca. 25 °C) |
| RT-PCR | reverse Polymerasekettenreaktion |
| SDR | Standard Diesel Ruß (SRM 1650) |
| ROS | reaktive Sauerstoffspezies |
| SRBC | Hammel-Erythrozyten (Sheep Red Blood Cells) |
| sec | Sekunde |
| TNF | Tumor Nekrose Faktor |
| TRITC | Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat |
| uf | ultrafein |
| T | Tesla |

7. Literaturverzeichnis

- [1] G. Oberdörster: *Significance of particle parameters in the evaluation of exposure-dose relationships of inhaled particles*, Inhal. Toxicol. **8** (1996) 73-90
- [2] J. Ferin, G. Oberdörster, and D.P. Penney: *Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats*, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. **6** (1992) 535-542
- [3] X.Y. Li, P.S. Gilmour, K. Donaldson, W. MacNee: *Free radical activity and pro-inflammatory effects of particulate air pollution (PM10) in vivo and in vitro*, Thorax **51** (1996) 1216-1222
- [4] D.W. Dockery, C.A. Pope, X. Xu, J.D. Spengler, J.H. Ware, M.E. Fay, B.G. Ferris Jr., and F.E. Speizer: *An association between air pollution and mortality in six U.S. cities*, N. Engl. J. Med. **329** (1993) 1753-1759
- [5] A.J. Cohen, and C.A. Pope: *Lung cancer and air pollution*, Environ. Health. Perspect. **103** (1995) 219-224
- [6] K.J. Nikula, M.B. Snipes, E.B. Barr, W.C. Griffith, R.F. Henderdon, and J.L. Mauderly: *Comparative pulmonary toxicities and carcinogenicities of chronically inhaled diesel exhaust and carbon black in F344 rats*, Fundam. Appl. Toxicol. **25** (1995) 80-94
- [7] G. Oberdörster, R.M. Gelein, J. Ferin, and B. Weiss: *Association of particulate air pollution and acute mortality: Involvement of ultrafine particles?*, Inhal. Tox. **7** (1995) 111-124
- [9] Particle-lung interaction. (P. Gehr, and J. Heyder, eds.), Marcel Dekker Verlag, New York, 2000
- [8] J.J. Godleski, R.L. Verrier, P. Kontrakis, and P. Catalano: *Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice*, in: Research Report Number 96, North Andover, MA, USA: Health Effects Institute, Flagship Press, 2000
- [10] N. Konietzko, and M. Morgenroth: *Struktur und Funktion [der Lunge]*, in: Erkrankungen der Lunge, Konietzko, Wendel, Wiesner, eds.) Walter de Gruyter Verlag, Berlin, 1995
- [11] P. Gehr, H. Bachofen, and E. R. Weibel: *The normal human lung. Ultrastructure and morphometric estimation of diffusion capacity*, Respir. Physiol. **32** (1978) 345-353
- [12] J. Heyder, J. Gebhart, G. Rudolf, C.F. Schiller, and W. Stahlhofen: *Deposition of particles in the human respiratory tract in the size range 0.0005-15 µm*, J. Aerosol. Sci. **17** (1986) 811-825
- [13] ICRP Publication 66: *Human respiratory tract model for radiological protection*, Ann. ICRP, **24** (1994) 301-413
- [14] J.L. Mauderly, M.B. Snipes, E.B. Barr, S.A. Belinsky, J.A. Bond, A.L. Brooks, L.Y. Chang, Y.S. Cheng, N.A. Gillett, W.C. Griffith, R.F. Henderson, C.E. Mitchell, K.L. Nikula, and D.G. Thomassen D.G.: *Pulmonary toxicity of inhaled diesel exhaust and carbon black in chronically exposed rats, part I, neoplastic and nonneoplastic lung lesions*. Research Report Number 68, Cambridge, MA, USA: Health Effects Institute, Flagship Press, 1994

- [15] J.L. Mauderly: *Lung overload: The dilemma and opportunities for resolution*, Inhal. Toxicol. **8** (1996) 1-28
- [16] J. Heyder, J. Gebhart, G. Rudolf, C.F. Schiller, and W. Stahlhofen: *Deposition of particles in the human respiratory tract in the size range 0.005 - 15 μm* , J. Aerosol Sci. **17** (1986) 811-825
- [17] K.L. Maier, L. Leuschel, and U. Costabel: *Increased oxidized methionine residues in BAL fluid proteins in acute or chronic bronchitis*, Eur. Respir. J. **5** (1992) 651-658
- [18] J. Behr, K. Maier, B. Degenkolb, F. Krombach, and C. Vogelmeier: *Antioxidative and clinical effects of high-dose N-Acetylcystein in fibrosing alveolitis*, Am. J. Respir. Crit. Care Med. **156** (1997) 1897-1901
- [19] Molekularbiologie der Zelle, (Alberts, Bray, Lewis, Raff, Roberts, Watson, eds.), VCH-Verlag Weinheim, 1995
- [20] Immunologie, J. Klein (ed.), VCH-Verlag Weinheim, 1. Aufl. 1991
- [21] E.R. Weibel, and J. Gill: *Electron microscopic demonstration of an extracellular duplex lining layer of alveoli*, Respir. Physiol. **4** (1968) 52-57
- [22] H. Bowden: *The alveolar macrophage*, Environm. Health Persp. **55** (1984) 327-341
- [23] B.E. Lehnert, Y.E. Valdez, and L.M. Holland: *Pulmonary macrophages: alveolar and interstitial populations*, Esp. Lung Res. **9** (1985) 177-190
- [24] D.H. Bowden, and I.Y.R. Adamson: *Role of monocytes and interstitial cells in the generation of alveolar macrophages. I. Kinetic studies of normal mice*, Lab. Invest. **42** (1980) 511-517
- [25] H. Rumpold, O. Forster, G. Bock, P. Swetly, and M. Riedl: *Antigenic heterogeneity of rat macrophages. A monoclonal antibody reactin only with alveolar but not other types of macrophages*, Immunology **45** (1982) 637-643
- [26] B.S. Zwilling, L.B. Campolito, and N.A. Reiches: *Alveolar macrophage subpopulations identified by differential centrifugation on a discontinuous albumin density gradient*, Am. Rev. Respir. Dis. **125** (1982) 448-452
- [27] J. Shellito, and H.B. Kaltreider: *Heterogeneity of immunologic function among subfractions of normal rat alveolar macrophages*, Am. Rev. Respir. Dis. **129** (1984) 747-753
- [28] J.A. Cooper: *The role of actin polymerization in cell motility*, Annu. Rev. Physiol. **53** (1991) 585-606
- [29] J.P. Heath, and B. Holifield: *Cell locomotion: New research tests old ideas on membrane and cytoskeletal flow*, Cell Motil. Cytoskeleton **18** (1991) 245-257
- [30] P.A. Valberg, and H.A. Feldman: *Magnetic particle motions within living cells*, Biophys. J. **52** (1987) p551-p561
- [31] W. Möller, I. Nemoto, T. Matsuzaki, T. Hofer, J. Heyder: *Magnetic phagosome motion in J774A.1 macrophages: influence of cytoskeletal drugs*, Biophys. J. **79** (2000) 720-730
- [32] G. Virella: *Diagnostic evaluation of phagocytic function*, Immunol. Ser. **58** (1993) 311-327
- [33] T. Suzuki: *Signal transduction mechanisms through Fc γ receptors on the mouse macrophage surface*, FASEB J. **5** (1991) 187-193

- [34] S. Greenberg, and S.C. Siverstein S.C.: *Phagocytosis*, in: Fundamental immunology (W.E. Paul, ed.), 941-964, Raven Press Ltd., New York., 1993
- [35] L.A.H. Allen, and A. Aderem: *Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc-receptor-mediated phagocytosis in macrophages*, J. Exp. Med. **187** (1996) 627-637
- [36] L. Kobzik: *Lung macrophage uptake of unopsonized environmental particulates: Role of scavenger-type receptors*, J. Immunol. **155** (1995) 367-376
- [37] G.J. Cannon, and J.A. Swanson: *The macrophage capacity for phagocytosis*, J. Cell Sci. **101** (1992) 907-913
- [38] J.M. Robinson, and J.A. Badwey: *Production of active oxygen species by phagocytic leukocytes*, Immunol. Ser. **60** (1994) 159-178
- [39] W.M. Nauseef, B.D. Volpp, S. Mc Cormick, K.G. Leidal, and R.A. Clark: *Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components*, J. Biol. Chem. **266** (1991) 5911-5917
- [40] M.T.C. Quinn, C.A. Parkos, and A.J. Jesaitis A.J.: *The lateral organization of components of the membrane skeleton and superoxide generation in the plasma membrane of stimulated human neutrophils*, Biochim. Biophys. Acta **987** (1989) 83-94
- [41] A.K. Lenz, F. Krombach, and K.L. Maier: *Oxidative stress in vivo and in vitro: modulation by quartz dust and hyperbaric atmosphere*, Free Radical Biol. Med. **12** (1992) 1-10
- [42] G. Vogl, and E.F. Elstner: *Diesel soot particles catalyze the production of oxy-radicals*, Toxicol. Lett. **47** (1989) 17-23
- [43] P.S. Gilmour, P.H. Beswick, D.M. Brown, and K. Donaldson: *Detection of surface free radical activity of respirable industrial fibres using supercoiled oX174 FRI plasmid DNA*, Carcinogenesis **16** (1995) 2973-2979
- [44] P.S. Gilmour, D.M. Brown, P.H. Beswick, F. Benton, W. MacNee, and K. Donaldson: *Surface free radical activity of PM10 and ultrafine titanium dioxide: a unifying factor in their toxicity?*, Ann. Occup. Hyg. **41** (1997) 32-38
- [45] P. Howden, and S.P. Faux: *Glutathione modulates the formation of 8-hydroxy-deoxyguanosine in isolated DNA and mutagenicity in Salmonella typhimurium TA102 induced by mineral fibres*, Carcinogenesis **17** (1996) 2275-2277
- [46] S. Hippeli, and E.F. Elstner: *Transition metal ion-catalyzed oxygen activation during pathogenic processes*, FEBS Lett. **443** (1) (1999) 1-7
- [47] K.E. Driskoll: *TNF- α and MIP-2: role in particle-induced inflammation and regulation of oxidative stress*, Toxicol. Lett. **112-115** (2000) 177-183
- [48] J. Dai, B. Gilks, K. Price, and A. Churg: *Mineral dusts directly induce epithelial and interstitial fibrogenic mediators and matrix components in the airway wall*, Am. J. Respir Crit. Care Med. **158** (1998) 1907-1913
- [49] A. Churg, B. Gilks, and J. Dai: *Induction of fibrogenic mediators by fine and ultrafine titanium dioxide in rat tracheal explants*, Am. J. Physiol. **277** (1999) L975-L982

- [50] P.A. Bäuerle, and T. Henkel: *Function and activation of NF kappa B in the immune system*, Ann. Rev. Immunol. **12** (1994) 141-179
- [51] D. Vanhee, P. Gosset, C.H. Marquette, B. Wallaert, J.J. Lafitte, Gosslin, C. Voisin, and A.B. Tonnel: *Secretion and mRNA expression of TNF- α and IL-6 in the lungs of pneumoconiosis patients*, Am. J. Respir. Crit. Care Med. **152** (1995) 298-306
- [52] R. Vincent, P. Goegan, G. Johnson, J.R. Brook, P. Kumarathasan, L. Bouthillier, and R.T. Burnett: *Regulation of promotor-CAT stress genes in HepG2 cells by suspension of particles from ambient air*, Fundam. Appl. Toxicol. **39** (1997) 19-32
- [53] M.W. Frampton, A.J. Ghio, J.M. Samet, J.L. Carson, J.D. Carter, and R.B. Devlin: *Effects of aqueous extracts of PM(10) filters from the Utah valley on human airway epithelial cells*, Am. J. Physiol. **277** (1999) L960-L967
- [54] P. Ralph, M.A.S. Moore, and K. Nilsson: *Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines*, J. Exp. Med. **143** (1976) 1528-1533
- [55] P. Ralph, and I. Nakoinz: *Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line*, Nature **257** (1975) 393-394
- [56] P. Ralph, and I. Narkoinz: *Antibody-dependent killing of erythrocyte anmd tumor targets by macrophage-related cell lines: enhancement by PPD and LPS*, J. Immunol. **119** (1977) 950-954
- [57] P. Ralph, J. Prichard, and M. Cohn: *Reticulum cell sarcoma: an effector cell in antibody-dependent cell-mediated immunity*, J. Immunol. **114** (1975) 898-905
- [58] P. Ralph, and I. Nakoinz: *Direct toxic effects of immunopotentiators on monocytic, myelomonocytic, and histiocytic or macrophage tumor cells in culture*, Cancer Res. **37** (1977) 546-550
- [59] H.W.L. Ziegler-Heitbrock, E. Thiel, A. Fütterer, V. Herzog, A. Wirtz, and G. Riethmüller: *Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes*, Int. J. Cancer **41** (1988) 456-461
- [60] J. Engelhardt and W. Knebel: *Konfokale Laserscanning-Mikroskopie*, Physik in unserer Zeit **2** (1993) 70-78
- [61] G.R. Hook, and C.O. Odeyale: *Confocal scanning fluorescence microscopy: a new method for phagocytosis research*, J. Leuk. Biol. **45** (1989) 277-282
- [62] S.C. Silverstein, S. Greenberg, F. DiViglio, and T.H. Steinberg, in: *Fundamental Immunology*, Raven Press, New York 1989; zitiert nach [70]
- [63] T.H. Howard, and R.G. Watts: *Actin polymerization and leukocyte function*, Curr. Opin. Hematol. **1** (1994) 61-68
- [64] C.L. Carpenter: *Actin cytoskeleton and cell signaling*, Crit. Care Med. **28** (2000) N94-N99
- [65] K. Kwiatkowska, and A. Sobota: *Signaling pathways in phagocytosis*, Bioessays **21** (1999) 422-431
- [66] P. D'Arcy Hart, M.R. Young, M.M. Jorgan, W.J. Perkins, and M.J. Geisow: *Chemical inhibitors of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages also inhibit saltatory lysosomal movements. A combined microscopic and computer study*, J. Exp. Med. **158** (1983) 477-492

- [67] P. D'Arcy Hart, M.R. Young, A.H. Gordon, and K.H. Sullivan: *Inhibition of phagosome-lysosome fusion in macrophages by certain mycobacteria can be explained by inhibition of lysosomal movements observed after phagocytosis*, J. Exp. Med. **166** (1987) 933-946
- [68] M. Desjardins, L.A. Huber, R.G. Parton, and G. Griffiths: *Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus*, J. Cell. Biol. **124** (1994) 677-688
- [69] A. Jahraus, B. Storrie, G. Griffiths, and M. Desjardins: *Evidence for retrograde traffic between terminal lysosomes and the prelysosomal/late endosome compartment*, J. Cell Sci. **107** (1994) 145-157
- [70] A. Blocker, F.F. Severin, A. Habermann, A.A. Hyman, G. Griffiths, and J.K. Burkhardt: *Microtubule-associated protein-dependent binding of phagosomes to microtubules*, J. Biol. Chem. **271** (1996) 3803-3811
- [71] N. Hirokawa: *Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport*, Science **279** (1998) 519-526
- [72] T.A. Schroer, B.J. Schnapp, T.S. Reese, and M.P. Sheetz: *The role of kinesin and other soluble factors in organelle movement along microtubules*, J. Cell Biol. **107** (1988) 1785-1792
- [73] T.A. Schroer, E.R. Steuer, and M.P. Sheetz: *Cytoplasmic dynein is a minus end-directed motor for membranous organelles*, Cell **56** (1989) 937-946
- [74] M.L. Lacey, and L.T. Haimo: *Cytoplasmic dynein is a vesicle protein*, J. Biol. Chem. **267** (1992) 4793-4798
- [75] A. Blocker, F.F. Severin, J.K. Burkhardt, J.B. Bingham, H. Yu, J.C. Olivo, T.A. Schroer, A.A. Hyman, and G. Griffiths: *Molecular requirements for bi-directional movement of phagosomes along microtubules*, J. Cell Biol. **137** (1997) 113-129
- [76] P. Sampath, and T.D. Pollard: *Effects of cytochalasin, phalloidin, and pH on the elongation of actin filaments*, Biochem. **30** (1991) 1973-1980
- [77] R.G. Painter, J. Whisenand, and A.T. McIntosh: *Effects of cytochalasin B on actin and myosin association with particle binding sites in mouse macrophages: implications with regard to the mechanism of action of the cytochalasins*, J. Cell Biol. **91** (1981) 373-384
- [78] P.J. Wallace, C.H. Packman, R.P. Wersto, and M.A. Lichtman: *The effects of sulfhydryl inhibitors and cytochalasin on the cytoplasmic and cytoskeletal actin of human neutrophils*, J. Cell. Physiol. **132** (1987) 325-330
- [79] S. Sheikh, W.B. Gratzner, J.C. Pinder, and G.B. Nash: *Actin polymerisation regulates integrin-mediated adhesion as well as rigidity of neutrophils*, Biochem. Biophys. Res. Commun. **238** (1997) 910-915
- [80] D.J. Mooney, R. Langer, and D.E. Ingber: *Cytoskeletal filament assembly and the control of cell spreading and function by extracellular matrix*, J. Cell Sci. **108** (1995) 2311-2320
- [81] M. Kuhn: *The microtubule depolymerizing drugs nocodazole and colchicine inhibit the uptake of Listeria monocytogenes by P388D1 macrophages*, FEMS Microbiol. Lett. **160** (1998) 87-90

- [82] R.B. Kelly: *Microtubules, membrane traffic, and cell organization*, Cell **61** (1990) 5-7
- [83] J. Swanson, A. Bushnell, and S.C. Silverstein: *Tubular lysosome morphology and distribution within macrophages depend on the integrity of cytoplasmic microtubules*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84** (1987) 1921-1925
- [84] R.N. Melmed, P.J. Karanian, and R.D. Berlin: *Control of cell volume in the J774 macrophage by microtubule disassembly and cyclic AMP*, J. Cell Biol. **90** (1981) 761-768
- [85] M.A. Tsai, R.E. Waugh, and P.C. Keng: *Passive mechanical behavior of human neutrophils: effects of colchicine and paclitaxel*, Biophys. J. **74** (1998) 3282-3291
- [86] C.C. Stewart, B.E. Lehnert, and J.A. Steinkamp: *In vitro and in vivo measurement of phagocytosis by flow cytometry*, Meth. Enzymol. **132** (1986) 183-192
- [87] J. Hed: *Methods for distinguishing ingested from adhering particles*, Meth. Enzymol. **132** (1986) 198-204
- [88] C.P. Wan, C.S. Park, and B.H.S. Lau: *A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay*, J. Immunol. Meth. **162** (1993) 1-7
- [89] L.A.H. Allen, and A. Aderem: *Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages*, J. Exp. Med. **184** (1996) 627-637
- [90] A. Aderem, and D.M. Underhill: *Mechanisms of phagocytosis in macrophages*, Annu. Rev. Immunol. **17** (1999) 593-623
- [91] G. Kaplan: *Differences in the mode of phagocytosis with Fc and C3 receptors in macrophages*, Scand. J. Immunol. **6** (1977) 797-807
- [92] M.G. Riggig, G.R. Burmester, and A. Krause: *Coiling phagocytosis: When the zipper jams, the cup is deformed*, Trends Microbiol. **6** (1998) 384-387
- [93] J.V. Ravetch, and J. Kinet: *Fc receptors*, Annu. Rev. Immunol. **9** (1991) 457-492
- [94] M. Krieger, and J. Herz: *Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptor and LDL receptor-related protein (LRP)*, Annu. Rev. Biochem. **63** (1994) 601-637
- [95] K. Takata, S. Horiuchi, N. Araki, M. Shiga, M. Saitoh, and Y. Morino: *Endocytic uptake of nonenzymatically glycosylated proteins is mediated by a scavenger receptor for aldehyde-modified proteins*, J. Biol. Chem. **263** (1988) 14819-14825
- [96] V. LeCabeac, C. Cols, and I. Maridonneau-Parini: *Nonopsonic phagocytosis of zymosan and Mycobacterium kansasii by CR3 (CD11b/CD18) involves distinct molecular determinants and is or is not coupled with NADPH oxidase activation*, Infect. Immun. **68** (8) (2000) 4736-4745
- [97] R.Y. Hampton, D.T. Golenbock, M. Penman, M. Krieger, and C.R. Raetz: *Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptor*, Nature **353** (1991) 342-344
- [98] A. Palecanda, J. Paulauskis, E. Al-Mutairi, A. Imrich, G. Qin, H. Suzuki, T. Kodama, K. Tryggvason, H. Koziel, and L. Kobzik: *Role of scavenger receptor MARCO in alveolar macrophage binding of unopsonized environmental particles*, J. Exp. Med. **189** (1999) 1497-1506

- [99] D. Bratosin, J. Mazurier, C. Slomianny, D. Aminoff, and J. Montreuil: *Molecular mechanisms of erythrophagocytosis: flow cytometric quantitation of in vitro erythrocyte phagocytosis by macrophages*, Cytometry (Comm. Clin. Cytometry) **30** (1997) 269-274
- [100] S.D. Wright: *Methods for the study of receptor-mediated phagocytosis*, Meth. Enzymol. **132** (1986) 204-221
- [101] T.L. Leto, K.L. Lomax, B.D. Volpp, H. Nunoi, J.M.G. Sechler, W.M. Nauseef, R.A. Clark, J.I. Gallin, and H.L. Malech: *Cloning of a 67 kDa neutrophil region of p60^{c-src}*, Science **248** (1990) 727-730
- [102] X.Y. Li, P.S. Gilmour, K. Donaldson, and W. MacNee: *Free radical activity and pro-inflammatory effects of particulate air pollution (PM10) in vivo and in vitro*, Thorax **51** (1996) 1216-1222
- [103] X.Y. Li, P.S. Gilmour, K. Donaldson, and W. MacNee: *In vivo and in vitro proinflammatory effects of particulate air pollution (PM10)*, Environ. Health Persp. **105** (1997) 1279-1283
- [104] V. Stone, J. Shaw, D.M. Brown, W. MacNee, S.P. Faux, and K. Donaldson: *The role of oxidative stress in the prolonged inhibitory effect of ultrafine carbon black on epithelial cell function*, Tox. in vitro **12** (1998) 649-659
- [105] K. Donaldson, D. Brown, and W. MacNee: Inflammation caused by ultrafine carbon black particles is independent of transition metals or other soluble components, 3rd Colloquium on Particulate Air Pollution and Human Health, Durham, North Carolina, USA, p 14, 1999
- [106] D.M. Brown, V. Stone, P. Findlay, W. MacNee, and K. Donaldson: *Increased inflammation and intracellular calcium caused by ultrafine carbon black is independent of transition metals or other soluble components*, Occup. Environ. Med. **57** (2000) 685-691
- [107] L. Serrander, J. Larsson, H. Lundqvist, M. Lindmark, M. Fällman, C. Dahlgren, and O. Stendahl: *Particles binding β 2-integrins mediate intracellular production of oxidative metabolites in human neutrophils independently of phagocytosis*, Biochem. Biophys. Acta **1452** (1999) 133-144
- [108] X.Y. Li, D. Brown, S. Smith, W. MacNee, and K. Donaldson: *Short-term inflammatory responses following intratracheal instillation of fine and ultrafine carbon black in rats*, Inhal. Toxicol. **11** (1999) 709-731
- [109] K. Donaldson, X.Y. Li, and W. MacNee: *Ultrafine (nanometre) particle mediated lung injury*, J. Aerosol Sci. **29** (1998) 553-560
- [110] N.J. Goulding, H.S. Euzger, S.K. Butt, and M. Perretti: *Novel pathways for glucocorticoid effects of neutrophils in chronic inflammation*, Inflamm. Res. **47** (1998) S158-S165
- [111] D. Hoeben, C. Burvenich, and A.M. Massart-Leen: *Glucocorticosteroids and in vitro effects on chemiluminescence of isolated bovine blood granulocytes*, Eur. J. Pharmacol. **354** (1998) 197-203
- [112] C.K. Sen, and L. Packer: *Antioxidant and redox regulation of gene transcription*, FASEB J. **10** (1996) 709-720

- [113] M. Muroi, Y. Muroi, and T. Suzuki: *The binding of immobilized IgG2a to Fc γ 2a receptor activates NF- κ B via reactive oxygen intermediates and tumor necrosis factor- α* , J. Biol. Chem. **269** (1994) 30561-30568
- [114] V. Stone, M. Tiunman, J.E. Vamvakopoulos, J. Shaw, D. Brown, S. Petterson, S.P. Faux, P. Borm, W. MacNee, F. Michaelangelil, and K. Donaldson: *Increased calcium influx in a monocytic cell line on exposure to ultrafine carbon black*, Eur. Respir J. **15** (2000) 297-303
- [115] W. Stahlhofen, and W. Möller: *Behaviour of magnetic micro-particles in the human lung*, Radiat. Environ. Biophys. **32** (1993) 221-238
- [116] W. Möller, S. Takenaka, M. Rust, W. Stahlhofen, and J. Heyder: *Probing mechanical properties of living cells by magnetopneumography*, J. Aerosol Med. **10** (1997) 173-186
- [117] P.A. Valberg, and D.F. Albertini: *Cytoplasmic motions, rheology, and structure probed by a novel magnetic particle method*, J. Cell Biol. **101** (1985) 130-140
- [118] I. Nemoto, K. Ogura, and H. Toyotama: *Estimation of the energy of cytoplasmic movements by magnetometry: Effects of temperature and intracellular concentration of ATP*, IEEE Trans. Biomed. Eng. **36** (1989) 598-607
- [119] P. D'Arcy Hart, M.R. Young, M.M. Jordan, W.J. Perkins, and M.J. Geisow: *Chemical inhibitors of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages also inhibit saltatory lysosomal movements*, J. Exp. Med. **158** (1983) 477-492
- [120] R. Barhoumi, Y. Mounneimne, K.S. Ramos, S.H. Safe, T.D. Phillips, V.E. Centonze, C. Ainley, M.S. Gupta, and R.C. Burghardt: *Analysis of benzo[a]pyrene partitioning and cellular homeostasis in a rat liver cell line*, Tox. Sci. **53** (2000) 264-270
- [121] S. Tornquist, M. Nicklasson, P. Soderkvist, L. Nybom, and R. Toftgard: *Bioavailability of benzo(a)pyrene deposited in the lung. Correlation with dissolution from urban air particulates and covalently bound DNA adducts*, Drug Metab. Dispos. **16** (1988) 842-847
- [122] K.M. Kurian, C.J. Watson, and A.H. Wyllie: *DNA chip technology*, J. Pathol. **187** (1999) 267-271
- [123] A. Hernandez, F. Smith, Q. Wang, X. Wang, and B.M. Evers: *Assessment of differential gene expression patterns in human colon cancer*, Ann. Surg. **232** (2000) 576-585
- [124] N. Nakachi, K. Matsunaga, T.W. Klein, H. Friedmann, and Y. Yamamoto: *Differential effects of virulent versus a virulent Legionella pneumophila on chemokine gene expression in murine alveolar macrophages determined by cDNA expression array technique*, Infect. Immun. **68** (2000) 6069-6072
- [125] A. Hall: *Rho GTPases and the actin cytoskeleton*, Science **279** (1998) 509-514
- [126] N.A. Hotchin, A. Hall: *Regulation of the actin cytoskeleton, integrins and cell growth by the Rho family of small GTPases*, Cancer Surveys **27** (1996) 311-322
- [127] R.K. Srivastava, A.R. Srivastava, S.J. Korsmeyer, M. Nesterova, Y.S. Cho-Chung, and D.L. Longo: *Involvement of microtubules in the regulation of bcl2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase*, Mol. Cell. Biol. **18** (1998) 3509-3517

- [128] C.A. Dinarello: *Interleukin-1*, Cytokine Growth Factor Rev. **8** (1997) 253-265
- [129] A. H. Wyllie: *Apoptosis: an overview*, British Med. Bul. **53** (1997) 451-465
- [130] L. Rao, and E. White: *Bcl-2 and the ICE family of apoptotic regulators: making a connection*, Curr. Op. Gen. Dev. **7** (1997) 52-58
- [131] R. Brown: *The bcl-2 family of protein*, Brit. Med. Bul. **53** (1996) 466-477
- [132] U.K. Meßmer, J.C. Reed, and B. Brüne: *Bcl-2 protects macrophages from nitric oxide-induced apoptosis*, J. Biol. Chem. **271** (1996) 20192-20197
- [133] A. Holian, R.F. Hamilton Jr., M.T. Morandi, S.D. Brown, and L. Li: *Urban particle-induced apoptosis and phenotype shifts in human alveolar macrophages*, Environ. Health Perspect. **106** (1998) 127-132
- [134] M.E.M. Noble, J.A. Endicott, N.R. Brown, and L.N. Johnson: *The cyclin box fold: Protein recognition in cell-cycle and transcription control*, TIBS **22** (1997) 482-487
- [135] R. Taieb, C. Thibier, and C. Jesus: *On cyclins, oocytes, and eggs*, Mol. Reprod. Dev. **48** (1997) 397-411
- [136] D.G. Wilkinson: *Eph receptors and ephrins: Regulators of guidance and assembly*, Int. Rev. Cytol. **196** (2000) 177-244
- [137] S. Gerondakis, M. Grossmann, Y. Nakamura, T. Pohl, and R. Grumont: *Genetic approaches in mice to understand Rel/NF- κ B and I κ B function: transgenic and knockouts*, Oncogene **18** (1999) 6888-6895
- [138] J. Bard, A.M. Zhelkovsky, S. Helmling, T.N. Earnest, C.L. Moore, and A. Bohm: *Structure of yeast poly(A) polymerase alone and in complex 3'-dATP*, Science **289** (2000) 1346-1349
- [139] H.B. Jijon, T. Churchill, D. Malfair, A. Wessler, L.D. Jewell, H.G. Parsons, and K.L. Madsen: *Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates inflammation in a model of chronic colitis*, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. **279** (2000) G641-G651
- [140] E.M. Taylor, and A.R. Lehmann: *Review: Conservation of eukaryotic DNA repair mechanisms*, Int. J. Radiat. Biol. **74** (1998) 277-286
- [141] C.A. Dinarello: *Proinflammatory cytokines*, Chest **118** (2000) 503-508
- [142] A. Surprenant: *Functional properties of native and cloned P2X receptors*, Ciba Found. Symp. **198** (1996) 208-222
- [143] G. Burnstock: *P2 purinoceptors: Historical perspective and classification*, Ciba Found. Symp. **198** (1996) 1-28
- [144] G. Burnstock: *Overview. Purinergic mechanisms*, Ann. N.Y. Acad. Sci. **603** (1990) 1-17
- [145] Y.M.W. Janssen, and C.K. Sen: *Nuclear factor κ B activity in response to oxidants and antioxidants*, Meth. Enzymol. **300** (1990) 363-374
- [146] A.G. Bassuk, and J.M. Leiden: *The role of ets transcription factors in the development and function of the mammalian immune system*, Advanc.Immunol. **64** (1997) 65-104
- [147] P.D.K. Dhulipal: *Ets oncogene family*, Indian J. Exp. Biol. **35** (1997) 315-322
- [148] U. Kaufmann, B. Martin, D. Link, K. Witt, R. Zeitler, S. Reinhard, and A. Starzinski-Powitz: *M-cadherin and its sisters in development os striated muscle*, Cell Tissue Res. **296** (1999) 191-198

- [149] J. Xu, K. McKeehan, K. Matsuzaki, and W.L. McKeehan: *Inhibin antagonizes inhibition of liver cell growth by activin by a dominant-negative mechanism*, JBC **270** (2000) 6308-6313
- [150] I. Thesleff, A. Vaahtokari, S. Vainio, and A. Jowett: *Molecular mechanisms of cell and tissue interactions during early tooth development*, Anat. Record **245** (1996) 151-161
- [151] I. Thesleff: *Homeobox genes and growth factors in regulation of craniofacial and tooth morphogenesis*, Acta Odontol. Scand. **53** (1995) 129-134
- [152] T.C. Pellas, and L.P. Wennogle: *C5a receptor antagonists*, Curr. Pharm. Des. **5** (1999) 737-755
- [153] B.J. Czermak, A.B. Lentsch, N.M. Bless, H. Schmal, H.P. Friedl, and P.A. Ward: *Role of complement in in vitro and in vivo lung inflammatory reactions*, J. Leukoc. Biol. **64** (1998) 40-48
- [154] D.A. Lomas: *New insights into the structural basis of $\alpha 1$ -antitrypsin deficiency*, Q. J. Med. **89** (1996) 807-812
- [155] H. Koyama, and D.M. Geddes: *Genes, oxidative stress, and the risk of chronic obstructive pulmonary disease*, Thorax **53** (1998) S10-S14
- [156] S. Janciauskiene, and H.T. Wright: *Inflammation, antichymotrypsin, and lipid metabolism: Autogenic etiology of Alzheimer's disease*, Bioessays **20** (1998) 1039-1046
- [157] N.A. Kalsheker: *Alpha 1-antichymotrypsin*, Int. J. Biochem. Cell Biol. **28** (1996) 961-964
- [158] J.E. Repine: *Interleukin-1-mediated acute lung injury and tolerance to oxidative injury*, Environ. Health Perspect. **102** (1994) 75-78
- [159] P. Vaillant, O. Menard, J.M. Vignaud, N. Martinet, and Y. Martinet: *The role of cytokines in human lung fibrosis*, Monaldi. Arch. Chest Dis. **51** (1996) 145-152
- [160] T.J. Standiford, S.L. Kunkel, and R.M. Strieter: *Interleukin-8: A major mediator of acute pulmonary inflammation*, Regional Immunol. **5** (1993) 134-141
- [161] W. Möller, W. Stahlhofen, and C. Roth: *Improved spinning top aerosol generator for the production of high concentrated ferrimagnetic aerosols*, J. Aerosol Sci. **21** (1990) S435-S438
- [162] C. Helsper, W. Mölter, F. Löffler, C. Wadenpohl, S. Kaufmann, and G. Wenninger: *Investigations of a new aerosol generator for the production of carbon aggregate particles*, Atmos. Environ. **27A** (1993) 1271-1275
- [163] P. Ralph, M.A. Moore, and K. Nilsson: *Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines*, J. Exp. Med. **143** (1976) 1528-1533
- [164] I. Nakoinz, and P. Ralph: *Stimulation of macrophage antibody-dependent killing of tumor targets by recombinant lymphokine factors and M-CSF*, Cell Immunol. **116** (1988) 331-340
- [165] H.W.L. Ziegler-Heitbrock, E. Thiel, A. Futterer, V. Herzog, A. Wirtz, and G. Riethmüller: *Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes*, Int. J. Cancer **41** (1988) 456-461
- [166] W.H.T. Schürmann, M.W. Frampton, G. Schürmann, N.J. Roberts Jr., J.E. Nichols, J.N. Finkelstein, G. Oberdörfer, and M.J. Utell: *A flow cytometric assay of Fc receptor-mediated phagocytosis*, J. Aerosol Med. **10** (1997) 1-12

- [167] D.A. Bass, J.W Parce, L.R. Dechatelet, P. Szejda, M.C. Seeds, and M. Thomas: *Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: A graded response to membrane stimulation*, J. Immunol. **130** (1983) 1910-1917
- [168] W. Möller, V. Guzijan, W. Pohlit, W. Stahlhofen, T. Wenisch, and J. Wiegand: *Cytomagnetometry with ferromagnetic micro-particles-influence of particle size and dispersity*, J. Aerosol Sci. **23** (1992) S519-S522
- [169] P.A. Valberg: *Magnetometry of ingested particles in pulmonary macrophages*, Science **224** (1984) 513-516
- [170] P. Gehr, J.D. Brain, I. Nemoto, and S.B. Bloom: *Organelle movements of alveolar macrophages studied by cytomagnetometry*, in: *Biomagnetism, applications & theory* (H. Weinberg, G. Stroink, T. Katila, eds.), 395-400, Pergamon Press, New York, 1985
- [171] W.G. Kreyling, and G.A. Ferron: *Production of cobalt oxide aerosols with a modified spinning top aerosol generator*, J. Aerosol Sci. **15** (1984) 851-857
- [172] D. Cohen, and I. Nemoto: *Ferrimagnetic particles in the lung. 1. The magnetising process*. IEEE Trans. Biomed. Eng. **31** (1984) 261-273
- [173] N. Wang, J.P. Butler, and D.E. Ingber: *Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton*, Science **260** (1993) 1124-1127
- [174] I. Nemoto, W. Möller: *A viscoelastic model of phagosome motion within cells based on cytomagnetometric measurements*, IEEE Trans. Biomed. Eng. **47** (2000) 170-182
- [175] W. Stahlhofen, W. Möller, and J. Godleski: *Relaxation measurements with spherical magnetic particles in the human lungs*, J. Aerosol Sci. **21** (1990) 355-362
- [176] W. Barth, W. Möller, W. Pholit, W. Stahlhofen, and J. Wiegand: *Magnetopneumographic estimation of particle phagocytosis in the human lungs*, J. Aerosol Sci. **25** (1994) S491-S492

8. Anhang zu den Ergebnissen

8.1 cDNA-Expressions-Array (Clontech)

8.1.1 Atlas-cDNA-Expression-Array Human, 588 Gene Cytochalasin D und Colchicin

Der Array enthält die cDNA von 588 Genen, die doppelt aufgetragen sind. Welche Gene aufgetragen sind, ist über den Hyperlink <http://www.clontech.com/atlas/genelists/index.html> im Internet nachzulesen (Stand: Oktober 2000). Wählen Sie auf dieser Seite beim Array „Human“ (#7740-1) als Ansicht zwischen einer Excel-Liste oder einer Text-Datei.

Abb. 8.1 und 8.2 zeigt die Autoradiographien der Inkubation von MM6-Zellen mit Colchicin. Die Gesamtübersicht der in den Experimenten mit Cytochalasin D und Colchicin in der Expression veränderten Gene listen die Tab. 8.1 und 8.2 auf.

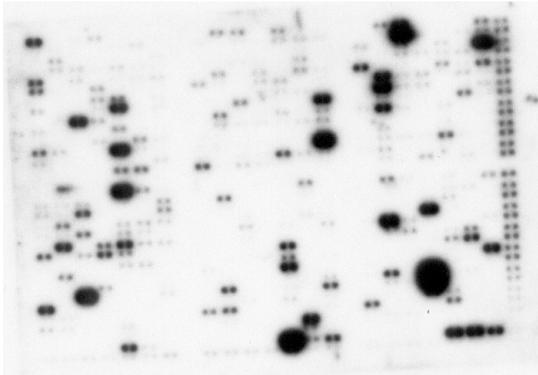


Abb. 8.1 Autoradiographie des Expressionsarrays der unbehandelten MM6-Zellen (Negativkontrolle). Jeder Punkt entspricht einem Gen, die bei diesem Array als dicht nebeneinanderliegende Punkte doppelt aufgetragen sind.

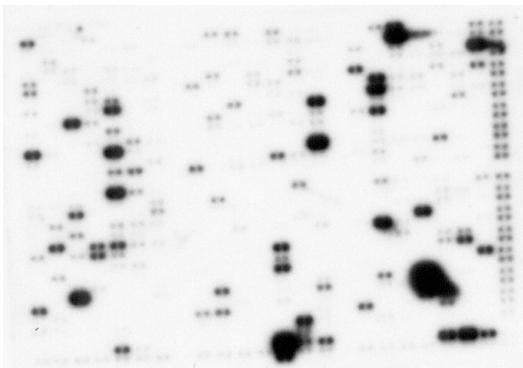


Abb. 8.2 Autoradiographie des Expressionsarrays der mit Colchicin behandelten MM6-Zellen (Negativkontrolle).

| Gene / Proteine | Cytochalasin D | Expressionsänderung [%] |
|---|----------------|-------------------------|
| Interleukin-1 alpha precursor (IL-1 alpha; IL1A); hematopoietin-1 | | 857 |
| T-lymphocyte maturation-associated protein MAL | | 597 |
| Interleukin-8 precursor (IL-8); monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF); T-cell chemotactic factor; neutrophil-activating protein 1 (NAP1); lymphocyte-derived neutrophil-activating factor (LYNAP); protein 3-10C | | 597 |
| Interleukin-1 beta precursor (IL-1 ; IL1B); catabolin | | 583 |
| HLA class I histocompatibility antigen C-4 alpha subunit (HLAC) | | 423 |
| Brain-specific tubulin alpha 1 subunit (TUBA1) | | 385 |
| C-jun proto-oncogene; transcription factor AP-1 | | 335 |
| Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) beta subunit 1 (GNB1); transducin beta-1 subunit | | 331 |
| Macrophage inflammatory protein 1 alpha precursor (MIP1-alpha); tonsillar lymphocyte LD78 alpha protein; G0S19-1 protein; PAT 464.2; SIS-beta; small inducible cytokine A3 (SCYA3) | | 322 |
| Macrophage-specific colony-stimulating factor (CSF-1; MCSF) | | 288 |
| Transcriptional repressor protein yin & yang 1 (YY1); delta transcription factor; DNA-binding protein NF-E1 | | 267 |
| Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) | | 254 |
| Interleukin-12 beta subunit precursor (IL-12B); cytotoxic lymphocyte maturation factor 40-kDa subunit (CLMF p40); NK cell stimulatory factor subunit 2 (NKSF2) | | 225 |
| Microsomal glutathione S-transferase 12 (GST12; MGST1) | | 193 |
| V-erbA related protein (EAR2) | | 185 |
| NADH-ubiquinone oxidoreductase B18 subunit; complex I-B18 (CI-B18); cell adhesion protein SQM1 | | 169 |
| Macrophage inflammatory protein 2 alpha (MIP2-alpha); growth-regulated protein beta (GRO-beta) | | 160 |
| Xeroderma pigmentosum group B complementing protein (XPB); DNA excision repair protein ERCC3; basal transcription factor 2 89-kDa subunit (BTF2-p89); TFIIH 89-kDa subunit | | 158 |
| Alpha1 catenin (CTNNA1); cadherin-associated protein; alpha E-catenin | | 158 |
| Cytoplasmic beta-actin (ACTB) | | 153 |
| Ubiquitin | | 151 |
| Fli-1 oncogene; ergB transcription factor | | 144 |
| Early growth response protein 1 (hEGR1); transcription factor ETR103; KROX24; zinc finger protein 225; AT225 | | 140 |
| Heat shock 90-kDa protein A (HSP90A; HSPCA); HSP86 | | 137 |
| Mitogen-activated protein kinase p38 (MAP kinase p38); cytokine suppressive anti-inflammatory drug binding protein (CSAID binding protein; CSBP); MAX-interacting protein 2 (MXI2) | | 137 |
| Ribosomal protein S9 | | 131 |
| Transcription initiation factor TFIIID 31-kDa subunit; TAFII31; TAF2G | | 122 |
| Homeobox protein HOXB7; HOX2C; HHO.c1 | | 120 |
| Tristetraprolin (TTP); TIS11; ZFP36; growth factor-inducible nuclear protein 475 (NUP475) | | 120 |
| Caspase-10 precursor (CASP10); ICE-LIKE apoptotic protease 4 (ICE-LAP4); apoptotic protease MCH4; fas-associated death domain protein; interleukin-1-beta-converting enzyme 2 (FLICE2) | | 118 |
| Hepatoma-derived growth factor (HDGF) | | 117 |
| Corticotropin releasing factor receptor 1 precursor (CRF-R; CRF1) | | 116 |
| Cellular nucleic acid binding protein (CNBP); sterol regulatory element-binding protein | | 114 |

8. ANHANG

| Gene / Proteine Cytochalasin D | Expressionsänderung [%] |
|---|-------------------------|
| Vascular endothelial growth factor precursor (VEGF); vascular permeability factor (VPF) | 112 |
| HHR23A; UV excision repair protein protein RAD23A | 112 |
| DNA-repair protein XRCC1 | 111 |
| Interleukin-2 receptor alpha subunit precursor (IL-2 receptor alpha subunit; IL2RA); p55; TAC antigen; CD25 | 104 |
| Transcription factor LSF | 104 |
| Cell surface adhesion glycoproteins LFA-1/CR3/p150,95 beta-subunit precursor; LYAM1; integrin beta 2 (ITGB2); CD18 antigen; complement receptor C3 beta subunit | 104 |
| Ras-related protein RAB2 | 98 |
| Cation-independent mannose-6-phosphate receptor precursor (CI man-6-P receptor; CI-MPR); insulin-like growth factor II receptor (IGFR II) | 95 |
| Integrin alpha 7B precursor (IGA7B) | 90 |
| Ephrin type-A receptor 1 precursor; tyrosine-protein kinase receptor eph | 88 |
| Ionizing radiation resistance-conferring protein + death-associated protein 3 (DAP3) | 87 |
| Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (CDKN1A); melanoma differentiation-associated protein 6 (MDA6); CDK-interacting protein 1 (CIP1); WAF1 | 84 |
| Leukocyte adhesion glycoprotein LFA-1 alpha subunit precursor; leukocyte function-associated molecule 1 alpha chain; CD11A antigen; integrin alpha L (ITGAL) | 82 |
| Growth arrest & DNA-damage-inducible protein 153 (GADD153); DNA damage-inducible transcript 3 (DDIT3); C/EBP homologous protein (CHOP) | 80 |
| Special AT-rich sequence binding protein 1 (SATB1); MAR/SAR DNA-binding protein | 80 |
| 23-kDa highly basic protein; 60S ribosomal protein L13A (RPL13A) | 77 |
| Phospholipase A2 | 77 |
| CD44 antigen hematopoietic form precursor (CD44H); phagocytic glycoprotein I (PGP-1); HUTCH-I; extracellular matrix receptor-III (ECMR-III); GP90 lymphocyte homing/adhesion receptor (LHR); hermes antigen | 75 |
| EB1 protein | 67 |
| Interleukin-5 receptor alpha subunit precursor (IL-5R-alpha; IL5RA); CD125 antigen | 58 |
| Transcription factor Sp1 (TSFP1) | 57 |
| Myeloid cell nuclear differentiation antigen (MND A) | 52 |
| CD27 ligand (CD27LG); CD70 antigen | 51 |
| Insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP1); placental protein 12 (PP12) | 49 |
| Thioredoxin peroxidase 2 (TDPX2); thioredoxin-dependent peroxide reductase 2; proliferation-associated gene (PAG); natural killer cell enhancing factor A (NKEFA) | 47 |
| DNA-binding protein HIP116; ATPase; SNF2/SWI2-related protein | 46 |
| Caspase-4 precursor (CASP4); ICH-2 protease; TX protease; ICE(REL)-II + caspase-5 precursor (CASP5); ICH-3 protease; TY protease; ICE(REL)-III | 46 |
| Tyrosine-protein kinase lyn | 42 |
| Platelet-derived growth factor A subunit precursor (PDGFA; PDGF1) | 42 |

| Gene / Proteine | Cytochalasin D | Expressionsänderung [%] |
|---|----------------|-------------------------|
| R kappa B DNA-binding protein | | 42 |
| R kappa B DNA-binding protein | | 42 |
| T-cell-specific rantes protein precursor; sis delta; small inducible cytokine A5 (SCYA5); rantes pro-inflammatory cytokine | | 61 |
| Intercellular adhesion molecule-1 precursor (ICAM1); major group rhinovirus receptor; CD54 antigen | | 52 |
| G2/mitotic-specific cyclin B1 (CCNB1) | | 40 |
| Transcription factor ETR101 | | 37 |
| Leukosialin precursor; leukocyte sialoglycoprotein; sialophorin (SPN); CD43 antigen; galactoglycoprotein (GALGP) | | 33 |
| Granulocyte colony stimulating factor receptor precursor (GCSF-R); CD114 antigen | | 27 |
| Acyl-CoA-binding protein (ACBP); diazepam binding inhibitor (DBI); endozepine (EP) | | 26 |
| Defender against cell death 1 (DAD1) | | 24 |
| Growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2) isoform; GRB3-3; SH2/SH3 adaptor GRB2; ASH protein + epidermal growth factor receptor-bound protein 2 (EGFRBP-GRB2) | | 21 |
| Natural killer cell enhancing factor (NKEFB) + thiol-specific antioxidant protein (TSA); thioredoxin peroxidase 1 (TDPX1); thioredoxin-dependent peroxide reductase 1 | | 16 |
| C-myc purine-binding transcription factor puf; nucleoside diphosphate kinase B (NDP kinase B; NDKB) + nm23-H2S | | 12 |
| Thymosin beta-10 (TMSB10; THYB10); PTMB10 | | 10 |
| Transforming growth factor beta receptor III precursor (TGF beta receptor III; TGFR3); betaglycan | | -73 |
| 27-kDa heat-shock protein (HSP27); stress-responsive protein 27 (SRP27); estrogen-regulated 24-kDa protein; HSPB1 | | -59 |
| Activator 1 37-kDa subunit; replication factor C 37-kDa subunit (RFC37); RFC4 | | -47 |
| Cc-myc oncogene | | -42 |
| Transforming growth factor beta receptor III precursor (TGF beta receptor III; TGFR3); betaglycan | | -40 |
| Replication factor C 38-kDa subunit (RFC38); activator 1 38-kDa subunit | | -39 |
| B-myb | | -30 |
| Helix-loop-helix protein; DNA-binding protein inhibitor Id-2 | | -23 |
| Migration inhibitory factor-related protein 14 (MRP14); calgranulin B; leukocyte L1 complex heavy subunit; S100 calcium-binding protein A9 | | -19 |
| Tumor necrosis factor precursor (TNF-alpha; TNFA); cachectin | | -15 |

Tab. 8.1 Inkubation von MM6-Zellen mit Cytochalasin D (1,5 Stunden). Auflistung aller vom Computerprogramm in der Expression als verändert detektierten Gene.

| Gene / Proteine | Colchicin | Expressionsänderung [%] |
|---|-----------|-------------------------|
| Interleukin-1 alpha precursor (IL-1 alpha; IL1A); hematopoietin-1 | | 1059 |
| C-jun proto-oncogene; transcription factor AP-1 | | 389 |
| Apoptosis regulator bcl-2 | | 311 |
| 23-kDa highly basic protein; 60S ribosomal protein L13A (RPL13A) | | 51 |
| Brain-specific tubulin alpha 1 subunit (TUBA1) | | 41 |
| Natural killer cell enhancing factor (NKEFB) + thiol-specific antioxidant protein (TSA); thioredoxin peroxidase 1 (TDPX1); thioredoxin-dependent peroxide reductase 1 | | 33 |

8. ANHANG

| Gene / Proteine Colchicin | Expressionsänderung [%] |
|--|-------------------------|
| Early growth response protein 1 (hEGR1); transcription factor ETR103; KROX24; zinc finger protein 225; AT225 | 26 |
| Interleukin-1 beta precursor (IL-1 ; IL1B); catabolin | 21 |
| Myeloid cell nuclear differentiation antigen (MND4) | -74 |
| Helix-loop-helix protein; DNA-binding protein inhibitor Id-2 | -71 |
| C-myc oncogene | -67 |
| Transcriptional repressor protein yin & yang 1 (YY1); delta transcription factor; DNA-binding protein NF-E1 | -67 |
| Transforming growth factor beta receptor III precursor (TGF beta receptor III; TGFR3); betaglycan | -63 |
| Caspase-10 precursor (CASP10); ICE-LIKE apoptotic protease 4 (ICE-LAP4); apoptotic protease MCH4; fas-associated death domain protein; interleukin-1-beta-converting enzyme 2 (FLICE2) | -60 |
| Estrogen receptor hSNF2b; global transcription activator SNF2L4; brg-1 protein; mitotic growth and transcription activator; brahma protein homolog 1 | -57 |
| Heat shock factor protein 1 (HSF1); heat shock transcription factor 1 (HSTF1); TCF5 | -55 |
| Zinc finger X-chromosomal protein (ZFX) | -53 |
| Cytoplasmic dynein light chain 1 (HDLC1); protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase (PIN) | -51 |
| 60S ribosomal protein L6 (RPL6); TAX-responsive enhancer element binding protein 107 (TAXREB107); neoplasm-related protein C140 | -49 |
| Cation-independent mannose-6-phosphate receptor precursor (CI man-6-P receptor; CI-MPR); insulin-like growth factor II receptor (IGFR II) | -49 |
| Fli-1 oncogene; ergB transcription factor | -48 |
| Protein kinase C delta (NPKC-delta) | -47 |
| Glial growth factor 2 precursor (GGFHPP2); neuregulin; heregulin-beta3 + neu differentiation factor + heregulin-alpha | -47 |
| Hepatoma-derived growth factor (HDGF) | -44 |
| Guanine nucleotide-binding protein G-s alpha subunit (GNAS); adenylate cyclase-stimulating G alpha protein | -44 |
| Acyl-CoA-binding protein (ACBP); diazepam binding inhibitor (DBI); endozepine (EP) | -44 |
| Glutathione S-transferase A1 (GTH1; GSTA1); HA subunit 1; GST-epsilon | -42 |
| Activator 1 37-kDa subunit; replication factor C 37-kDa subunit (RFC37); RFC4 | -42 |
| Ezrin; cytovillin 2; villin 2 (VIL2) | -41 |
| Apoptosis regulator bax | -41 |
| Zinc finger protein 91 (ZNF92); HPF7; HTF10 | -39 |
| Heat-shock protein 40 (HSP40) | -38 |
| Neuromedin B receptor (NMBR); neuromedin-B-preferring bombesin receptor | -38 |
| Urokinase-type plasminogen activator receptor GPI-anchored form precursor (U-PAR); monocyte activation antigen MO3; CD87 antigen | -38 |
| T-cell-specific rantes protein precursor; sis delta; small inducible cytokine A5 (SCYA5); rantes pro-inflammatory cytokine | -37 |
| Leukosialin precursor; leukocyte sialoglycoprotein; sialophorin (SPN); CD43 antigen; galactoglycoprotein (GALGP) | -37 |
| B-myb | -36 |

| Gene / Proteine Colchicin | Expressionsänderung [%] |
|--|-------------------------|
| Leukocyte adhesion glycoprotein LFA-1 alpha subunit precursor; leukocyte function-associated molecule 1 alpha chain; CD11A antigen; integrin alpha L (ITGAL) | -36 |
| Paired box protein PAX-5; B-cell specific transcription factor; BSAP | -34 |
| Signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6); IL-4 STAT | -34 |
| Nuclease-sensitive element DNA-binding protein (NSEP) | -33 |
| CD27 ligand (CD27LG); CD70 antigen | -32 |
| Thymosin beta-10 (TMSB10; THYB10); PTMB10 | -30 |
| Granulocyte colony stimulating factor receptor precursor (GCSF-R); CD114 antigen | -29 |
| DNA excision repair protein ERCC1 | -26 |
| Cytosolic superoxide dismutase 1 (SOD1) | -24 |
| Glutathione S-transferase mu1 (GSTM1; GST1); HB subunit 4; GTH4 | -21 |
| Intercellular adhesion molecule-1 precursor (ICAM1); major group rhinovirus receptor; CD54 antigen | -21 |
| Neuroleukin (NLK); glucose-6-phosphate isomerase (GPI); phosphoglucose isomerase (PGI); phosphohexose isomerase (PHI) | -20 |
| p55CDC | -18 |
| Replication factor C 38-kDa subunit (RFC38); activator 1 38-kDa subunit | -18 |
| Ephrin type-A receptor 1 precursor; tyrosine-protein kinase receptor eph | -18 |
| HHR23A; UV excision repair protein protein RAD23A | -15 |
| Ubiquitin | -14 |
| Tumor necrosis factor precursor (TNF-alpha; TNFA); cachectin | -13 |

Abb. 8.2 Inkubation von MM6-Zellen mit Colchicin D (1,5 Stunden). Auflistung aller vom Computerprogramm in der Expression als verändert detektierten Gene.

8.1.2 Atlas-cDNA-Expression-Array Human 1.2, 1.176 Gene P90, EC90 und SDR

Der Array enthält die cDNA von 1.176 Genen, die doppelt aufgetragen sind. Nachfolgende Tabelle listet die Gene in englischer Sprache auf. Alternativ sind sie unter <http://www.clontech.com/atlas/genelists/index.html> nachzulesen. Wählen Sie auf dieser Seite beim Array „Human 1.2“ (#7850-1) zwischen einer Excel-Liste oder einer Text-Datei.

Printex 90

Abb. 8.3 bis 8.6 zeigt die Autoradiographien der Inkubationen von MM6-Zellen mit P90 (Negativkontrolle, LPS, P90, P90 + LPS). Die Gesamtübersicht der in den Experimenten mit P90 in der Expression veränderten Gene listen die Tab. 8.3 bis 8.5 auf.

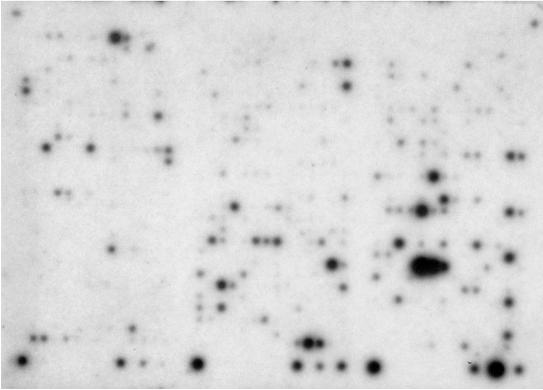


Abb. 8.3 Autoradiographie des Expressionsarrays der unbehandelten MM6-Zellen (Negativkontrolle). Jeder Punkt entspricht einem Gen. Dieses Muster entspricht der Genaktivität der Zellen im unbehandelten Zustand.

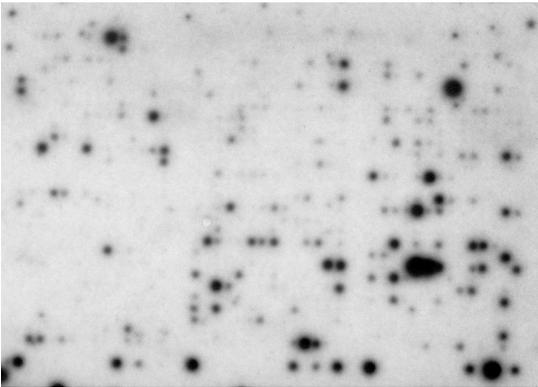


Abb. 8.4 Autoradiographie des Expressionsarrays der mit LPS (1µg/ml) behandelten MM6-Zellen. Jeder Punkt entspricht einem Gen. Dieses Muster entspricht der Genaktivität der mit LPS behandelten Zellen.

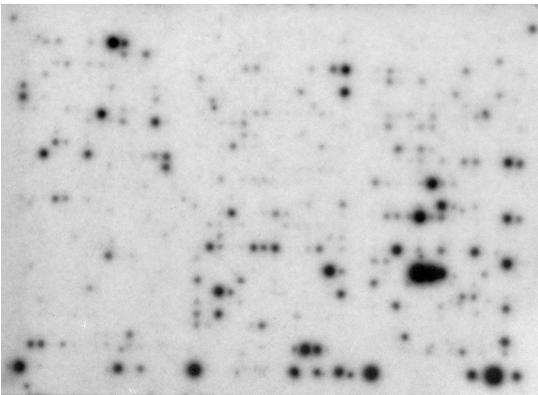


Abb. 8.5 Autoradiographie des Expressionsarrays der mit P90 (32 µg/ml) behandelten MM6-Zellen. Jeder Punkt entspricht einem Gen. Dieses Muster entspricht der Genaktivität der mit P90 behandelten Zellen.

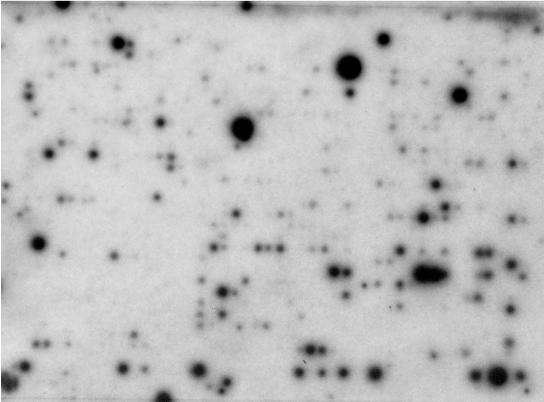


Abb. 8.6 Autoradiographie des Expressionsarrays der mit P90 (32 µg/ml) und nachfolgend mit LPS (1 µg/ml) behandelten MM6-Zellen. Jeder Punkt entspricht einem Gen.

| Gene / Proteine | LPS (Versuch P90) | Expressionsänderung [%] |
|--|-------------------|-------------------------|
| Macrophage inflammatory protein 1 beta precursor (MIP1-beta); T-cell activation protein 2 (AT2); PAT 744; H400; SIS-gamma; lymphocyte activation gene 1 protein (LAG 1); HC21; small inducible cytokine A4 (SCYA4); G 26 T-lymphocyte secreted protein | | 10178 |
| Macrophage inflammatory protein 1 alpha precursor (MIP1-alpha); tonsillar lymphocyte LD78 alpha protein; G0S19-1 protein; PAT 464.2; SIS-beta; small inducible cytokine A3 (SCYA3) | | 4013 |
| Interleukin-8 precursor (IL-8); monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF); T-cell chemotactic factor; neutrophil-activating protein 1 (NAP1); lymphocyte-derived neutrophil-activating factor (LYNAP); protein 3-10C | | 2224 |
| Growth arrest & DNA-damage-inducible protein (GADD45); DNA-damage-inducible transcript 1 (DDIT1) | | 1985 |
| Tumor necrosis factor precursor (TNF-alpha; TNFA); cachectin | | 1803 |
| Macrophage inflammatory protein 2 alpha (MIP2-alpha); growth-regulated protein beta (GRO-beta) | | 1077 |
| Protein phosphatase PP2A 55-kDa regulatory subunit alpha isoform; protein phosphatase PP2A B subunit alpha isoform; alpha-PR55 | | 924 |
| Intercellular adhesion molecule-1 precursor (ICAM1); major group rhinovirus receptor; CD54 antigen | | 746 |
| Placenta growth factors 1 + 2 (PLGF1 + PLGF2) | | 578 |
| C-jun proto-oncogene; transcription factor AP-1 | | 292 |
| Corticotropin releasing factor receptor 1 precursor (CRF-R; CRF1) | | 217 |
| Interleukin-2 receptor alpha subunit precursor (IL-2 receptor alpha subunit; IL2RA); p55; TAC antigen; CD25 | | 201 |
| Interleukin-1 beta precursor (IL-1 ; IL1B); catabolin | | 195 |
| Leukocyte adhesion glycoprotein LFA-1 alpha subunit precursor; leukocyte function-associated molecule 1 alpha chain; CD11A antigen; integrin alpha L (ITGAL) | | 146 |
| DNA excision repair protein ERCC1 | | 135 |

8. ANHANG

| Gene / Proteine LPS (Versuch P90) | Expressionsänderung [%] |
|---|-------------------------|
| Nucleoside diphosphate kinase A (NDKA); NDP kinase A; tumor metastatic process-associated protein; metastasis inhibition factor NM23 (NM23-H1) | 114 |
| Cdc2-related protein kinase PISSLRE | 110 |
| T-cell-specific rantes protein precursor; sis delta; small inducible cytokine A5 (SCYA5); rantes pro-inflammatory cytokine | 103 |
| Vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1); tyrosine-protein kinase receptor flt + soluble VEGFR; tyrosine-protein kinase receptor SFLT | 98 |
| RCL growth-related c-myc-responsive gene | 73 |
| Rho GDP dissociation inhibitor 1 (RHO-GDI 1); RHO-GDI alpha (GDIA1); ARHGDI A | 59 |
| NADH-ubiquinone oxidoreductase B18 subunit; complex I-B18 (CI-B18); cell adhesion protein SQM1 | 40 |
| Neuromedin B receptor (NMBR); neuromedin-B-preferring bombesin receptor | 39 |
| cAMP-dependent transcription factor ATF-4; DNA-binding protein TAXREB67; cAMP-response element binding protein (CREB2) | 36 |
| Prothymosin alpha (ProT-alpha; PTMA) | 34 |
| Leukosialin precursor; leukocyte sialoglycoprotein; sialophorin (SPN); CD43 antigen; galactoglycoprotein (GALGP) | 29 |
| Defender against cell death 1 (DAD1) | 26 |
| Replication factor C 38-kDa subunit (RFC38); activator 1 38-kDa subunit | 25 |
| Cytosolic superoxide dismutase 1 (SOD1) | 25 |
| Cell surface adhesion glycoproteins LFA-1/CR3/p150,95 beta-subunit precursor; LYAM1; integrin beta 2 (ITGB2); CD18 antigen; complement receptor C3 beta subunit | 21 |
| Natural killer cell enhancing factor (NKEFB) + thiol-specific antioxidant protein (TSA); thioredoxin peroxidase 1 (TDPX1); thioredoxin-dependent peroxide reductase 1 | 19 |
| Activator 1 37-kDa subunit; replication factor C 37-kDa subunit (RFC37); RFC4 | -56 |
| Stromal cell derived factor 1 receptor (SDF1 receptor); fusin; CXCR4; leukocyte-derived seven transmembrane domain receptor (LESTR); LCR1 | -35 |
| Nuclease-sensitive element DNA-binding protein (NSEP) | -25 |

Tab. 8.3 Inkubation von MM6-Zellen mit LPS (1 µg/ml). Auflistung aller vom Computerprogramm in der Expression im Vergleich zur Negativkontrolle als verändert detektierten Gene.

| Gene / Proteine P90 (Versuch P90) | Expressionsänderung [%] |
|--|-------------------------|
| Cyclin H (CCNH); MO15-associated protein | 14988 |
| Nucleoside diphosphate kinase A (NDKA); NDP kinase A; tumor metastatic process-associated protein; metastasis inhibition factor NM23 (NM23-H1) | 107 |
| Cdc2-related protein kinase PISSLRE | 67 |
| Defender against cell death 1 (DAD1) | 65 |
| T-cell-specific rantes protein precursor; sis delta; small inducible cytokine A5 (SCYA5); rantes pro-inflammatory cytokine | 63 |
| Leukocyte adhesion glycoprotein LFA-1 alpha subunit precursor; leukocyte function-associated molecule 1 alpha chain; CD11A antigen; integrin alpha L (ITGAL) | 52 |
| Ephrin type-A receptor 1 precursor; tyrosine-protein kinase receptor eph | 48 |
| Cathepsin D precursor (CTSD) | 43 |

| Gene / Proteine P90 (Versuch P90) | Expressionsänderung [%] |
|---|-------------------------|
| Erythrocyte urea transporter (UTE; UT1); SLC14A1; HUT11; RACH1 | 40 |
| NADH-ubiquinone oxidoreductase B18 subunit; complex I-B18 (CI-B18); cell adhesion protein SQM1 | 38 |
| Replication factor C 38-kDa subunit (RFC38); activator 1 38-kDa subunit | 36 |
| Leukosialin precursor; leukocyte sialoglycoprotein; sialophorin (SPN); CD43 antigen; galactoglycoprotein (GALGP) | 30 |
| Glutathione S-transferase mu1 (GSTM1; GST1); HB subunit 4; GTH4 | 29 |
| Natural killer cell enhancing factor (NKEFB) + thiol-specific antioxidant protein (TSA); thioredoxin peroxidase 1 (TDPX1); thioredoxin-dependent peroxide reductase 1 | 27 |
| Growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2) isoform; GRB3-3; SH2/SH3 adaptor GRB2; ASH protein + epidermal growth factor receptor-bound protein 2 (EGFRBP-GRB2) | 24 |
| Platelet membrane glycoprotein IIB precursor (GP2B); integrin alpha 2B (ITGA2B); CD41 antigen | 24 |
| cAMP-dependent transcription factor ATF-4; DNA-binding protein TAXREB67; cAMP-response element binding protein (CREB2) | 17 |
| Neuromedin B receptor (NMBR); neuromedin-B-preferring bombesin receptor | 16 |
| Thymosin beta-10 (TMSB10; THYB10); PTMB10 | 10 |
| MutL protein homolog; DNA mismatch repair protein MLH1; COCA2 | 10 |
| Thymosin beta 4; FX | -48 |
| Nuclease-sensitive element DNA-binding protein (NSEP) | -35 |
| Microsomal glutathione S-transferase 12 (GST12; MGST1) | -27 |

Tab. 8.4 Inkubation von MM6-Zellen mit P90 (32 µg/ml). Auflistung aller vom Computerprogramm in der Expression im Vergleich zur Negativkontrolle als verändert detektierten Gene.

| Gene / Proteine P90 + LPS (Versuch P90) | Expressionsänderung [%] |
|--|-------------------------|
| Aromatic-L-amino-acid decarboxylase; DOPA decarboxylase (DDC) | 4694900 |
| Deoxyribonuclease I (DNase I) | 1113300 |
| Protein kinase C beta I (PKC-beta-1) | 318575 |
| Protein-tyrosine phosphatase 1E | 9024 |
| Macrophage inflammatory protein 1 beta precursor (MIP1-beta); T-cell activation protein 2 (AT2); PAT 744; H400; SIS-gamma; lymphocyte activation gene 1 protein (LAG 1); HC21; small inducible cytokine A4 (SCYA4); G 26 T-lymphocyte secreted protein | 3598 |
| Macrophage inflammatory protein 1 alpha precursor (MIP1-alpha); tonsillar lymphocyte LD78 alpha protein; GOS19-1 protein; PAT 464.2; SIS-beta; small inducible cytokine A3 (SCYA3) | 2732 |
| Tumor necrosis factor precursor (TNF-alpha; TNFA); cachectin | 1861 |
| Interleukin-8 precursor (IL-8); monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF); T-cell chemotactic factor; neutrophil-activating protein 1 (NAP1); lymphocyte-derived neutrophil-activating factor (LYNAP); protein 3-10C | 1149 |
| Intercellular adhesion molecule-1 precursor (ICAM1); major group rhinovirus receptor; CD54 antigen | 485 |
| Tissue inhibitor of metalloproteinases 2 (TIMP2); metalloproteinase inhibitor 2 precursor; CSC-21K | 483 |

| Gene / Proteine | P90 + LPS (Versuch P90) | Expressionsänderung [%] |
|---|-------------------------|-------------------------|
| Placenta growth factors 1 + 2 (PLGF1 + PLGF2) | | 469 |
| C-jun proto-oncogene; transcription factor AP-1 | | 279 |
| Insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP1); placental protein 12 (PP12) | | 197 |
| Ephrin type-A receptor 1 precursor; tyrosine-protein kinase receptor eph | | 189 |
| Interleukin-1 beta precursor (IL-1 ; IL1B); catabolin | | 170 |
| Macrophage inflammatory protein 2 alpha (MIP2-alpha); growth-regulated protein beta (GRO-beta) | | 107 |
| 40S ribosomal protein S19 (RPS19) | | 101 |
| Cdc2-related protein kinase PISSLRE | | 84 |
| Prothymosin alpha (ProT-alpha; PTMA) | | 64 |
| Leukocyte adhesion glycoprotein LFA-1 alpha subunit precursor; leukocyte function-associated molecule 1 alpha chain; CD11A antigen; integrin alpha L (ITGAL) | | 43 |
| NADH-ubiquinone oxidoreductase B18 subunit; complex I-B18 (CI-B18); cell adhesion protein SQM1 | | 42 |
| T-cell-specific rantes protein precursor; sis delta; small inducible cytokine A5 (SCYA5); rantes pro-inflammatory cytokine | | 41 |
| Growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2) isoform; GRB3-3; SH2/SH3 adaptor GRB2; ASH protein + epidermal growth factor receptor-bound protein 2 (EGFRBP-GRB2) | | 23 |
| C-myc purine-binding transcription factor puf; nucleoside diphosphate kinase B (NDP kinase B; NDKB) + nm23-H2S | | 20 |
| Cell surface adhesion glycoproteins LFA-1/CR3/p150,95 beta-subunit precursor; LYAM1; integrin beta 2 (ITGB2); CD18 antigen; complement receptor C3 beta subunit | | 7 |
| Cathepsin D precursor (CTSD) | | -48 |
| Thymosin beta 4; FX | | -38 |
| Glutathione S-transferase mu1 (GSTM1; GST1); HB subunit 4; GTH4 | | -35 |
| Interleukin-1 alpha precursor (IL-1 alpha; IL1A); hematopoietin-1 | | -32 |
| Microsomal glutathione S-transferase 12 (GST12; MGST1) | | -32 |
| Glutathione S-transferase pi (GSTP1; GST3) | | -31 |
| Macrophage-specific colony-stimulating factor (CSF-1; MCSF) | | -31 |
| 27-kDa heat-shock protein (HSP27); stress-responsive protein 27 (SRP27); estrogen-regulated 24-kDa protein; HSPB1 | | -28 |
| Natural killer cell enhancing factor (NKEFB) + thiol-specific antioxidant protein (TSA); thioredoxin peroxidase 1 (TDPX1); thioredoxin-dependent peroxide reductase 1 | | -24 |
| Interleukin-10 precursor (IL-10); cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF) | | -23 |

Tab. 8.5 Inkubation von MM6-Zellen mit P90 (32 µg/ml) und LPS (1 µg/ml). Auflistung aller vom Computerprogramm in der Expression im Vergleich zur Negativkontrolle als verändert detektierten Gene.

EC90

Abb. 8.7 bis 8.10 zeigt die Autoradiographien der Inkubationen von MM6-Zellen mit EC90 (Negativkontrolle, LPS, EC90, EC90 + LPS). Die Gesamtübersicht der in den Experimenten mit EC90 in der Expression veränderten Gene listen die Tab. 8.6 bis 8.8 auf.

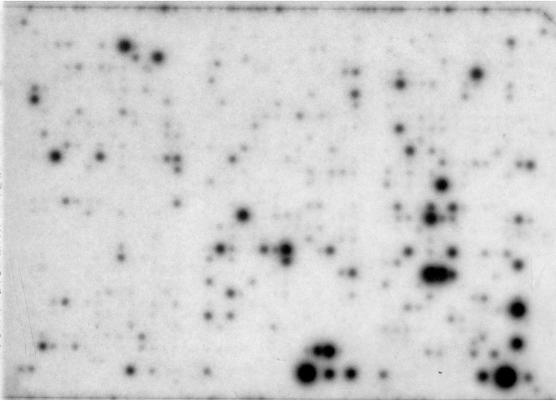


Abb. 8.7 Autoradiographie des Expressionsarrays der unbehandelten MM6-Zellen (Negativkontrolle). Jeder Punkt entspricht einem Gen. Dieses Muster entspricht der Genaktivität der Zellen im unbehandelten Zustand.

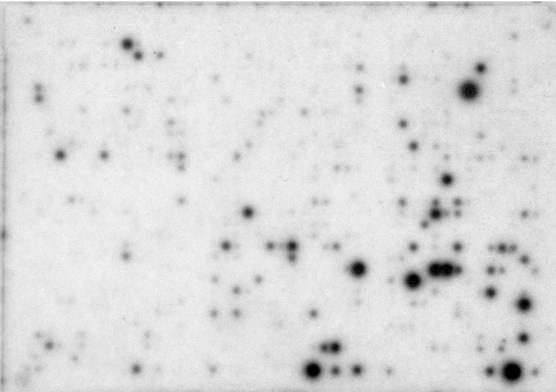


Abb. 8.8 Autoradiographie des Expressionsarrays der mit LPS (1 µg/ml) behandelten MM6-Zellen. Jeder Punkt entspricht einem Gen. Dieses Muster entspricht der Genaktivität der mit LPS behandelten Zellen.

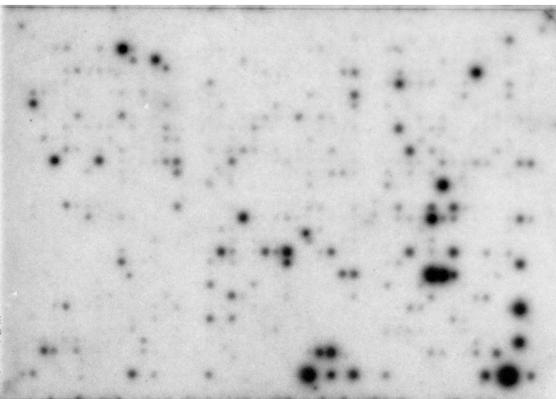


Abb. 8.9 Autoradiographie des Expressionsarrays der mit EC90 (32 µg/ml) behandelten MM6-Zellen. Jeder Punkt entspricht einem Gen. Dieses Muster entspricht der Genaktivität der mit EC90 behandelten Zellen.

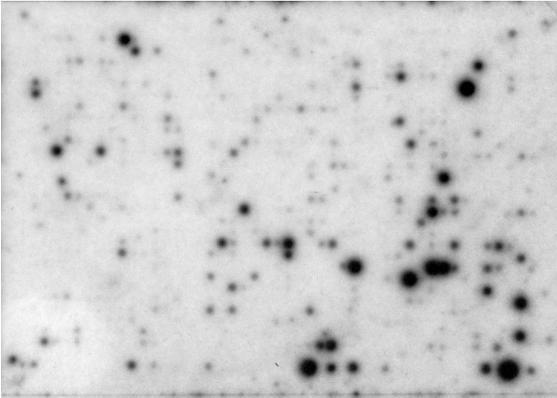


Abb. 8.10 Autoradiographie des Expressionsarrays der mit EC90 (32 µg/ml) und nachfolgend mit LPS (1 µg/ml) behandelten MM6-Zellen. Jeder Punkt entspricht einem Gen.

| Gene / Proteine | LPS (Versuch EC90) | Expressionsänderung [%] |
|--|--------------------|-------------------------|
| Macrophage inflammatory protein 2 alpha (MIP2-alpha); growth-regulated protein beta (GRO-beta) | | 4205800 |
| Macrophage inflammatory protein 1 beta precursor (MIP1-beta); T-cell activation protein 2 (AT2); PAT 744; H400; SIS-gamma; lymphocyte activation gene 1 protein (LAG 1); HC21; small inducible cytokine A4 (SCYA4); G 26 T-lymphocyte secreted protein | | 1375738 |
| Tumor necrosis factor precursor (TNF-alpha; TNFA); cachectin | | 4899 |
| Macrophage inflammatory protein 1 alpha precursor (MIP1-alpha); tonsillar lymphocyte LD78 alpha protein; G0S19-1 protein; PAT 464.2; SIS-beta; small inducible cytokine A3 (SCYA3) | | 4459 |
| Corticotropin releasing factor receptor 1 precursor (CRF-R; CRF1) | | 3601 |
| Interleukin-8 precursor (IL-8); monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF); T-cell chemotactic factor; neutrophil-activating protein 1 (NAP1); lymphocyte-derived neutrophil-activating factor (LYNAP); protein 3-10C | | 1692 |
| Intercellular adhesion molecule-1 precursor (ICAM1); major group rhinovirus receptor; CD54 antigen | | 1605 |
| Interleukin-1 beta precursor (IL-1 ; IL1B); catabolin | | 1493 |
| IEX-1L anti-death protein; PRG-1; DIF-2 | | 1297 |
| Placenta growth factors 1 + 2 (PLGF1 + PLGF2) | | 525 |
| B94 protein | | 251 |
| C-jun proto-oncogene; transcription factor AP-1 | | 207 |
| Monocyte chemotactic protein 1 precursor (MCP1); monocyte chemotactic and activating factor (MCAF); monocyte secretory protein JE; monocyte chemoattractant protein 1; HC11; small inducible cytokine A2 (SCYA2) | | 134 |
| NADH-ubiquinone oxidoreductase B18 subunit; complex I-B18 (CI-B18); cell adhesion protein SQM1 | | 115 |
| T-cell-specific rantes protein precursor; sis delta; small inducible cytokine A5 (SCYA5); rantes pro-inflammatory cytokine | | 96 |
| Alpha1 catenin (CTNNA1); cadherin-associated protein; alpha E-catenin | | 72 |
| Cytosolic superoxide dismutase 1 (SOD1) | | 40 |
| Heat shock cognate 71-kDa protein | | 30 |

| Gene / Proteine | LPS (Versuch EC90) | Expressionsänderung [%] |
|---|--------------------|-------------------------|
| Defender against cell death 1 (DAD1) | | 14 |
| C-myc oncogene | | -93 |
| CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP alpha) | | -82 |
| Prothymosin alpha (ProT-alpha; PTMA) | | -78 |
| Activator 1 37-kDa subunit; replication factor C 37-kDa subunit (RFC37); RFC4 | | -78 |
| Glutathione S-transferase pi (GSTP1; GST3) | | -76 |
| Microsomal glutathione S-transferase 12 (GST12; MGST1) | | -73 |
| Nuclease-sensitive element DNA-binding protein (NSEP) | | -72 |
| Guanine nucleotide-binding protein G-s alpha subunit (GNAS); adenylate cyclase-stimulating G alpha protein | | -69 |
| Rho GDP dissociation inhibitor 1 (RHO-GDI 1); RHO-GDI alpha (GDI1); ARHGDI1 | | -69 |
| Stromal cell derived factor 1 receptor (SDF1 receptor); fusin; CXCR4; leukocyte-derived seven transmembrane domain receptor (Lestr); LCR1 | | -65 |
| Serine/threonine-protein kinase PLK1 (STPK13) | | -60 |
| Estrogen receptor hSNF2b; global transcription activator SNF2L4; brg-1 protein; mitotic growth and transcription activator; brahma protein homolog 1 | | -60 |
| C-myc purine-binding transcription factor puf; nucleoside diphosphate kinase B (NDP kinase B; NDKB) + nm23-H2S | | -59 |
| MutL protein homolog; DNA mismatch repair protein MLH1; COCA2 | | -57 |
| B-myb | | -56 |
| 27-kDa heat-shock protein (HSP27); stress-responsive protein 27 (SRP27); estrogen-regulated 24-kDa protein; HSPB1 | | -55 |
| Transforming protein rhoA H12 (RHO12; ARH12; ARHA) | | -54 |
| Mitochondrial matrix protein P1 precursor; p60 lymphocyte protein; chaperonin homolog; HUCHA60; heat shock protein 60 (HSP-60); HSPD1 | | -53 |
| Cathepsin D precursor (CTSD) | | -53 |
| Helix-loop-helix protein; DNA-binding protein inhibitor Id-2 | | -49 |
| Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor (CDK4I; CDKN2); p16-INK4; multiple tumor suppressor 1 (MTS1) | | -49 |
| 60S ribosomal protein L6 (RPL6); TAX-responsive enhancer element binding protein 107 (TAXREB107); neoplasm-related protein C140 | | -45 |
| p55CDC | | -45 |
| HHR23A; UV excision repair protein protein RAD23A | | -44 |
| Natural killer cell enhancing factor (NKEFB) + thiol-specific antioxidant protein (TSA); thioredoxin peroxidase 1 (TDPX1); thioredoxin-dependent peroxide reductase 1 | | -43 |
| Nucleobindin precursor (NUC) | | -42 |
| Thymosin beta 4; FX | | -40 |
| Myeloblastin precursor (MBN); leukocyte proteinase 3 (PRTN3; PR3); AGP7; Wegener's autoantigen; p29; c-anca antigen | | -39 |
| Glutathione S-transferase theta 1 (GSTT1) | | -37 |
| Cellular nucleic acid binding protein (CNBP); sterol regulatory element-binding protein | | -37 |
| Glutathione reductase (GRase; GSR; GR) | | -36 |
| Thymosin beta 4; FX | | -34 |
| Serine/threonine protein phosphatase PP1-alpha 1 catalytic subunit (PP-1A) | | -32 |
| Zinc finger protein 91 (ZNF92); HPF7; HTF10 | | -31 |
| High mobility group protein (HMG-I) | | -30 |

8. ANHANG

| Gene / Proteine | LPS (Versuch EC90) | Expressionsänderung [%] |
|--|--------------------|-------------------------|
| Ribosomal protein S6 kinase II alpha 1 (S6KII-alpha 1); ribosomal S6 kinase 1 (RSK1) | | -29 |
| Proliferating cyclic nuclear antigen (PCNA); cyclin | | -29 |
| Platelet-derived growth factor A subunit precursor (PDGFA; PDGF1) | | -28 |
| Migration inhibitory factor-related protein 14 (MRP14); calgranulin B; leukocyte L1 complex heavy subunit; S100 calcium-binding protein A9 | | -25 |
| Erythrocyte urea transporter (UTE; UT1); SLC14A1; HUT11; RACH1 | | -25 |
| Calcium-dependent protease small (regulatory) subunit; calpain; calcium-activated neutral proteinase (CANP) | | -23 |
| Granulocyte colony stimulating factor receptor precursor (GCSF-R); CD114 antigen | | -23 |

Tab. 8.6 Inkubation von MM6-Zellen mit LPS (1 µg/ml). Auflistung aller vom Computerprogramm in der Expression im Vergleich zur Negativkontrolle als verändert detektierten Gene.

| Gene / Proteine | EC90 (Versuch EC90) | Expressionsänderung [%] |
|--|---------------------|-------------------------|
| I-rel (RELB) | | 2635 |
| Neuromodulin; axonal membrane protein GAP-43; PP46; protein F1; calmodulin-binding protein p57 | | 1697 |
| Cot proto-oncogene | | 780 |
| Alpha1 catenin (CTNNA1); cadherin-associated protein; alpha E-catenin | | 222 |
| 40S ribosomal protein S19 (RPS19) | | 45 |
| Cellular nucleic acid binding protein (CNBP); sterol regulatory element-binding protein | | 37 |
| Nuclease-sensitive element DNA-binding protein (NSEP) | | -52 |
| Activator 1 37-kDa subunit; replication factor C 37-kDa subunit (RFC37); RFC4 | | -42 |
| Tumor necrosis factor precursor (TNF-alpha; TNFA); cachectin | | -42 |
| Thymosin beta 4; FX | | -36 |
| C-myc oncogene | | -35 |
| Tripeptidyl-peptidase I precursor; tripeptidyl aminopeptidase; lysosomal peptstatin-insensitive protease (LPIC) | | -34 |
| Rho GDP dissociation inhibitor 1 (RHO-GDI 1); RHO-GDI alpha (GDIA1); ARHGDI A | | -33 |
| 27-kDa heat-shock protein (HSP27); stress-responsive protein 27 (SRP27); estrogen-regulated 24-kDa protein; HSPB1 | | -33 |
| Glutathione S-transferase pi (GSTP1; GST3) | | -27 |
| C-myc purine-binding transcription factor puf; nucleoside diphosphate kinase B (NDP kinase B; NDKB) + nm23-H2S | | -25 |
| Migration inhibitory factor-related protein 8 (MRP8); calgranulin A; leukocyte L1 complex light subunit; S100 calcium-binding protein A8; cystic fibrosis antigen (CFAG) | | -20 |
| Thymosin beta-10 (TMSB10; THYB10); PTMB10 | | -17 |
| Prothymosin alpha (ProT-alpha; PTMA) | | -13 |
| Platelet-derived growth factor A subunit precursor (PDGFA; PDGF1) | | -13 |
| Microsomal glutathione S-transferase 12 (GST12; MGST1) | | -12 |

Tab. 8.7 Inkubation von MM6-Zellen mit EC90 (32 µg/ml). Auflistung aller vom Computerprogramm in der Expression im Vergleich zur Negativkontrolle als verändert detektierten Gene.

| Gene / Proteine | EC90 + LPS (Versuch EC90) | Expressionsänderung [%] |
|--|---------------------------|-------------------------|
| Macrophage inflammatory protein 2 alpha (MIP2-alpha); growth-regulated protein beta (GRO-beta) | | 3996800 |
| Macrophage inflammatory protein 1 beta precursor (MIP1-beta); T-cell activation protein 2 (AT2); PAT 744; H400; SIS-gamma; lymphocyte activation gene 1 protein (LAG 1); HC21; small inducible cytokine A4 (SCYA4); G 26 T-lymphocyte secreted protein | | 906900 |
| Macrophage inflammatory protein 1 alpha precursor (MIP1-alpha); tonsillar lymphocyte LD78 alpha protein; G0S19-1 protein; PAT 464.2; SIS-beta; small inducible cytokine A3 (SCYA3) | | 5102 |
| Tumor necrosis factor precursor (TNF-alpha; TNFA); cachectin | | 5064 |
| Corticotropin releasing factor receptor 1 precursor (CRF-R; CRF1) | | 3500 |
| Intercellular adhesion molecule-1 precursor (ICAM1); major group rhinovirus receptor; CD54 antigen | | 2028 |
| IEX-1L anti-death protein; PRG-1; DIF-2 | | 1530 |
| Interleukin-8 precursor (IL-8); monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF); T-cell chemotactic factor; neutrophil-activating protein 1 (NAP1); lymphocyte-derived neutrophil-activating factor (LYNAP); protein 3-10C | | 1283 |
| Interleukin-1 beta precursor (IL-1 ; IL1B); catabolin | | 844 |
| Placenta growth factors 1 + 2 (PLGF1 + PLGF2) | | 503 |
| B94 protein | | 420 |
| C-jun proto-oncogene; transcription factor AP-1 | | 213 |
| T-cell-specific rantes protein precursor; sis delta; small inducible cytokine A5 (SCYA5); rantes pro-inflammatory cytokine | | 177 |
| NADH-ubiquinone oxidoreductase B18 subunit; complex I-B18 (CI-B18); cell adhesion protein SQM1 | | 117 |
| Alpha1 catenin (CTNNA1); cadherin-associated protein; alpha E-catenin | | 116 |
| 40S ribosomal protein S19 (RPS19) | | 76 |
| Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor (CDK4I; CDKN2); p16-INK4; multiple tumor suppressor 1 (MTS1) | | 53 |
| Monocyte chemotactic protein 1 precursor (MCP1); monocyte chemotactic and activating factor (MCAF); monocyte secretory protein JE; monocyte chemoattractant protein 1; HC11; small inducible cytokine A2 (SCYA2) | | 41 |
| Nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit; nuclear factor NF-kappa-B p52 subunit; H2TF1; oncogene lyt-10 | | 39 |
| Cytosolic superoxide dismutase 1 (SOD1) | | 28 |
| C-myc purine-binding transcription factor puf; nucleoside diphosphate kinase B (NDP kinase B; NDKB) + nm23-H2S | | 25 |
| RCL growth-related c-myc-responsive gene | | 22 |
| Rho GDP dissociation inhibitor 1 (RHO-GDI 1); RHO-GDI alpha (GDIA1); ARHGDI A | | 20 |
| High mobility group protein (HMG-I) | | 16 |
| Prothymosin alpha (ProT-alpha; PTMA) | | 11 |
| C-myc oncogene | | -92 |
| Activator 1 37-kDa subunit; replication factor C 37-kDa subunit (RFC37); RFC4 | | -91 |
| Estrogen receptor hSNF2b; global transcription activator SNF2L4; brg-1 protein; mitotic growth and transcription activator; brahma protein homolog 1 | | -80 |
| CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP alpha) | | -78 |
| Cellular nucleic acid binding protein (CNBP); sterol regulatory element-binding protein | | -73 |

| Gene / Proteine | EC90 + LPS (Versuch EC90) | Expressionsänderung [%] |
|--|---------------------------|-------------------------|
| Nuclease-sensitive element DNA-binding protein (NSEP) | | -57 |
| Serine/threonine-protein kinase PLK1 (STPK13) | | -55 |
| Mitochondrial matrix protein P1 precursor; p60 lymphocyte protein; chaperonin homolog; HUCHA60; heat shock protein 60 (HSP-60); HSPD1 | | -47 |
| Platelet-derived growth factor A subunit precursor (PDGFA; PDGF1) | | -39 |
| Serine/threonine-protein kinase PLK1 (STPK13) | | -38 |
| 60S ribosomal protein L6 (RPL6); TAX-responsive enhancer element binding protein 107 (TAXREB107); neoplasm-related protein C140 | | -36 |
| Helix-loop-helix protein; DNA-binding protein inhibitor Id-2 | | -35 |
| p55CDC | | -32 |
| Glutathione S-transferase pi (GSTP1; GST3) | | -27 |
| Microsomal glutathione S-transferase 12 (GST12; MGST1) | | -25 |
| Tripeptidyl-peptidase I precursor; tripeptidyl aminopeptidase; lysosomal peptstatin-insensitive protease (LPIC) | | -24 |
| Brain-specific tubulin alpha 1 subunit (TUBA1) | | -22 |
| 23-kDa highly basic protein; 60S ribosomal protein L13A (RPL13A) | | -20 |
| Liver glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) | | -20 |
| Migration inhibitory factor-related protein 14 (MRP14); calgranulin B; leukocyte L1 complex heavy subunit; S100 calcium-binding protein A9 | | -20 |
| Neuroleukin (NLK); glucose-6-phosphate isomerase (GPI); phosphoglucose isomerase (PGI); phosphohexose isomerase (PHI) | | -17 |
| Thymosin beta 4; FX | | -15 |
| Migration inhibitory factor-related protein 8 (MRP8); calgranulin A; leukocyte L1 complex light subunit; S100 calcium-binding protein A8; cystic fibrosis antigen (CFAG) | | -13 |

Tab. 8.8 Inkubation von MM6-Zellen mit EC90 (32 µg/ml) und LPS (1 µg/ml). Auflistung aller vom Computerprogramm in der Expression im Vergleich zur Negativkontrolle als verändert detektierten Gene.

Standard-Diesel-Ruß (SDR)

Abb. 8.11 bis 8.14 zeigt die Autoradiographien der Inkubationen von MM6-Zellen mit SDR (Negativkontrolle, LPS, SDR, SDR + LPS). Die Gesamtübersicht der in den Experimenten mit SDR in der Expression veränderten Gene listen die Tab. 8.9 bis 8.11 auf.

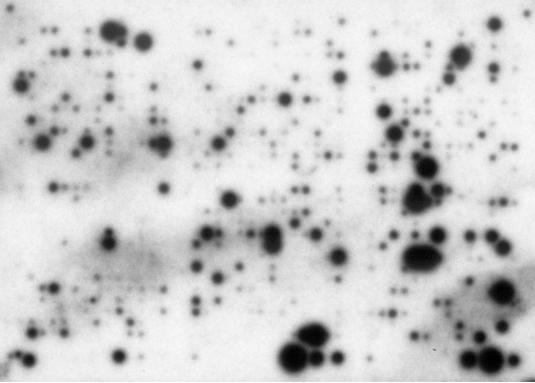


Abb. 8.11 Autoradiographie des Expressionsarrays der unbehandelten MM6-Zellen (Negativkontrolle). Jeder Punkt entspricht einem Gen. Dieses Muster entspricht der Genaktivität der Zellen im unbehandelten Zustand.

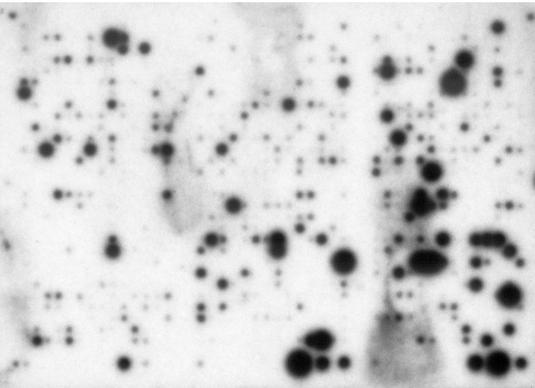


Abb. 8.12 Autoradiographie des Expressionsarrays der mit LPS (1µg/ml) behandelten MM6-Zellen. Jeder Punkt entspricht einem Gen. Dieses Muster entspricht der Genaktivität der mit LPS behandelten Zellen.

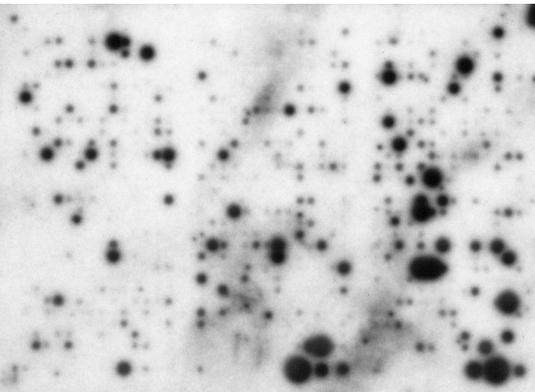


Abb. 8.13 Autoradiographie des Expressionsarrays der mit SDR (32 µg/ml) behandelten MM6-Zellen. Jeder Punkt entspricht einem Gen. Dieses Muster entspricht der Genaktivität der mit SDR behandelten Zellen.

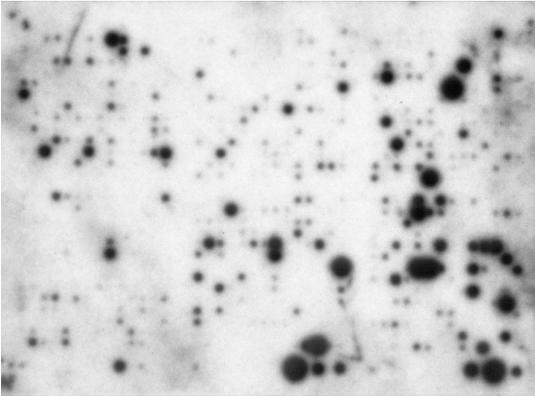


Abb. 8.14 Autoradiographie des Expressionsarrays der mit SDR (32 µg/ml) und nachfolgend mit LPS (1 µg/ml) behandelten MM6-Zellen. Jeder Punkt entspricht einem Gen.

| Gene / Proteine LPS (Versuch SDR) | Expressionsänderung [%] |
|--|-------------------------|
| Macrophage inflammatory protein 1 beta precursor (MIP1-beta); T-cell activation protein 2 (AT2); PAT 744; H400; SIS-gamma; lymphocyte activation gene 1 protein (LAG 1); HC21; small inducible cytokine A4 (SCYA4); G 26 T-lymphocyte secreted protein | 3063700 |
| IEX-1L anti-death protein; PRG-1; DIF-2 | 1347000 |
| Macrophage inflammatory protein 2 alpha (MIP2-alpha); growth-regulated protein beta (GRO-beta) | 3880 |
| Tumor necrosis factor precursor (TNF-alpha; TNFA); cachectin | 3270 |
| Intercellular adhesion molecule-1 precursor (ICAM1); major group rhinovirus | 1280 |
| Interleukin-8 precursor (IL-8); monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF); T-cell chemotactic factor; neutrophil-activating protein 1 (NAP1); lymphocyte-derived neutrophil-activating factor (LYNAP); protein 3-10C | 643 |
| Macrophage inflammatory protein 1 alpha precursor (MIP1-alpha); tonsillar lymphocyte LD78 alpha protein; G0S19-1 protein; PAT 464.2; SIS-beta; small inducible cytokine A3 (SCYA3) | 584 |
| Tumor necrosis factor-inducible protein TSG-6; hyaluronate-binding protein | 381 |
| B94 protein | 249 |
| Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) beta subunit 1 (GNB1); transducin beta-1 subunit | 200 |
| Placenta growth factors 1 + 2 (PLGF1 + PLGF2) | 196 |
| Cell surface glycoprotein mac-1 alpha subunit precursor; CD11B antigen; leukocyte adhesion receptor MO1; integrin alpha M (ITGAM); neutrophil adherence receptor alpha M subunit; CR3A | 176 |
| Corticotropin releasing factor receptor 1 precursor (CRF-R; CRF1) | 157 |
| CD27 ligand (CD27LG); CD70 antigen | 109 |
| Proteasome component C3; macropain subunit C3; multicatalytic endopeptidase complex subunit C3 | 107 |
| Ink adaptor protein | 103 |
| Interleukin-1 beta precursor (IL-1 ; IL1B); catabolin | 92 |
| TRRAP protein | 69 |
| T-cell-specific rantes protein precursor; sis delta; small inducible cytokine A5 (SCYA5); rantes pro-inflammatory cytokine | 60 |

| Gene / Proteine LPS (Versuch SDR) | Expressionsänderung [%] |
|--|-------------------------|
| Vascular endothelial growth factor precursor (VEGF); vascular permeability factor (VPF) | 59 |
| Replication factor C 38-kDa subunit (RFC38); activator 1 38-kDa subunit | 53 |
| Heat shock cognate 71-kDa protein | 50 |
| Proteasome component C5; macropain subunit C5; proteasome gamma subunit; multicatalytic endopeptidase complex subunit C5 | 37 |
| C-jun proto-oncogene; transcription factor AP-1 | 33 |
| Hepatoma-derived growth factor (HDGF) | 32 |
| Macrophage-specific colony-stimulating factor (CSF-1; MCSF) | 31 |
| PCAF-associated factor 65 alpha | -100 |
| Endothelial transcription factor GATA2 | -87 |
| CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP alpha) | -86 |
| Erythrocyte glucose transporter 1 (GLUT1) | -72 |
| Serine/threonine-protein kinase PLK1 (STPK13) | -59 |
| Ini1 | -58 |
| CCAAT transcription binding factor gamma subunit | -53 |
| Sodium/hydrogen exchanger 1 (Na+/H+ exchanger 1; NHE1); amiloride-sensitive Na+/H+ antiporter | -52 |
| Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor D (CDKN2D); p19-INK4D | -51 |
| C-myc oncogene | -51 |
| CCAAT-binding transcription factor subunit B (CBF-B); NF-Y protein subunit A (NF-YA); Hap2; CCAAT-box DNA-binding protein subunit A | -51 |
| Cell division protein kinase 5 (CDK5); tau protein kinase II catalytic subunit (TPKII catalytic subunit); serine/threonine protein kinase PSSALRE | -50 |
| G1/S-specific cyclin D3 (CCND3) | -49 |
| Fibronectin receptor alpha subunit (FNRA); integrin alpha 5 (ITGA5); VLA5; CD49E antigen | -49 |
| Estrogen receptor hSNF2b; global transcription activator SNF2L4; brg-1 protein; mitotic growth and transcription activator; brahma protein homolog 1 | -44 |
| Myeloid cell surface CD33 antigen precursor | -43 |
| DNA-binding protein TAXREB302; albumin D box-binding protein (DBP) | -41 |
| Activator 1 37-kDa subunit; replication factor C 37-kDa subunit (RFC37); RFC4 | -41 |
| Glutathione S-transferase theta 1 (GSTT1) | -39 |
| Heat shock factor protein 1 (HSF1); heat shock transcription factor 1 (HSTF1); TCF5 | -36 |
| Ubiquitin-conjugating enzyme E2 H10; ubiquitin-protein ligase; ubiquitin carrier protein | -36 |
| Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15; PC4 | -34 |

Tab. 8.9 Inkubation von MM6-Zellen mit LPS (1 µg/ml). Auflistung aller vom Computerprogramm in der Expression im Vergleich zur Negativkontrolle als verändert detektierten Gene.

| Gene / Proteine SDR (Versuch SDR) | Expressionsänderung [%] |
|--|-------------------------|
| Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP; PPOL); ADPRT; NAD+ ADP-ribosyltransferase; poly(ADP-ribose) synthetase | 2930400 |
| Complement component 5 (C5) | 1395000 |
| Activin type I receptor; serine/threonine-protein kinase receptor R2 (SKR2); activin receptor-like kinase 4 (ALK4) | 9006 |
| Excision repair protein ERCC6; Cockayne syndrome protein CSB | 6554 |
| P2X purinoceptor 1; ATP receptor P2X1 | 1875 |

8. ANHANG

| Gene / Proteine | SDR (Versuch SDR) | Expressionsänderung [%] |
|---|-------------------|-------------------------|
| Alpha-1-antichymotrypsin precursor (ACT) | | 1441 |
| Proteasome component C2; macropain subunit C2; proteasome nu subunit; multicatalytic endopeptidase complex subunit C2; 30-kDa prosomal protein (PROS30) | | 861 |
| MSX-1 homeobox protein; HOX7 | | 763 |
| Ink adaptor protein | | 598 |
| Myeloid cell surface CD33 antigen precursor | | 423 |
| Ets transcription factor; NERF2 | | 383 |
| Muscle cadherin precursor (M-cadherin); cadherin 14 or15 (CDH14 or CDH15) | | 327 |
| Proteasome component C3; macropain subunit C3; multicatalytic endopeptidase complex subunit C3 | | 200 |
| Thrombomodulin precursor (THBD; THRM); fetomodulin; CD141 antigen | | 145 |
| TRRAP protein | | 117 |
| MAPKAP kinase (3pK) | | 85 |
| Replication factor C 38-kDa subunit (RFC38); activator 1 38-kDa subunit | | 71 |
| Xeroderma pigmentosum group G complementing protein (XPG); DNA excision repair protein ERCC5 | | 44 |
| PCAF-associated factor 65 alpha | | -98 |
| Endothelial transcription factor GATA2 | | -71 |
| Leukocyte elastase inhibitor (LEI); monocyte/neutrophil elastase inhibitor) (EI) | | -64 |
| Major prion protein precursor (PRP); PRP27-30; PRP33-35C; ASCR | | -63 |
| Cytosolic superoxide dismutase 1 (SOD1) | | -62 |
| Vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1); tyrosine-protein kinase receptor flt + soluble VEGFR; tyrosine-protein kinase receptor SFLT | | -59 |
| Interleukin-5 precursor (IL-5); T-cell replacing factor (TRF); eosinophil differentiation factor; B-cell differentiation factor I | | -50 |
| DNA excision repair protein ERCC1 | | -50 |
| Glutathione synthetase (GSH synthetase; GSH-S); glutathione synthase | | -48 |
| Parathymosin | | -44 |
| Cathepsin H precursor | | -43 |
| Interleukin-6 precursor (IL-6); B-cell stimulatory factor 2 (BSF2); interferon beta-2 (IFNB2); hybridoma growth factor | | -37 |
| Serine/threonine-protein kinase PLK1 (STPK13) | | -37 |
| Transcription factor ETR101 | | -36 |
| Protein kinase MLK-3; sprk | | -33 |
| Ubiquitin-conjugating enzyme E2 H10; ubiquitin-protein ligase; ubiquitin carrier protein | | -33 |
| Glutathione S-transferase theta 1 (GSTT1) | | -24 |

Tab. 8.10 Inkubation von MM6-Zellen mit SDR (32 µg/ml). Auflistung aller vom Computerprogramm in der Expression im Vergleich zur Negativkontrolle als verändert detektierten Gene.

| Gene / Proteine | SDR + LPS (Versuch SDR) | Expressionsänderung [%] |
|--|-------------------------|-------------------------|
| Macrophage inflammatory protein 1 beta precursor (MIP1-beta); T-cell activation protein 2 (AT2); PAT 744; H400; SIS-gamma; lymphocyte activation gene 1 protein (LAG 1); HC21; small inducible cytokine A4 (SCYA4); G 26 T-lymphocyte secreted protein | | 2980500 |
| IEX-1L anti-death protein; PRG-1; DIF-2 | | 2036300 |
| Macrophage inflammatory protein 2 alpha (MIP2-alpha); growth-regulated protein beta (GRO-beta) | | 4157 |

| Gene / Proteine | SDR + LPS (Versuch SDR) | Expressionsänderung [%] |
|---|-------------------------|-------------------------|
| Intercellular adhesion molecule-1 precursor (ICAM1); major group rhinovirus receptor; CD54 antigen | | 1428 |
| Interleukin-8 precursor (IL-8); monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF); T-cell chemotactic factor; neutrophil-activating protein 1 (NAP1); lymphocyte-derived neutrophil-activating factor (LYNAP); protein 3-10C | | 1270 |
| Macrophage inflammatory protein 1 alpha precursor (MIP1-alpha); tonsillar lymphocyte LD78 alpha protein; G0S19-1 protein; PAT 464.2; SIS-beta; small inducible cytokine A3 (SCYA3) | | 610 |
| Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) beta subunit 1 (GNB1); transducin beta-1 subunit | | 441 |
| Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein (VHL) | | 397 |
| Dioxin-inducible cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) | | 324 |
| Placenta growth factors 1 + 2 (PLGF1 + PLGF2) | | 228 |
| Corticotropin releasing factor receptor 1 precursor (CRF-R; CRF1) | | 212 |
| CD27 ligand (CD27LG); CD70 antigen | | 147 |
| B94 protein | | 114 |
| Interleukin-1 beta precursor (IL-1 ; IL1B); catabolin | | 99 |
| B-cell lymphoma 3-encoded protein (bcl-3) | | 95 |
| Tumor necrosis factor precursor (TNF-alpha; TNFA); cachectin | | 56 |
| C-jun proto-oncogene; transcription factor AP-1 | | 34 |
| Protein kinase C substrate 80-kDa protein heavy chain (PKC β); 80K-H protein | | 33 |
| Neuroleukin (NLK); glucose-6-phosphate isomerase (GPI); phosphoglucose isomerase (PGI); phosphohexose isomerase (PHI) | | 26 |
| PCAF-associated factor 65 alpha | | -96 |
| CCAAT transcription binding factor gamma subunit | | -75 |
| Stromal cell derived factor 1 receptor (SDF1 receptor); fusin; CXCR4; leukocyte-derived seven transmembrane domain receptor (LESTR); LCR1 | | -73 |
| Serine/threonine-protein kinase PLK1 (STPK13) | | -70 |
| CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP alpha) | | -70 |
| Protein kinase MLK-3; sprk | | -67 |
| Erythrocyte glucose transporter 1 (GLUT1) | | -66 |
| Ubiquitin-conjugating enzyme E2 H10; ubiquitin-protein ligase; ubiquitin carrier protein | | -63 |
| Proteasome component C5; macropain subunit C5; proteasome gamma subunit; multicatalytic endopeptidase complex subunit C5 | | -60 |
| MCM7 DNA replication licensing factor; CDC47 homolog; p1.1-MCM3 | | -59 |
| DNA-binding protein TAXREB302; albumin D box-binding protein (DBP) | | -58 |
| Cyclin-dependent kinase regulatory subunit 1 (CKS1) | | -58 |
| Rac-alpha serine/threonine kinase (rac-PK-alpha); protein kinase B (PKB); c-akt; akt1 | | -57 |
| DNA excision repair protein ERCC1 | | -57 |
| Heat shock factor protein 1 (HSF1); heat shock transcription factor 1 (HSTF1); TCF5 | | -55 |
| C-myc oncogene | | -50 |
| MCM5 DNA replication licensing factor; CDC46 homolog | | -50 |
| Estrogen receptor hSNF2b; global transcription activator SNF2L4; brg-1 protein; mitotic growth and transcription activator; brahma protein homolog 1 | | -52 |
| Heat-shock protein 40 (HSP40) | | -52 |
| 60S ribosomal protein L6 (RPL6); TAX-responsive enhancer element binding protein 107 (TAXREB107); neoplasm-related protein C140 | | -49 |
| Signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6); IL-4 STAT | | -48 |

8. ANHANG

| Gene / Proteine SDR + LPS (Versuch SDR) | Expressionsänderung [%] |
|--|-------------------------|
| HHR23A; UV excision repair protein protein RAD23A | -47 |
| Helix-loop-helix protein; DNA-binding protein inhibitor Id-2 | -47 |
| p55CDC | -45 |
| MCM2 DNA replication licensing factor; nuclear protein BM28; KIAA0030 | -45 |
| Parathymosin | -45 |
| Ribosomal protein S6 kinase II alpha 1 (S6KII-alpha 1); ribosomal S6 kinase 1 (RSK1) | -41 |
| Thymosin beta 4; FX | -37 |
| 70-kDa heat shock protein 1 (HSP70.1; HSPA1) | -28 |
| MAP kinase-activated protein kinase 2 (MAPKAP kinase 2; MAPKAPK-2) | -25 |

Tab. 8.11 Inkubation von MM6-Zellen mit SDR (32 µg/ml) und LPS (1 µg/ml). Auflistung aller vom Computerprogramm in der Expression im Vergleich zur Negativkontrolle als verändert detektierten Gene.