

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Lehrstuhl für Physiologie

Genexpression in Monozyten und Makrophagen:
Kleine Sputummakrophagen bei COPD und Einfluss von ultra-feinen
Partikeln

Christiane M. S. Eder

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

Doktors für Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. S. Scherer
Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. M. Pfaffl
2. apl. Prof. Dr. L. Ziegler-Heitbrock,
Ludwig-Maximilians-Universität München
3. Univ.-Prof. Dr. H. H. D. Meyer

Die Dissertation wurde am 15.12.2008 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 05.05.2009
angenommen.

Für Oma und Opa

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
A Einleitung.....	3
A.1 Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)	3
A.2 Anatomie der Lunge	5
A.3 Partikel.....	6
A.3.1 Zusammensetzung von Feinstaub.....	6
A.3.2 Deposition im Körper	9
A.4 Abwehrmechanismen der Lunge	10
A.4.1 Immunologische Mechanismen	10
A.4.1.1 Phagozytose durch Makrophagen.....	10
A.4.1.2 Inflammatorische Reaktionen bei COPD	11
A.4.1.3 Die Rolle der Zytokine, Chemokine und Proteasen.....	13
A.4.2 Entgiftungsreaktionen	14
A.4.2.1 Die Monooxygenasen.....	15
A.4.2.2 Cytochrom-Familie P450 1	16
A.4.2.3 Cytochrom P450 1B1	17
A.5 Ziel der Arbeit	18
B Material und Methoden.....	19
B.1 Material.....	19
B.1.1 Reagenzien	19
B.1.2 Lösungen und Medien	22
B.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	24
B.1.4 Antikörper und Isotyp-Kontrollen.....	25
B.1.5 Partikel.....	26
B.1.6 Oligonukleotide	26
B.1.7 Geräte.....	29
B.2 Methoden.....	31
B.2.1 Zellkultur	31
B.2.1.1 Bestimmung der Zellzahl	31
B.2.1.2 Mono Mac 6.....	31
B.2.1.3 A549 und Calu-3	32

B.2.2	Arbeiten mit primären Zellen.....	32
B.2.2.1	Isolierung von PBMC (peripheral blood mononuclear cells)..	32
B.2.2.2	MACS (magnetic cell sorting) Isolierung	33
B.2.2.3	Herstellung von MDM (monocyte derived macrophages) und unreifen dendritischen Zellen (DC) durch in vitro Kultur .	34
B.2.2.4	Gewinnung von induziertem Sputum und Isolierung von Sputummakrophagen	35
B.2.2.5	Gewinnung von Bronchialepithelzellen.....	36
B.2.2.6	Anfertigen von Zytospins	37
B.2.2.7	Stimulation.....	37
B.2.2.7.1	Partikel und Lipopolysaccharid (LPS)	37
B.2.2.7.2	Lipophile Substanzen.....	38
B.2.2.8	Lysate.....	38
B.2.2.9	Durchflusszytometrie mit dem FACS (Durchflusszytometer).	39
B.2.3	Molekularbiologische Methoden	40
B.2.3.1	Isolierung von mRNA	40
B.2.3.2	Konzentrationsbestimmung der RNA	40
B.2.3.3	Reverse Transkription (RT)	41
B.2.3.4	Real-time-PCR	42
B.2.3.5	Gelelektrophorese	44
B.2.3.6	Auswertung der LC-PCR Ergebnisse	44
B.2.3.7	Analyse der mRNA-Stabilität von CYP1B1 mit Hilfe von ActinomycinD	45
B.2.4	Proteinnachweis	45
B.2.4.1	Isolierung von Mikrosomen.....	45
B.2.4.2	Messung des Proteingehalts	46
B.2.4.3	Western Blot.....	46
B.2.4.4	Nachweis von CXCR4-Protein durch Durchflusszytometrie ..	47
B.2.5	Statistische Auswertung	48
C	Ergebnisse.....	49
C.1	Genexpression in Sputummakrophagen.....	49
C.1.1	Aufreinigen von Sputummakrophagen.....	49
C.1.2	Die Population der kleinen Sputummakrophagen.....	51

C.1.3	Zytokinexpression in Sputummakrophagen.....	54
C.1.4	Expression der Chemokinrezeptoren CCR5, CCR9, CXCR1 und CXCR2 in Sputummakrophagen.....	56
C.1.5	Der Chemokinrezeptor CXCR4.....	58
C.1.5.1	mRNA-Expression.....	58
C.1.5.2	Protein-Daten der FACS-Analyse.....	58
C.1.5.3	Ligand des CXCR4-Rezeptors	60
C.1.6	Weitere Genexpressionsunterschiede zwischen COPD- Patienten und gesunden Kontrollen.....	60
C.1.6.1	Matrix-Metalloproteinase 9 und ihr Inhibitor TIMP-1.....	60
C.1.6.2	Hämoxigenase1	61
C.1.6.3	Phagozytoserezeptor MARCO (macrophage receptor with collagenous structure).....	62
C.1.7	Effekt von Partikeln auf die Genexpression in Sputummakrophagen	63
C.2	Effekt von Teilchen auf die Genexpression in Monozyten und Makrophagen.....	65
C.2.1	Auswahl der Gene	65
C.2.2	CYP1B1 und 1A1 in MDM	66
C.2.3	CYP1B1 in CD14 ⁺⁺ Monozyten.....	68
C.2.4	Identifizierung der aktiven Komponente in der Partikelmischung	69
C.2.5	Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen P90-Exposition und der CYP1B1 mRNA Expression.....	70
C.2.6	Kinetik der CYP1B1 mRNA Suppression.....	72
C.2.7	Ausschluss einer LPS-Kontamination von P90.....	72
C.2.8	CYP1B1 Effekt in weiteren Zelltypen	73
C.2.9	Effekt von Benzo[a]pyren auf die CYP1B1 mRNA Expression ...	76
C.2.10	Nachweis der RNA-Stabilität mithilfe von Actinomycin D.....	77
C.2.11	CYP1B1 Expression in PBMC nach Stimulation in unter- schiedlichen Kulturgefäßen	78
C.2.12	Wirkung weiterer Partikel auf die CYP1B1 Expression.....	79
C.2.13	Effekt von P90 auf CYP1B1-Proteinebene	80

D	Diskussion	82
D.1	Genexpression in Sputummakrophagen.....	82
D.1.1	Gewinnung von Sputummakrophagen.....	82
D.1.2	Zytokinexpression in Sputummakrophagen.....	85
D.1.3	Der CXCR4-Rezeptor	88
D.1.4	Weitere COPD-relevante Genexpressionen	90
D.2	Effekt von Teilchen auf die Genexpression in Monozyten und Makrophagen.....	93
D.2.1	Veränderungen im mRNA-Expressionsmuster durch ultra- feine Partikel bei Cytochrom P450 1B1	93
D.2.2	Individuelle Variabilität in der CYP1B1 Expression.....	95
D.2.3	Aktive Komponente: ultra-feines Printex 90.....	95
D.2.4	CYP1B1 Protein nach P90 Stimulation.....	98
D.2.5	Regulation von CYP1B1 – mögliche Wirkmechanismen von P90	100
E	Zusammenfassung	104
F	Literaturverzeichnis	107
G	Abbildungsverzeichnis.....	114
H	Tabellenverzeichnis.....	118
I	Danksagung	119

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (Chronic Obstructive Pulmonary Disease)
CYP1B1	Cytochrom P450 1B1
CYP1A1	Cytochrom P450 1A1
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DTT	Dithiothreitol
EC90	Elementarer Kohlenstoff (90 steht für 90 nm Durchmesser)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescence activated cell sorter, Durchflusszytometer
FCS	fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor)
h	Stunde
IgG	Immunglobulin G
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-1 RA	Interleukin 1 Rezeptor Antagonist
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IL-10	Interleukin 10
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
KCl	Kaliumchlorid
konz	konzentriert
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
mm	Millimeter
min	Minute
MM6	Mono Mac 6 Zelllinie
MW	Mittelwert
mRNA	Messenger-RNA
P90	Printex 90 (90 steht für 90 nm Durchmesser)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphat Saline Puffer (phosphate buffer saline)
PE	Phycoerythrin
PMB	Polymyxin B
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription
RT-PCR	reverse Polymerasekettenreaktion
SD	Standardabweichung (standard deviation)
sec	Sekunde
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TiO ₂	Titandioxid
uf	ultra-fein

A Einleitung

A.1 Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (englisch **Chronic obstructive pulmonary disease**, kurz COPD), landläufig eher bekannt als „Raucherhusten“, ist ein bedeutendes und größer werdendes globales Gesundheitsproblem, dem lange Zeit von der klinischen Forschung, der Politik und der pharmazeutischen Industrie nicht genügend Beachtung geschenkt wurde (Barnes 2007). In den „Global Burden of Disease“-Studien wurde die COPD 1990 als sechsthäufigste weltweite Todesursache eingeordnet (Lopez *et al.* 2006). Aktuelle Projektionen der Weltgesundheitsorganisation sagen einen Anstieg von der derzeitigen Position vier auf Rang drei der häufigsten Todesursachen bis 2030 voraus (WHO 2008).

Die COPD ist charakterisiert durch eine Einschränkung des Atemflusses aufgrund einer irreversiblen Verengung der Atemwege. Die Verengung entsteht durch fortschreitende Verdickung der Atemwegswände, welche durch eine chronische Entzündung der großen und kleinen Atemwege und des Lungenparenchyms bedingt ist (Bronchitis). Im Verlauf der Krankheit kann Elastin im Lungenparenchymgewebe zerstört werden, woraus ein Lungenemphysem resultiert. Die Atemwege werden im Rahmen des Elastinabbaus sehr instabil und können bei der Ausatmung kollabieren. Zusätzlich werden auch eine erhöhte Schleimproduktion und -sekretion zu den Merkmalen einer COPD gezählt. Die meisten Patienten weisen alle drei Faktoren auf: chronische Bronchitis, Emphysem und Schleimüberproduktion.

COPD wird meist hervorgerufen durch inhalierte Aerosole. Als größter Risikofaktor für die Entstehung einer COPD ist nach wie vor der Konsum von Tabak anzusehen (Pauwels *et al.* 2001). 90% der COPD-Patienten haben geraucht, nicht alle Raucher aber entwickeln eine COPD. Schon 1967 wurde in einer Studie von Fletcher *et al.* (Fletcher 1976) bei 12% der moderaten Raucher und bei 26 % der starken Raucher eine COPD beobachtet. Dieses Phänomen wirft die Frage auf, ob es unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Tabakrauch gibt und inwieweit genetische Faktoren eine Rolle bei der

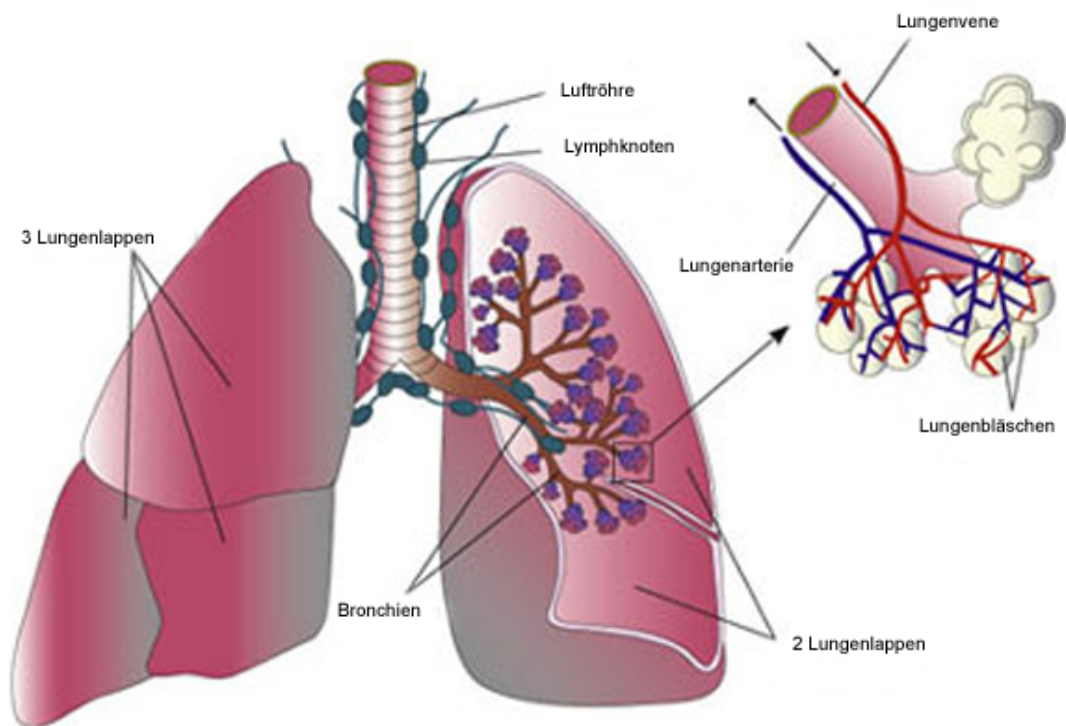
Krankheitsentstehung spielen, zumal ca. 10-15% der betroffenen Patienten nie geraucht haben. Den einzig bisher bekannten genetischen Risikofaktor stellt der α 1-Antitrypsin-Mangel dar, bei dem durch fehlende Inhibition der Elastase das Lungengewebe zerstört und so die Entstehung eines Emphysems begünstigt wird (Teramoto 2007). Diese genetische Disposition liegt bei bis zu 3% der COPD-Patienten zugrunde (Richmond and Zellner 2005).

Die Diagnosestellung einer COPD basiert auf der Durchführung einer Spirometrie, worunter man die Messung von Lungenvolumina versteht. Die Ergebnisse einer solchen Untersuchung können darüber Auskunft geben, ob eine Atemwegsobstruktion vorliegt und wenn ja, ob diese teilweise oder vollständig reversibel ist. Zu den bei der Spirometrie gemessenen Lungenvolumina zählen z.B. die Vitalkapazität (VC) oder die Einsekundenkapazität (FEV_1). Definiert ist die FEV_1 als das Volumen, das nach maximaler Inspiration durch forcierte Expiration in der ersten Sekunde ausgeatmet werden kann. Eine obstruktive Ventilationsstörung ist durch eine Verminderung des altersabhängigen Verhältnisses zwischen FEV_1 und VC festgelegt. In der Regel ist dabei auch die FEV_1 kleiner als der Normalwert. Der spirometrische Schweregrad der obstruktiven Atemflussstörung ergibt sich aus der Einschränkung der FEV_1 , ausgedrückt in Prozent des Sollwertes. Zur Differentialdiagnostik zwischen COPD und Asthma bronchiale kann ein Bronchodilatationstest durchgeführt werden: Die FEV_1 wird vor und nach der Inhalation eines schnell wirksamen β_2 -Sympathomimetikums gemessen, je höher dabei der Grad der Reversibilität ist, desto wahrscheinlicher ist die Diagnose Asthma bronchiale (Criée C.-P. 2006).

Die COPD kann bisher nur symptomatisch behandelt werden, wobei die Progression der Erkrankung verlangsamt und die Beschwerden gelindert werden sollen. Durch die Einnahme von inhalativen (oder seltener auch systemischen) β_2 -Sympathomimetika wird die Bronchialmuskulatur entspannt und die Atembeschwerden werden gemindert. Zusätzlich kann auch eine Behandlung mit Glukokortikoiden erfolgen, um eine entzündliche Schwellung zu reduzieren. COPD-Patienten profitieren auch von körperlichem Training (z.B. Atemgymnastik) oder einer Langzeitsauerstofftherapie im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung.

Die Ziele der Pharmakotherapie sind generell die Besserung der Symptome, eine Zunahme der körperlichen Leistungsfähigkeit, eine Steigerung der Lebensqualität sowie die Prävention von Exazerbationen.

A.2 Anatomie der Lunge



<http://krebshilfe.net/images/lunge.jpg>

Abbildung 1: Lungenaufbau

Die menschliche Lunge ist ein paariges Körperorgan und dient der Atmung. Sie besteht aus zwei Lungenflügeln, die links in zwei und rechts in drei Lungenlappen unterteilt sind. Die linke Lunge ist kleiner, da ihr das Herz aufliegt. Die Gesamtheit des luftleitenden Systems wird als Bronchialsystem bezeichnet. Die Trachea (Luftröhre) teilt sich in zwei Hauptbronchien auf, die sich in weiteren, immer kleiner werdenden Bronchien fortsetzen und verzweigen. Diese feinen Röhren werden Bronchiolen genannt, wenn kein Knorpel mehr in der Atemwegswand zu finden ist. Die Öffnung des Lumens

wird jetzt nur noch durch elastische Fasern gewährleistet. Die Bronchiolen teilen sich letztlich in die Ductus alveolares, an die sich das Parenchym mit den Alveolen (Lungenbläschen) anschließt. Hier findet der Gasaustausch statt. Der erwachsene Mensch besitzt ca. 300 Millionen Alveolen, die bei einer Lungenkapazität von sechs Litern eine Oberfläche von 125 m² darstellen. Die Alveolen sind mit einem Deckepithel aus Alveolarzellen ausgekleidet und in der Alveolarwand befindet sich ein dichtes Kapillarnetzwerk. Dieses Netzwerk ist eingebettet in ein feines Interstitium, das aus dem Epithel der Alveole, der gemeinsamen epithelialen und endothelialen Basallamina und dem Endothel der Kapillaren gebildet wird. Diese ca. 1,5 µm dicke Blut-Luft-Schranke ermöglicht den Gasaustausch.

Um alle Erreger und Fremdstoffe, die durch die Atmung ständig neu in die Lunge eindringen, bekämpfen zu können, befinden sich in den Atemwegen eine Vielzahl von spezialisierten Immunzellen wie die Makrophagen.

A.3 Partikel

Auch wenn das aktive Rauchen als größter Risikofaktor für COPD betrachtet wird, kann ebenso die Feinstaubbelastung in der Luft eine Rolle bei der Krankheitsentstehung spielen (van Eeden *et al.* 2005).

A.3.1 Zusammensetzung von Feinstaub

Zur Luftverschmutzung tragen Gase, Flüssigkeiten und Schwebstäube bei. Diese Schwebstäube setzen sich aus festen und flüssigen Partikel zusammen, die durch ihre sehr geringe Größe im Gas suspendiert sind.

Die luftgetragenen Partikel können aus natürlichen und anthropogenen Quellen stammen. Zu letzteren gehören hauptsächlich Verbrennungsprozesse, Verhüttung, industrielle Prozesse und Zigarettenrauch, sowie auch z.B. mechanische Prozesse wie Abrieb von Reifen und Bremsbelägen. In Entwicklungsländern stellen auch offene Feuerstellen in schlecht belüfteten Hütten einen weiteren wichtigen anthropogenen Ursprung für Partikel dar

(Smith 2000). Natürliche Staubquellen sind z.B. Bodenerosion, Sandstürme, Vulkane, maritimes Aerosol, Waldbrände und biogene Stäube wie z. B. Pollen (Brook *et al.* 2004). Diese Schwebstoffe in der Luft sind also ein komplexes Gemisch verschiedener Bestandteile, die in ihrer Größe und chemischen Zusammensetzung stark variieren. Abbildung 2 gibt eine Übersicht über die Fraktionen verschiedener Partikelgrößen, eingeteilt nach ihrem aerodynamischen Durchmesser.

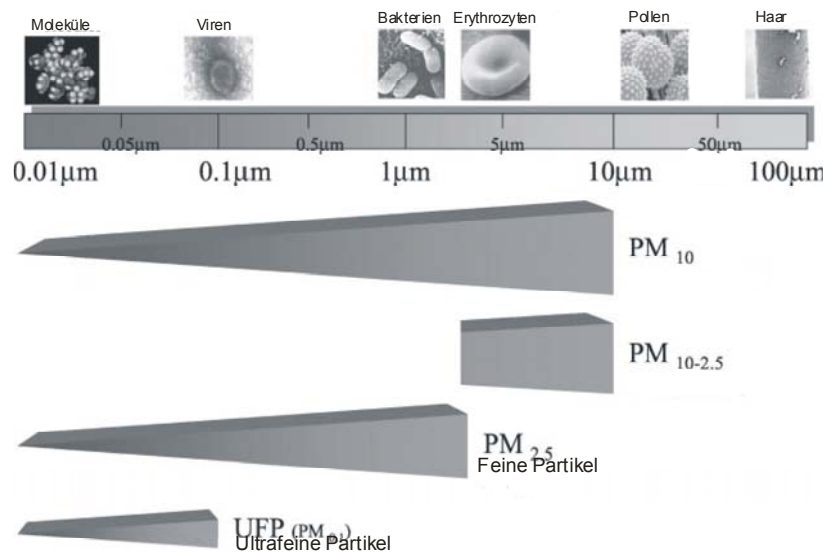


Abbildung 2: Größeneinteilung von Partikeln (modifiziert nach (Brook *et al.* 2004)); PM = particulate matter, UFP = ultra-fine particles

PM₁₀ („particulate matter“) wird der Schwebstaub mit einem Durchmesser von kleiner als 10 µm genannt. Dieser Standard wurde 1987 von der amerikanischen „Environmental Protection Agency“ (EPA) festgelegt, um gezielt die Masse der inhalierbaren Teilchen zu erfassen, die ihren Weg bis in die oberen Atemwege und die Lunge finden. 1997 gab die EPA Richtlinien zu Grenzwerten von PM_{2,5} heraus, wobei es sich um Partikel mit Durchmesser < 2,5 µm handelt, die die kleinen Atemwege und Alveolen erreichen können (Brook *et al.* 2004). Diese ultra-feinen (uf) Partikel stellen zahlenmäßig die größte Gruppe im Feinstaub dar, wohingegen sie zur Gesamtmasse sehr wenig beitragen. Die Oberfläche der uf Partikel ist sehr groß, was das Verhältnis zwischen Oberfläche und Masse erhöht. Dies könnte eine mögliche Erklärung

für die verstärkte biologische Toxizität der uf Partikel gegenüber der Toxizität der feinen Partikel darstellen (Donaldson and Stone 2003).

Welche dieser Fraktionen für die Gesundheitsschädigungen verantwortlich ist, ist bisher ungeklärt. Studien von Peters et al. (Peters *et al.* 2004; Peters *et al.* 1997) belegen jedoch eine Assoziation zwischen Feinstaubbelastung und einem Anstieg von Morbidität und Mortalität.

Die Partikel unterscheiden sich aber nicht nur hinsichtlich ihrer Größe, sondern auch durch an ihrer Oberfläche gebundene reaktive Komponenten, wie polyaromatische Kohlenwasserstoffe oder Übergangsmetalle. Bestimmend für pathophysiologische Effekte sind partikelassoziierte Parameter wie Anzahl, Oberfläche und oben genannte reaktive Komponenten.

In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich Untersuchungen mit den ultrafeinen Kohlenstoff-Partikeln Printex 90 (P90, Durchmesser 12 nm) durchgeführt (Abbildung 3). Diese werden industriell hergestellt und enthalten sehr geringe Spuren von organischen Verunreinigungen (ca. 1%) (Moller *et al.* 2005). Verwendung findet Printex 90 z.B. als Toner für Laserdrucker. Die physikalischen Daten aller in dieser Arbeit verwendeten Partikel sind in einer Tabelle unter B.1.5 zusammengefasst.

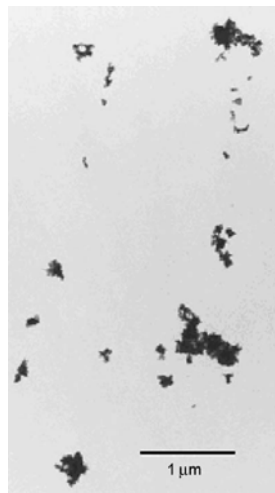


Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme von uf P90 – Aerosol (Gilmour *et al.* 2004)

A.3.2 Deposition im Körper

Biologische Wirksamkeit erlangen Partikel nur, wenn sie über die Lunge in den Körper aufgenommen werden. Dann können sie multiple Prozesse wie Inflammation, Zytotoxizität und Mutagenese auslösen.

Bei Mundatmung können Teilchen $\leq 5 \mu\text{m}$ in die Bronchien gelangen, kleinere können bis in die Alveolen vordringen. Auch wenn ultra-feine Partikel innerhalb weniger Stunden Aggregate bilden, deponieren sie vor allem in der Lungenperipherie und interagieren dort mit Zellen der alveolären Region, wie z.B. Alveolarmakrophagen (Beck-Speier *et al.* 2005). Aufgrund ihrer geringen Löslichkeit weisen sie auch eine längere Verweildauer in der Lunge auf. Größere Partikel werden von Makrophagen und dendritischen Zellen phagozytiert und weiter abgebaut. Ultra-feine Partikel hingegen werden nicht nur phagozytiert, sondern können z.B. durch Pinozytose in Epithelzellen eindringen, in die Zirkulation gelangen und so im Körper weiter verteilt werden. Auf diese Weise lösen ultra-feine Partikel einerseits lokale Reaktionen in der Lunge aus, können aber andererseits auch durch den Transport im Kapillarsystem systemische Effekte wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen zur Folge haben (Alfaro-Moreno *et al.* 2007). Die Translokation der ultra-feinen Partikel in das Kapillarsystem wird allerdings widersprüchlich diskutiert. Im Rattenmodell beobachteten Oberdorster und Kollegen eine schnelle Translokation innerhalb von 24 Stunden von mehr als 50% der ultra-feinen ^{13}C -markierten Partikel in die Leber (Oberdorster *et al.* 2002), wohingegen Kreyling und Kollegen nur minimale Translokation von weniger als 1% ultra-feiner Iridium Partikel ins Blut nachweisen konnten (Kreyling *et al.* 2002). Auch beim Menschen wurden gegensätzliche Ergebnisse berichtet: in Untersuchungen von Brown *et al.* und Möller *et al.* konnte kein detektierbarer Gehalt an ultra-feinen Partikeln außerhalb der Lungen gemessen werden (Brown *et al.* 2000; Moller *et al.* 2008), in einer anderen Studie hingegen wurde eine Aufnahme von 3-5% ultra-feiner Kohlestoffpartikel in den Blutstrom gezeigt (Nemmar *et al.* 2002). Somit kann eine systemische Aufnahme von Partikeln nicht vollkommen ausgeschlossen werden und es ist möglich, dass unter Umständen Blutzellen von diesen Partikeln aktiviert werden.

Aufgrund ihrer hohen spezifischen Oberfläche katalysieren ultra-feine Partikel chemische Reaktionen, die Inflammation verursachen. In vitro-Studien zeigten, dass hohe Konzentrationen ultra-feiner Partikel Inflammation auslösen und Kalzium-Ströme verstärken (Brown *et al.* 2000), außerdem die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (wie H_2O_2 oder O_2^-) anregen (Beck-Speier *et al.* 2005) oder Oxidation von Proteinen des Zytoskeletts verstärken können (Moller *et al.* 2005). Die uf Partikel fungieren auch als Transporter für toxische Gase oder Substanzen in die Lungenperipherie.

A.4 Abwehrmechanismen der Lunge

Um Schäden durch inhalierte Aerosole zu vermeiden, verfügt das Atemsystem über vielfältige Abwehrmechanismen. Sie lassen sich in eine unspezifische mechanische Abwehr (Husten und Niesen), in eine unspezifische und spezifische immunologische Abwehr sowie in Entgiftungsmechanismen einteilen.

Aus den oberen Atemwegen werden Partikel bis zu einer Größe von ca. 1 μm mit Hilfe des mukoziliären Apparates innerhalb weniger Tage entfernt. Dieser mechanische Transport wird hier nicht genauer behandelt.

Auf die immunologische Abwehr und die Entgiftungsmechanismen soll in folgenden Abschnitten näher eingegangen werden.

A.4.1 Immunologische Mechanismen

A.4.1.1 Phagozytose durch Makrophagen

Makrophagen stellen neben dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten eine der drei phagozytierenden Zellarten im Immunsystem dar und sind somit auch in den Atemwegen eine wichtige Abwehr gegen eindringende Fremdkörper. Die Beseitigung von Teilchen $< 1 \mu\text{m}$ aus dem Alveolarraum bewerkstelligen die Alveolarmakrophagen, die die Partikel phagozytieren und bewirken, dass diese über das lymphatische System des Körpers oder über den mukoziliären Apparat ausgeschieden werden.

Alle Blutzellen stammen von einer pluripotenten Stammzelle im Knochenmark ab. Makrophagen entwickeln sich aus der myeloiden Vorläuferzelle. Sie stellen die gereifte Form der Monozyten dar, die im Blut zirkulieren und nach Einwandern in das Gewebe zu Makrophagen maturieren. Es gibt viele Arten von Makrophagen, wobei in der Lunge interstitielle, bronchiale und alveoläre Makrophagen unterschieden werden. Alveolarmakrophagen haben höhere phagozytotische Aktivität als interstitielle Makrophagen, die mehr den Blutmonozyten ähneln (Fathi *et al.* 2001). Makrophagen erkennen Mikroorganismen und Krankheitserreger mithilfe von Rezeptoren an ihrer Zelloberfläche.

Die Beseitigung der Teilchen durch die Alveolarmakrophagen mittels Phagozytose scheint jedoch bei den ultra-feinen Teilchen an ihre Grenzen zu stoßen. Ferin und Kollegen stellten bei ihren Expositionsversuchen an Ratten fest, dass die Elimination von ultra-feinen TiO₂-Teilchen aus der Lunge deutlich längere Zeit in Anspruch nahm, als die Entfernung von feinen TiO₂-Teilchen. Auch zeigte sich, dass die ultra-feinen Teilchen nicht vollständig von den Makrophagen aufgenommen werden konnten und zu einem großen Teil in Alveolar-Epithelzellen vom Typ I und im Interstitium wieder gefunden wurden. Gleichzeitig zur Translokation der Partikel ins Interstitium wurde ein Einstrom von neutrophilen Granulozyten in die Lunge und damit verbunden eine akute inflammatorische Reaktion beobachtet (Ferin *et al.* 1992).

A.4.1.2 Inflammatorische Reaktionen bei COPD

Auch bei COPD spielen inflammatorische Reaktionen eine wichtige Rolle. Sowohl Zellen der angeborenen als auch der erworbenen Immunantwort sind daran beteiligt und es besteht ein Zusammenhang zwischen Erkrankung und Zellgehalt sowie Zellzusammensetzung in Lungengewebe und Atemwegen.

COPD-Patienten haben einen generell höheren Zellgehalt im induzierten Sputum. Bei der COPD überwiegt der Anteil der neutrophilen Granulozyten (Keatings *et al.* 1996; Rutgers *et al.* 2000), während der Anteil der Makrophagen verglichen mit Kontroll-Spendern geringer ist (Peleman *et al.* 1999). Bei Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten und bronchialem Epithel

konnten zwischen Patienten und gesunden Spendern keine Unterschiede festgestellt werden (Peleman *et al.* 1999). Obwohl nur bei dem Protzentsatz der neutrophilen Granulozyten ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zur FEV₁ beobachtet werden kann (Peleman *et al.* 1999), stellen die Makrophagen trotzdem eine wichtige Zellpopulation im Krankheitsgeschehen der COPD dar (Larsson 2007): sie produzieren eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen, durch die verschiedene andere Zelltypen in die Lunge angelockt werden können. Auch die Matrix-Metalloproteinasen und deren Inhibitoren, zwischen welchen es bei COPD zu einer Imbalance kommen kann, werden hauptsächlich von Makrophagen gebildet. Abbildung 4 soll einen Eindruck geben, wie komplex und vielschichtig die Aufgaben von Makrophagen im Krankheitsgeschehen der COPD durch Bildung von Zytokinen, Chemokinen und Proteasen sind.

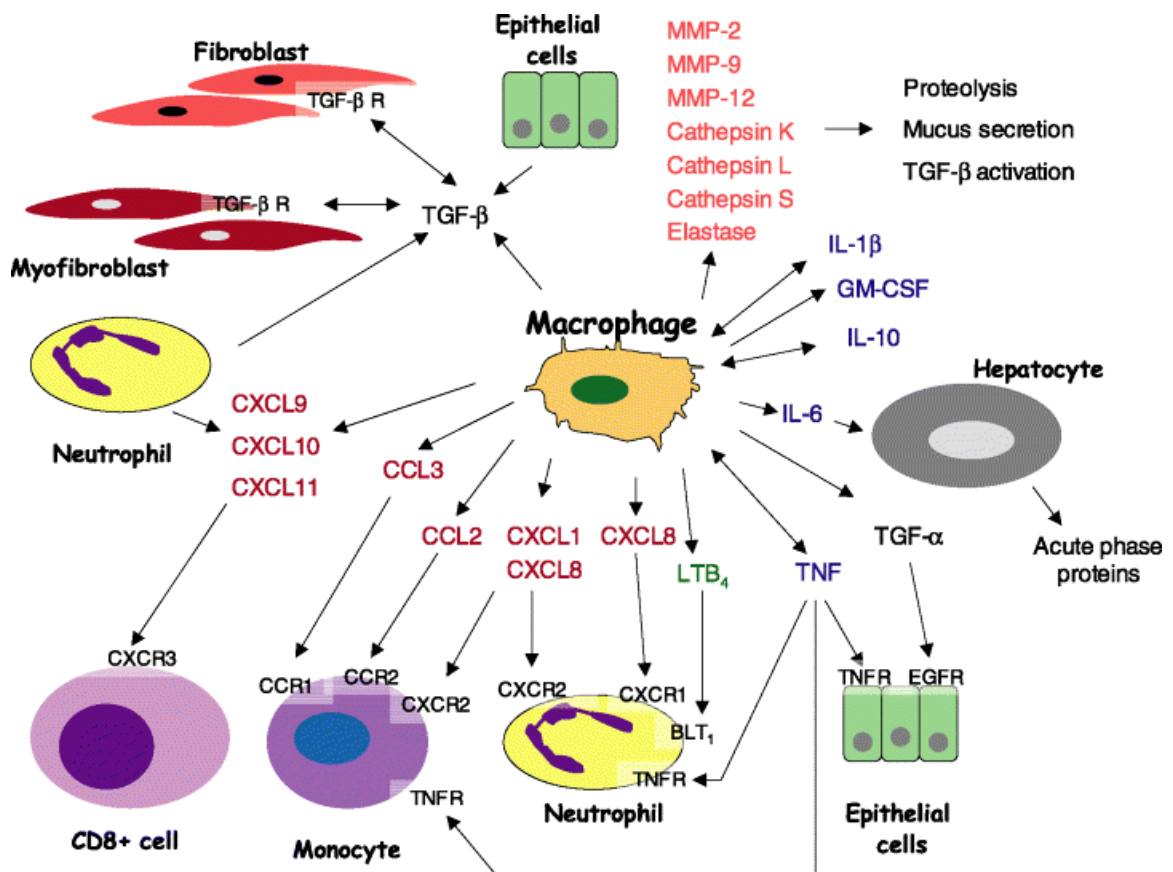


Abbildung 4: Aufgaben und Effekte von Makrophagen bei COPD (Larsson 2007)

Viele Studien belegen, dass im Sputum gesunder Spender die Makrophagen die Mehrheit der Zellen darstellen, bei COPD-Patienten überwiegen hingegen die neutrophilen Granulozyten. Auch Frankenberger und Kollegen konnten

diese Zellverteilungen bestätigen (Frankenberger *et al.* 2004). In dieser Studie wurde aber zum ersten Mal eine Population von Makrophagen beschrieben, die kleiner sind als die herkömmlichen Sputummakrophagen und vor allem bei COPD-Patienten in der Exazerbationsphase im Vergleich zu den großen Makrophagen stark ansteigen können. Diese kleinen Sputummakrophagen zeigten im Vergleich zur großen Population eine höhere Expression der Oberflächenmarker CD14 und HLA-DR.

A.4.1.3 Die Rolle der Zytokine, Chemokine und Proteasen

Es gibt viele Mechanismen, die zur Rekrutierung von Makrophagen in die Lunge führen. Vermittelt werden kann diese Rekrutierung durch Zytokine. Dies sind kleine, lösliche Proteine, die im Körper von verschiedenen Zellen freigesetzt werden und durch ihre Bindung an spezifische Rezeptoren Reaktionen auslösen. Zytokinrezeptoren sind hochaffine Transmembranproteine, die nach Bindung des passenden Liganden Tyrosinkinase aktivieren und so die Genexpression verändern können. Zytokine spielen im Entzündungsprozess eine bedeutende Rolle und lassen sich nach ihren Effekten in pro- und anti-inflammatorische Zytokine unterteilen. Oft wird dasselbe Zytokin von mehreren unterschiedlichen Zelltypen exprimiert oder es wirkt auf unterschiedliche Zellen, was man als Pleiotropie bezeichnet. Ebenso sind Zytokine redundant, was bedeutet, dass mehrere verschiedene Zytokine dieselbe Wirkung auf Zielzellen besitzen. Eine bestimmte Klasse von Zytokinen bezeichnet man als Chemokine, die mit ihren chemotaktischen Eigenschaften Zellen mit den passenden Rezeptoren dazu veranlassen können, zur Quelle der Chemokine zu wandern. Alle Chemokin-Rezeptoren sind integrale Membranproteine mit sieben membrandurchspannenden Helizes, die ihre Signale über gekoppeltes G-Protein weitergeben. Chemokine mobilisieren vor allem Monozyten, neutrophile Granulozyten und andere Effektorzellen aus dem Blut und leiten sie zu Infektionsherden. Auch bei der Wanderung der Lymphozyten und bei der Angiogenese können die Chemokine eine Rolle spielen.

Mittlerweile sind mehr als 50 Chemokine bekannt, die bis zu 20 Rezeptoren aktivieren (Locati *et al.* 2005). Aufgrund ihrer Unterschiede in der Position von entscheidenden Cystein-Resten sind sie in vier Familien unterteilt: CC (Cystein-Reste benachbart), CXC (Cystein-Reste durch eine andere Aminosäure voneinander getrennt), C (nur ein Cystein) und CX₃C (zwischen den Cysteinen liegen drei andere Aminosäuren) Chemokine. Jedes Chemokin-Molekül kann an einen oder an mehrere Rezeptoren binden und so Signaltransduktionskaskaden aktivieren, die in Chemotaxis oder anderen Aktivitäten (z.B. Proliferation oder Differenzierung) resultieren (Donnelly and Barnes 2006).

Ein Vertreter der CXC-Chemokinrezeptoren ist CXCR4. Dieser bindet im Unterschied zu vielen anderen Chemokin-Rezeptoren selektiv nur einen Liganden, Stromal Cell-Derived Factor 1 (SDF-1 auch CXCL12). CXCR4 spielt eine essentielle Rolle in der Hämatopoese, Organogenese und Gefäßneubildung. CXCR4 ist auch in Krankheiten von Bedeutung: bei HIV fungiert er als Co-Rezeptor und ist in die Metastasenbildung bei Krebs involviert. Das WHIM Syndrom entsteht durch eine Mutation im C-Terminus des CXCR4-Rezeptors, welcher für die Internalisierung des Rezeptors eine regulatorische Rolle spielt und dadurch die Signaltransduktion verstärkt. So werden die Zellen, die einen mutierten Rezeptor tragen, im Knochenmark zurückgehalten und am Auswandern gehindert (Busillo and Benovic 2007).

Eine weitere wichtige Enzymgruppe im Krankheitsgeschehen der COPD sind die Proteasen. Zu ihren wichtigsten Aufgaben gehört es, durch proteolytische Aktivität eingedrungene schädliche Substanzen zu bekämpfen. Die Antiproteasen sind die Gegenspieler der Proteasen und hemmen deren Wirkung (Larsson 2007). Beide Enzymgruppen befinden sich in der gesunden Lunge im Gleichgewicht. Kommt es aber zu einer Imbalance, kann durch nicht genügend gehemmte Proteasen Lungengewebe zerstört werden.

A.4.2 Entgiftungsreaktionen

Neben den immunologischen Reaktionen zählen auch spezielle Entgiftungsmechanismen zu den Abwehrmechanismen der Lunge.

Viele Fremdstoffe haben sehr lipophile Eigenschaften, aufgrund derer sie sich besonders gut im Körper anreichern können. Um diese z.B. über die Niere ausscheiden zu können, müssen sie in Metaboliten mit einem überwiegend hydrophilen Anteil umgewandelt werden, da lipophile Stoffe rückresorbiert würden. Diese Entgiftungsmetabolisierung wird in zwei Phasen eingeteilt. Phase I wird als Funktionalisierung bezeichnet, in der die lipophilen Substanzen oxidiert, reduziert oder hydrolysiert werden. In der darauf folgenden Konjugation (Phase II) werden niedermolekulare Substanzen gebunden und so die Wasserlöslichkeit weiter erhöht. Die Reaktionen aus Phase I und II müssen nicht zwingend zu einer Entgiftung führen, denn vor allem anthropogene Xenobiotika können zu toxischen und reaktiven Substanzen metabolisiert werden (Prokanzerogene).

A.4.2.1 Die Monooxygenasen

Eine große Enzymgruppe innerhalb der Phase I-Enzyme stellen die Monooxygenasen dar. Sie übertragen ein Atom des Sauerstoffmoleküls auf den zu metabolisierenden Fremdstoff, das andere Atom wird zur Herstellung von Wasser verwendet.

Die wichtigsten Enzyme, die diese Reaktion katalysieren, sind die Cytochrom P450 Enzyme (CYPs). Diese Hämproteine erhielten ihren Namen durch die Ausbildung eines Absorptionsmaximums bei 450 nm nach Bindung eines der CO-Moleküle (Klingenberg 1958; Omura and Sato 1964a, b). CYPs sind in der Natur nahezu ubiquitär (Menschen, Tiere, Pflanzen, Bakterien) zu finden, in verschiedenen Organen und Zelltypen nachweisbar und liegen eingebettet in der Phospholipidmembran des endoplasmatischen Retikulums vor.

Es gibt eine Vielzahl von CYPs, beim Menschen z.B. sind bisher 57 Gene bekannt (Nelson). Davon ist ein Viertel in die Metabolisierung von Xenobiotika involviert. Neben ihrer Rolle im Fremdstoffmetabolismus sind CYPs aber auch an der Synthese und Metabolisierung von endogenen Stoffen beteiligt wie z.B. Steroidhormonen. Ältere Klassifikationen der verschiedenen CYP Isoenzyme erfolgten oft nach der Substratspezifität, heute beruht die Einteilung meist auf der Homologie ihrer Aminosäuresequenzen (Nelson *et al.* 1996). Alle Enzyme,

die eine Homologie > 40% haben, werden in einer Familie zusammengefasst, z.B. Familie CYP1. Die Einteilung in Subfamilien (Homologie > 60%) wird durch die Zuordnung eines Buchstaben gekennzeichnet, z.B. CYP1B. Eine weitere Zahl steht für die jeweilige Isoform des Enzyms, z.B. CYP1B1.

A.4.2.2 Cytochrom-Familie P450 1

Anfänglich dachte man, dass sich die CYP1 Familie aus einer Subfamilie mit zwei genau charakterisierten Mitgliedern zusammensetzt, CYP1A1 und CYP1A2. 1994 aber wurde zusätzlich ein weiteres Enzym dieser Familie entdeckt, das CYP1B1 (Sutter *et al.* 1994). CYP1B1 zeigt ca. 40 % Aminosäurehomologie in Bezug auf 1A1 (und auch 1A2) und ist bisher das einzige Mitglied seiner Subfamilie (Murray *et al.* 2001).

Eine Gemeinsamkeit von CYP1A1 und 1B1 besteht in ihrer Induzierbarkeit durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) oder Dioxin (z.B. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin). Die Expression dieser beiden Enzyme wird über einen gemeinsamen Regulationsmechanismus gesteuert, der über den so genannten Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) läuft (vereinfachte Darstellung siehe Abbildung 5). Im inaktiven Zustand liegt der AhR gebunden an zwei Moleküle des Hitzeschockproteins 90 (hsp90) im Zytoplasma vor. Nach Bindung eines Liganden (z.B. PAH oder Dioxin) löst sich das hsp90, der Rezeptor-Induktor-Komplex wandert in den Zellkern und bindet an seinen Koaktivator ARNT (Ah-Rezeptor nukleären Translokator). Dieses Heterodimer kann an spezifische Regionen der DNA, die XRE-Elemente (Xenobiotica Responsive Elements) binden. Da sich die XRE-Region in der Kontrollregion der CYP-Gene befindet, wird so die Transkription induziert (Kitamura and Kasai 2007).

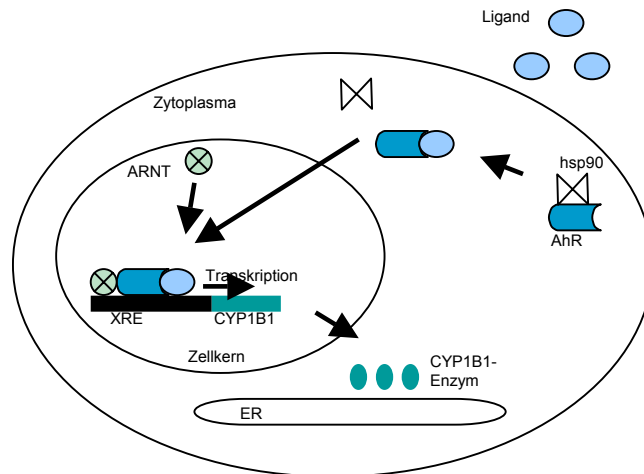


Abbildung 5: Vereinfachte schematische Darstellung der Regulation des CYP1B1 (CYP1A1) Gens über den Ah-Rezeptor

A.4.2.3 Cytochrom P450 1B1

Auch wenn das CYP1B1 der CYP1 Familie zugeordnet wurde, besitzt es einige Eigenschaften, die es deutlich von den beiden anderen Mitgliedern (CYP1A1 und 1A2) unterscheidet.

Das CYP1B1 Gen ist mit einer Länge von 12 kb auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 (p22-21) lokalisiert (CYP1A1/2 liegen auf Chromosom 15) (Murray *et al.* 2001). Es besteht aus drei Exons und zwei Introns, woraus eine mRNA mit 5,2 kb resultiert (CYP1A1/2 besitzen jeweils sieben Exons und sechs Introns) (Murray *et al.* 2001). In der 5' Region vor dem Transkriptionsstartpunkt finden sich bei CYP1B1 sowohl basale Regulationssequenzen als auch DNA-Elemente (XRE), die auf Xenobiotica reagieren.

Das CYP1B1 Protein besitzt – wie alle Cytochrom P450-Enzyme – ein Häm (Porphyrin mit zentralem Eisenatom) als prosthetische Gruppe, welches für das Redoxpotential und die Lichtabsorption verantwortlich ist. CYP1B1 besteht aus 543 Aminosäuren und ist im Aminoterminus reich an hydrophoben Aminosäuren, die vermutlich für die Verankerung des Proteins in der Membran verantwortlich sind (Hasler and Pikuleva 1999).

Die Expression von CYP1B1 variiert stark, sowohl in unterschiedlichen Zelltypen und Geweben als auch zwischen einzelnen Individuen. Das CYP1B1 Protein wird in Tumorgewebe erhöht exprimiert, wohingegen in normalem

Gewebe selbst die mRNA nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden konnte.

CYP1B1 aktiviert Prokarzinogene in einem höheren Maß als CYP1A1/2 und ist im Speziellen bei der Aktivierung von Diebenzo[11,12][a,l]pyren-11,12-Diol am effizientesten (Shimada *et al.* 1996). Auch die Hydroxylierung von Benzo[a]pyren und Bufuralol, die Oxidation von Caffein und Theophyllin und die O-Dealkylation von z.B. Ethoxycoumarin wird vom CYP1B1-Enzym katalysiert (Murray *et al.* 2001).

A.5 Ziel der Arbeit

Um Grundlagen für mögliche Therapien für COPD zu erarbeiten und die Krankheit genauer diagnostizieren zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Schwerpunktthemen behandelt:

Die eine Fragestellung beschäftigte sich mit Sputummakrophagen von COPD-Patienten, vor allem mit der Population der kleinen Sputummakrophagen. In dieser Arbeit habe ich die Hypothese untersucht, dass die Sputummakrophagen bei COPD-Patienten eine andere Genexpression aufweisen als bei gesunden Rauchern und Nichtrauchern.

Der andere Schwerpunkt lag auf der Untersuchung des Effektes von ultrafeinen Partikeln auf die Genexpression in Makrophagen in der Lunge. Es sollte geprüft werden, ob ultra-feine Partikel die Genexpression von Cytochromen in Monozyten und Makrophagen beeinflussen.

B Material und Methoden

B.1 Material

B.1.1 Reagenzien

Reagenz	Bestellnummer	Hersteller
Agarose	161-3102	BioRad (München)
ALLN (Calpain Inhibitor I)	A-6185	Sigma (Taufkirchen)
Antipain	A-6191	Sigma (Taufkirchen)
Aprotinin	A-6279	Sigma (Taufkirchen)
Benzo(a)pyren	12780	Fluka (Taufkirchen)
Bradford-Reagenz	5000-0006	BioRad (München)
Bromphenolblau	B-5525	Sigma (Taufkirchen)
(3',3'',5',5''-Tetrabromophenol-sulfonphtalein)		
BSA (Bovines Serum Albumin)	A-2153	Sigma (Taufkirchen)
Chloroform	C-2432	Sigma (Taufkirchen)
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	D-5758	Sigma (Taufkirchen)
Diff-Quik®	130832	Medion Diagnostics (Düdingen, Schweiz)
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	N808-0007	Applied Biosystems (Darmstadt)
DNA-Längenstandard VI	11062590001	Roche (Mannheim)
DTT (Dithiothreitol)	19474	Merck (Darmstadt)
Dulbecco's minimal essential medium	F4815	Biochrom (Berlin)
Ham's F12		
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	RPN2106	Amersham Biosciences (Freiburg)
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	E-5134	Sigma (Taufkirchen)
Ethanol (absolut)	1.00983.1000	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	E-2515	Sigma (Taufkirchen)
Eukitt		O. Kindler (Freiburg)
FCS (low endotoxin)	S 0115	Biochrom KG (Berlin)

MATERIAL UND METHODEN

H ₂ O, reinst	82479E	B.Braun (Melsungen)
Heparin-Natrium (5000 U/ml)	2047217N1	B.Braun (Melsungen)
Hyperfilm™ ECL (18 x 24 cm)	RPN3103	Amersham Biosciences (Freiburg)
Isopropanol	I-9516	Sigma (Taufkirchen)
Kit (ready-to-use amplification primer mix for human MMP-9)	487645	Search LC (Heidelberg)
Kit (ready-to-use amplification primer mix for human TIMP-1)	487553	Search LC (Heidelberg)
Ladepuffer	B-3269	Sigma (Taufkirchen)
Leupeptin-Acetat	L-2023	Sigma (Taufkirchen)
Leupeptin-Propionyl	L-3402	Sigma (Taufkirchen)
L-Glutamin	25030-024	GIBCO® Invitrogen (Karlsruhe)
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	12239264001	Roche (Mannheim)
LPS (<i>S. Minnesota</i>)	L-6261	Sigma (Taufkirchen)
Lymphoprep™	1114740	AXIS-SHIELD PoC AS (Oslo, Norwegen)
Magermilchpulver	1.15363	Merck (Darmstadt)
Methanol	1.06009.2500	Merck (Darmstadt)
MgCl ₂ x 6H ₂ O	M-0250	Sigma (Taufkirchen)
MgCl ₂ (25mM)	N8080130	GeneAmp 10 x PCR Buffer II & MgCl ₂ Applera Deutschland GmbH (Darmstadt)
Mineralöl	M-9504	Sigma (Taufkirchen)
NaCl	S-9625	Sigma (Taufkirchen)
α-Naphtoflavon	N-5757	Sigma (Taufkirchen)
Natrium-Deoxycholat	D-6750-G25	Sigma (Taufkirchen)
Natriumdodecylsulfat	L-5750	Sigma (Taufkirchen)
NaOH	S-0899	Sigma (Taufkirchen)
nicht-essentielle Aminosäuren	11140-35	Invitrogen (Karlsruhe)
NuPAGE® Antioxidant	NP0005	Invitrogen (Karlsruhe)
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4 x)	NP0007	Invitrogen (Karlsruhe)
NuPAGE® MOPS-SDS Puffer	NP0001	Invitrogen (Karlsruhe)

MATERIAL UND METHODEN

NuPAGE [®] Sample Reducing Agent (10 x)	NP0004	Invitrogen (Karlsruhe)
NuPAGE [®] Transferpuffer	NP0006	Invitrogen (Karlsruhe)
Oligo d(T) ₁₆	N808-0128	Applied Biosystems (Darmstadt)
OPI-Supplement (enthält : Oxalacetat- säure, Natriumpyruvat, Insulin)	0-5003	Sigma (Taufkirchen)
PCR-Puffer II (10 x konz)	N8080130	GeneAmp 10 x PCR Buffer II & MgCl ₂ Applera Deutschland GmbH (Darmstadt)
Pepstatin A	P-4262	Sigma (Taufkirchen)
Penicillin/Streptomycin	15140-114	Invitrogen (Karlsruhe)
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	P-7626	Sigma (Taufkirchen)
Reverse Transkriptase M-MuIV	N808-0018	Applied Biosystems (Darmstadt)
rhM-CSF (rekombinanter humaner Makrophagen koloniestimulierender Faktor)	3A04X003	Genetics Institute (Cambridge, USA)
RNase Inhibitor	N808-0119	Applied Biosystems (Darmstadt)
Röntgen-Entwickler-Konzentrat	00011	Adefo Chemie GmbH (Nürnberg)
Röntgen-Fixierer-Konzentrat	00064	Adefo Chemie GmbH (Nürnberg)
RosetteSep [™] Human Monocyte Enrichment Cocktail	15028	StemCell Technologies
RPMI-Medium (low endotoxin, 2g/l NaHCO ₃)	F1415	Biochrom KG (Berlin)
SeeBlue [®] Plus2 Standard	LC5925	Invitrogen (Karlsruhe)
Sputolysin	560000	Calbiochem (Bad Soden)
TRI-Reagent	T-9424	Sigma (Taufkirchen)
TRIS-Base (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	T-6791	Sigma (Taufkirchen)
tRNA aus Brauhefe	109517	Roche (Mannheim)
Trypanblau	T-8154	Sigma (Taufkirchen)

Trypsin-EDTA (0,25 %)	T-4049	Sigma (Taufkirchen)
Tween [®] 20	2323003	Wasserfuhr (Bonn)

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien

B.1.2 Lösungen und Medien

Lösungen und Medien	Zusammensetzung
D-PBS	PBS EDTA 2 mM FCS 0,5 % mit der Vakuumpumpe ca. 10 min entgasen
EDTA-Lösung 0,5 M	EDTA 18,6 g ad 100 ml H ₂ O (reinst) pH 8,0 vor Gebrauch autoklavieren
DEPC-H ₂ O	0,1 % DEPC zu H ₂ O (reinst) geben, über Nacht inkubieren, vor Gebrauch autoklavieren
MM6-Medium	RPMI 1640 FCS 10 % L-Glutamin 2 mM Penicillin 200 U/ml Streptomycin 200 µg/ml OPI-Supplement 1 vial/l non essential amino acids (1x) 5 ml/0,5l pH 7,4 Das Medium wird über einen Ultra-Steril-Filter (#080501, Gambro, Gröbenzell) filtriert.
A549/Calu-3 Medium	Dulbecco's minimal essential medium (NUT mix F12) FCS 10 % L-Glutamin 2 mM Penicillin 200 U/ml Streptomycin 200 µg/ml

MATERIAL UND METHODEN

PBS	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	40,48 g
	KH ₂ PO ₄	9,8 g
	NaCl	17,5 g
	ad 4l H ₂ O (reinst)	
	pH 7,4	
	vor Gebrauch autoklavieren	
RIPA-Puffer	NaCl	150 mM
	IGEPAL CA-630	1%
	Natrium-Deoxycholat	0,5%
	SDS	0,1%
	TRIS-Base	50 mM
	pH 8,0	
Puffer A	HEPES pH 7,9	10 mM
	KCl	10 mM
	MgCl ₂	1,5 mM
	ad 100 ml	
Puffer D	HEPES pH 7,9	20 mM
	Glycerol	20 %
	KCl	0,1 M
	EDTA pH8	0,05 mM
	ad 100 ml	
Proteaseinhibitoren	Aprotinin	10 µg/ml
	PMSF	1 mM
	Leupeptin-Propionyl	40 µg/ml
	Leupeptin-Acetat	20 µg/ml
	Antipain	20 µg/ml
	Pepstatin A	20 µg/ml
	ALLN	400 µM
	DTT	2 mM
TBE (10 x)	TrisBase	108 g
	Borsäure	55 g
	0,5 M EDTA (pH 8,0)	40 ml
	H ₂ O (reinst)	ad 1 l
	vor Gebrauch autoklavieren	

MATERIAL UND METHODEN

TBS	Tris-HCl	7,88 g
	NaCl	8,06 g
	KCl	0,2 g
	Tween [®] 20	0,5 ml
	H ₂ O (reinst)	ad 1 l
	pH 7,5	
Trypanblau	Trypanblau 1:2 in PBS	

Tabelle 2: Verwendete Lösungen und Medien

B.1.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Bestellnummer	Hersteller
Deckgläser (18 x 18 mm)	1201-2	Menzelgläser (Braunschweig)
Faltenfilter 520 A1/2 (Ø 185 mm)	10 331 447	Schleicher & Schuell (Würzburg)
LD-Säulen (MidiMACS)	130-042-901	Militenyi Biotech GmbH (Bergisch Gladbach)
LightCycler Kapillaren	11909339001	Roche (Mannheim)
LS-Säulen (MidiMACS)	130-042-401	Militenyi Biotech GmbH (Bergisch Gladbach)
Mundstücke für Inhalationsgerät	85605	Schill GmbH & CoKG (Probstzella)
Nitrocellulose Membran Filterpapier Sandwich	LC2001	Novex (San Diego, USA)
NuPAGE [®] Bis-Tris-Gele (4-12%)	NP0329BOX	Invitrogen (Karlsruhe)
Objektträger	2406/1	Assistent (Sondheim)
Petrischalen (d = 14,5 cm)	639102	Greiner Bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Plastikspatel	759800	Brand (Wertheim)
Polystyren-Röhrchen (12x75mm)	352054	BD Bioscience (Heidelberg)
Reaktionsgefäße 1,5 ml	0030120086	Eppendorf (Hamburg)
Reaktionsgefäße 0,5 ml	0030121023	Eppendorf (Hamburg)

Zellkultur Röhrchen (PS, 12 ml)	163 160	Greiner (Frickenhausen)
Zellkulturflasche (75 cm ²)	3275	Costar (Bodenheim)
Zellkulturplatte (24 Vertiefungen)	3524	Costar (Bodenheim)
Zellkulturplatte (24 Vertiefungen, ultra low attachment)	3473	Costar (Bodenheim)
Zellkulturplatte (96 Vertiefungen, ultra low attachment, Flachboden)	3474	Costar (Bodenheim)
Zellsieb 40 µm	352340	BD Bioscience (Heidelberg)
Zellsieb 100 µm	352360	BD Bioscience (Heidelberg)
Zentrifugenröhrchen 1,5 ml (Ultrazentrifuge)	356090	Beckman-Coulter (Krefeld)
Zentrifugenröhrchen 15 ml	227261	Greiner (Frickenhausen)
Zentrifugenröhrchen 50 ml	188261	Greiner (Frickenhausen)

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien

B.1.4 Antikörper und Isotyp-Kontrollen

Antikörper	Bestellnummer	Hersteller
CD14-MicroBeads	130-050-201	Miltenyi-Biotech (Bergisch Gladbach)
CD14 My4 FITC	6603511	Coulter (Krefeld)
CD14 Isotyp MslgG2b FITC	6603034	Coulter (Krefeld)
CD14- RMO52 PC5	A07765	Coulter (Krefeld)
CD14 Isotyp MslgG2a PC5	A09148	Coulter (Krefeld)
CD16-MicroBeads	130-045-701	Miltenyi-Biotech (Bergisch Gladbach)
CD16 Leu11c PE	347617	Becton Dickinson (Heidelberg)
CD16 Isotyp MslgG1 PE	349043	Becton Dickinson (Heidelberg)
CD16b-CLB-gran11.5 PE	550868	Pharmingen (über BD Bioscience, Heidelberg)
CD66b-FITC	51-36805X	Serotec (Düsseldorf)

CXCR4	MAB172	R&D Systems GmbH (Wiesbaden)
CXCR4 Isotyp MslgG2b	MAB0041	R&D Systems GmbH (Wiesbaden)
CYP1B1	CYP1B11-A	Alpha Diagnostics (San Antonio, USA)
IgG FITC goat α mouse (sekundärer Antikörper)	M35001	Caltag / Invitrogen (Karlsruhe)
IgG PE goat α mouse (sekundärer Antikörper)	M35004-1	Caltag / Invitrogen (Karlsruhe)
IgG-Peroxidase goat α rabbit (sekundärer Antikörper)	A0545	Sigma (Taufkirchen)
MOPC-21 (mouse IgG1 κ)	M9269	Sigma (Taufkirchen)

Tabelle 4: Verwendete Antikörper und Isotyp-Kontrollen

B.1.5 Partikel

Partikel	Durchmesser (nm)	Spezif. Oberfläche (m ² / g)	Quelle
Feines TiO ₂	220	6	Zur Verfügung gestellt
Ultra-feines TiO ₂	20	48	von Dr. Wolfgang
Ultra-feines Printex 90	12	300	Kreyling (IHB,
Ultra-feines EC90 (elementarer Kohlenstoff)	90	600	Helmholtz Zentrum München, Neuherberg)

Tabelle 5: Verwendete Partikel

B.1.6 Oligonukleotide

Die aufgelisteten Primerpaare wurden entweder mit dem Programm „Primer3“ (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) ausgewählt oder Veröffentlichungen entnommen.

Verwendete Oligonukleotide wurden von AG BIODV des Helmholtz Zentrums München in Neuherberg bzw. von der Firma MWG (Holzkirchen) synthetisiert. Das gelieferte Lyophilisat wurde in 200 µl DEPC-H₂O gelöst und auf 15 µM verdünnt.

Primer	Sequenz (5'→3')	Produktlänge
α-Enolase	forward: GTTAGCAAGAACTGAACGTCACA reverse: TGAAGGACTTGTACAGGTCAG	619 bp
Chemokinrezeptor CCR9	forward: TACTGGCTCGTGTTTCATCGT reverse: TTGGCTTGTATCAGGGTGTG	572 bp
Chemokinrezeptor CXCR1	forward: GCCACCTGCAGATGAAGATT reverse: CAGCAGCCAAGACAAACAAA	423 bp
Chemokinrezeptor CXCR2	forward: GTGAACCAGAATCCCTGGAA reverse: AGACGGTCCGGAAAAGT	447 bp
Chemokinrezeptor CXCR4	forward: CCTCATCTTTGCCAACGTCAGT reverse: AGGATGGGGTTCAGACAACATT	323 bp
Cytochrom P450 1B1 (CYP1B1)	forward: TGATGGACGCCTTTATCCTCTC reverse: CATAAAGGAAGGCCAGGACATA	285 bp
Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1)	forward: TCTTTCTCTTCCTGGCTATCCT reverse: CTGTCTCTTCCCTTCACTCTTG	596 bp
Dual specificity phosphatase 1 (DUSP1)	forward: TAGCTTTCCCTCGAAAAGCGCC reverse: GAAGCGCACGTTGACAGAGC	239 bp
Eukaryotic translation initiation factor (EIF4G3)	forward: AGCCACACAATGGGATTAGTG reverse: GGGTGGCTTAAACAATGGAAGT	204 bp
Galectin 3 (GAL3)	forward: GCCTACCCATCTTCTGGACAG reverse: TCTTTCTTCCCTTCCCCAGTTA	297 bp
H2A histone family, member 4 (H2AFY)	forward: TTCAGGGCAGACTGAGAGGTG reverse: CCTCATGTTTTTCAGCCCACTG	315 bp
Haemoxygenase 1 (HO-1)	forward: CAGGCAGAGAATGCTGAG reverse: GCTTCACATAGCGCTGCA	280 bp
Heat shock protein 40 (HSP40)	forward: TCGTCATCACCTCTCATCCAG reverse: CCACCTCTGGGATGATGTTCA	302 bp
Hepatitis A virus cellular Receptor 2 (hepAcR2)	forward: TGGCAAATGCAGTAGCAGAG reverse: TGCTCCATAGCAGTGGACAGA	260 bp
Hypothetisches Protein H41 (CDV3 Homolog)	forward: GCCCTGACTCTCCAAATGAAC reverse: GGAAACTGCAGTGGGAAGAATA	265 bp

MATERIAL UND METHODEN

Interleukin 1 β (IL-1 β)	forward: AACAGATGAAGTGCTCCTTCCAGG reverse: TGGAGAACACCACTTGTGCTCCA	388 bp
Interleukin 6 (IL-6)	forward: ATGAACTCCTTCTCCACAAGC reverse: CTACATTTGCCGAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG	639 bp
Interleukin 8 (IL-8)	forward: ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT reverse: TCTCAGCCCTCTTCAAAAATTCTC	398 bp
Interleukin 10 (IL-10)	forward: GCCTAACATGCTTCGAGATC reverse: TGATGTCTGGGTCTTGGTTC	204 bp
Jagged1 (JAG1)	forward: GATTTCTTTTCACCATTCGTACAT reverse: TCTTCACGGTCTCAATGGTGAA	262 bp
Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9)	forward: GTGCTGGGCTGCTGCTTTGCTG reverse: GTCGCCCTCAAAGGTTTGAAT	303 bp
Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate (MARCKS)	forward: CAAGGCAGAGGAAGAAGGTGT reverse: GTGGTGCCAGGTACTGGTTTT	206 bp
Osteopontin (OPN)	forward: GAATGGTGCATACAAGGCCATC reverse: TTGGGGTCTACAACCAGCATAT	276 bp
Protein Tyrosin Phosphatase IVA1 (PTP4A1)	forward: TTGACCTTCCCAAATCATGC reverse: AAGTGAGCAGGCAAATAACCATG	255 bp
Ras association domain family (RASSF5)	forward: TGCCACGTACAGGACCATTATT reverse: TTGGTGCTCCTTACCCTGAGC	192 bp
Sialoadhesin precursor (SIGLEC1)	forward: GGAGGGCAGACACAGATGTTG reverse: TTAGCTCCTGTGGCAACTCCC	299 bp
Stromal derived factor (SDF-1 α)	forward: CTGGGTTTTGTGATTGCCTCTG reverse: CATTTCATATGGCTCCACTTCAA	354 bp
Transforming growth factor (TGF β)	forward: TGACAGCAGGGATAACACAC reverse: TGTCCAGGCTCCAAATGTAG	326 bp
Tissue Inhibitor Matrix Metalloproteinase (TIMP-1)	forward: GGGGACACCAGAAGTCAACCAGA reverse: CTTTTAGAGCCTTGGAGGAGCT	400 bp
Tumornekrosefaktor (TNF)	forward: CAGAGGGAAGAGTTCCCCAG reverse: CCTTGGTCTGGTAGGAGACG	325 bp

Tabelle 6: Verwendete Primerpaare

B.1.7 Geräte

Gerät	Hersteller
Adapter für Ultrazentrifuge	Beckman-Coulter (Krefeld)
Analysenwaage BP 210 S	Sartorius (Göttingen)
Anwenderset für Inhalationsgerät (2901)	Schill GmbH & CoKG (Probstzella)
Autoklav (Typ 400, Varioklav [®])	Oberschleißheim
Axioplan2 (Fluoreszenzmikroskop)	Zeiss (Jena)
Brutschrank	Binder (Tuttlingen)
eflow Inhalationsgerät (Modell 078B1001)	PARI GmbH (Starnberg)
Elektrophoresekammern (Horizon [®] 11-14)	GIBCO [®] Invitrogen (Karlsruhe)
Elektrophoresenetzgeräte (PS 305 und ST606T)	GIBCO [®] Invitrogen (Karlsruhe)
Durchflusszytometer EPICS XL	Coulter (Krefeld)
Durchflusszytometer FACSCalibur [™]	Becton Dickinson (Heidelberg)
Digitalkamera iAi protec JAI 2040	Japan
Kamera (MP-4)	Polaroid (Dreieich-Sprendlingen)
Laborzentrifuge 1-15	Sigma (Osterode)
Laborzentrifuge 1K15, kühlbar	Sigma (Osterode)
Laborzentrifuge 3K15, kühlbar	Sigma (Osterode)
Laborzentrifuge 5417C	Eppendorf (Hamburg)
LightCycler	Roche Applied Science (Mannheim)
Magnetrührer (MR 3001)	Heidolph (Schwabach)
MACS-Multistand (130-042-303)	Miltenyi-Biotech (Bergisch-Gladbach)
Mikroskop	Zeiss (Jena)
pH-Meter (MultiCal [®])	WTW (Weilheim)
ThermoCycler Touchdown	Hybaid (Heidelberg)
Photometer Nanodrop [®] ND-1000	Kisker (Steinfurt)
Ultraschall Inhalationsgerät multisonic (LS290)	Schill GmbH & CoKG (Probstzella)
Ultraschallbad (Sonorex RK 100 H)	Bandelin (Berlin)
Ultrazentrifuge Avanti J-25	Beckman-Coulter (Krefeld)
UV-Transilluminator (TS-20E)	Uni-Equipe (Martinsried)
Thermomixer 5437	Eppendorf (Hamburg)

Thermomixer (S436)	Eppendorf (Hamburg)
Vakuumpumpe Univapo	KNF Neuberger (Freiburg)
Vortexer (MS 2 Minishaker)	IKA (Staufen)
Waage Modell PT 3100	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Zählkammer (Neubauer improved)	Hecht Assistent (Sondheim)

Tabelle 7: Verwendete Geräte

B.2 Methoden

B.2.1 Zellkultur

B.2.1.1 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 25 μl der Zellsuspension mit 75 μl Trypanblau (1:4) gemischt. Aus dieser Verdünnung wurden wieder weitere 25 μl mit 75 μl Trypanblau gemischt, was in einer 1:16 Verdünnung resultiert. Diese wurde in die Neubauer Zählkammer gegeben. Eine Neubauer Zählkammer ist in 4 Großquadrate eingeteilt, die wiederum aus 16 Einzelquadraten bestehen. Trypanblau dringt nur in Zellen ein, deren Membran zerstört ist, weshalb diese Färbung zusätzlich auch als Vitalitätstest verwendet werden kann: Die Lebendzellzahl wurde durch Auszählen der ungefärbten Zellen in den vier Großquadraten bestimmt. Die Zellzahl pro ml Zellsuspension berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl / ml} = \text{Mittelwert aus vier Großquadraten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Verdünnungsfaktor: hier 16

10^4 : Volumen der Zählkammer (0,1 μl) umgerechnet auf 1 ml

B.2.1.2 Mono Mac 6

Die monozytäre Zelllinie Mono Mac 6 (MM6) ist ein humaner Zellklon, der aus dem Blut eines 64-jährigen Patienten mit monoblastischer Leukämie isoliert wurde (Ziegler-Heitbrock *et al.* 1988) und Eigenschaften reifer Blutmonozyten besitzt. MM6 Zellen wurden in Suspension in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen kultiviert und zweimal pro Woche subkultiviert. Zum Ernten wurden die Zellen in jeder Vertiefung gut resuspendiert, in einem 50 ml Röhrchen gesammelt und bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand

wurde verworfen und das Pellet in geeigneter Menge frischem MM6-Medium aufgenommen.

Für eine Subkultivierung wurden 4×10^6 Zellen in 24 ml MM6-Medium aufgenommen, auf 12 Vertiefungen (je 2 ml) verteilt und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

B.2.1.3 A549 und Calu-3

Die alveoläre Epithelzelllinie (A549) wurde aus einem Lungenkarzinom eines 58 Jahre alten und die bronchiale Epithelzelllinie (Calu-3) aus der Lunge eines 25-jährigen Kaukasiers gewonnen. Beide wachsen adhärent in DMEM-Medium. Um die Zellen abzulösen, wurde das Medium abgesaugt, kurz mit PBS gespült und mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung 5 min bei 37°C inkubiert. Um die Trypsin-Reaktion zu stoppen, wurden 10 ml frisches Medium zugegeben und die Zellen in einem 50 ml Röhrchen gesammelt. Nach 5-minütiger Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Zellen in der geeigneten Menge Medium resuspendiert. Für eine Subkultivierung wurden 2×10^6 Zellen in 20 ml Medium in eine 75 cm² Zellkulturflasche gesät.

B.2.2 Arbeiten mit primären Zellen

B.2.2.1 Isolierung von PBMC (peripheral blood mononuclear cells)

Die peripheren mononukleären Blutzellen (Monozyten und Lymphozyten) wurden aus 50 ml (von COPD-Patienten) bis 100 ml (von gesunden Kontrollspendern) Blut gewonnen.

Zunächst wurde das heparinisierte Blut (10 U / ml) mit dem gleichen Volumen LPS-freiem PBS verdünnt. In ein 50 ml Röhrchen wurden 14 ml Lymphoprep vorgelegt und maximal 28 ml dieser Blut-PBS Mischung überschichtet. Um einen Gradienten ausbilden zu können, wurde das Röhrchen 30 min bei 800 x g zentrifugiert (Beschleunigung 5, Bremse 2). Die Fraktion aus Monozyten und Lymphozyten befindet sich in der entstandenen Interphase, welche

abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 800 x g wurden die Zellen pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in PBS (2 mM EDTA, 0,5% FCS) aufgenommen und zweimal gewaschen. Danach wurde die Anzahl der PBMC mithilfe der Neubauer Zählkammer ermittelt (s. B.2.1.1).

B.2.2.2 MACS (magnetic cell sorting) Isolierung

Mithilfe der MACS-Technologie können aus heterogenen Zellsuspensionen einzelne Zelltypen in hoher Reinheit angereichert werden. Dazu werden sie spezifisch mit paramagnetischen Partikeln, den MACS *Micro Beads*, markiert und auf eine Trennsäule gegeben, die in einem Dauermagneten platziert wird. In der Matrix der Säule entsteht ein starkes Magnetfeld, durch welches die mit Beads markierten Zellen zurückgehalten werden, wohingegen nicht markierte Zellen die Matrix ungehindert passieren können. Nach Entfernen der Säule aus dem Dauermagneten können auch magnetisch zurückgehaltene Zellen eluiert werden.

Aus PBMC können mit der MACS-Technik CD14-positive Monozyten gewonnen werden. Nach Bestimmung der PBMC-Zellzahl wurde die Zellsuspension auf eine entsprechende Anzahl an Eppendorf-Reaktionsgefäßen (ca. 15×10^6 Zellen pro Reaktionsgefäß) aufgeteilt und 5 min bei 400 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Pellets in 84 µl einer CD16 Microbeads / PBS – Mischung (60µl / 25 µl) resuspendiert und 30 min bei 4°C inkubiert. Im anschließenden Waschschrift wurde das Volumen mit 600 µl PBS erhöht und 5 min bei 400 x g und 4°C zentrifugiert. Die entstandenen Pellets wurden nach Verwerfen des Überstandes insgesamt in 1,5 ml entgastem D-PBS aufgenommen und vereinigt. Nachdem die gekühlte LD-Säule (langsame Fließgeschwindigkeit) im Dauermagneten platziert und mit 2 ml D-PBS (4°C) vorequibriert wurde, lässt man die 1,5 ml Zellsuspension vollständig über die Säule laufen, spült zweimal mit 1 ml D-PBS (4°C) und fängt das Eluat, in dem nun CD16-positive Zellen depletiert sind, auf. Dieses wurde 5

min bei 400 x g und 4°C zentrifugiert und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Nach diesem Schritt wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellsuspension wieder auf eine entsprechende Anzahl Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgeteilt und pelletiert.

Um CD14-positive Zellen zu separieren, wurden die Pellets in einer CD14 Microbeads / PBS – Mischung (20 µl / 80 µl) aufgenommen und 30 min bei 4°C inkubiert. Der Waschschritt wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die Pellets wurden in insgesamt 1,5 ml entgastem D-PBS aufgenommen und vereinigt. Für die positive Anreicherung von CD14⁺⁺-Monozyten wurde eine LS-Säule mit schneller Fließgeschwindigkeit verwendet. Diese wurde wie oben beschrieben vorequibriert und mit der Zellsuspension beladen. Anschließend wurde fünfmal mit 2 ml D-PBS gespült, um alle ungebundenen Zellen aus der Säule zu entfernen. Um die sich noch in der Säule befindlichen CD14⁺⁺-Zellen abzulösen, wurde die Säule aus dem Dauermagneten entfernt und fünfmal je 2 ml PBS mit dem Stempel kräftig durch die Säule gedrückt. Diese Zellsuspension wurde 5 min bei 400 x g zentrifugiert, das Pellet in MM6-Medium aufgenommen und die CD14⁺⁺-Zellzahl bestimmt.

Als Reinheitskontrolle wurde eine Färbung mit CD14- und CD16-Antikörpern durchgeführt und am Durchflusszytometer analysiert (siehe B.2.2.9).

B.2.2.3 Herstellung von MDM (monocyte derived macrophages) und unreifen dendritischen Zellen (DC) durch in vitro Kultur

Um MDM oder DC zu generieren, wurden auf Zellkulturplatten (24 Vertiefungen, sehr geringe Anhaftung) je 2 x 10⁶ CD14⁺⁺-Monozyten pro Vertiefung ausgesät und 5 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ ausgereift. Dies geschah unter Zugabe von unterschiedlichen Substanzen:

für MDM: + M-CSF (100 ng/ml Endkonzentration)

für unreife DC: + GM-CSF (20 ng/ml Endkonzentration), + IL-13 (50 ng/ml Endkonzentration)

für alternativ aktivierte MDM: + M-CSF (100 ng/ml Endkonzentration), + IL-13 (50 ng/ml Endkonzentration)

Während der 5 Tage in Kultur reifen die Monozyten aus, was sich in der FACS-Analyse an einer Zunahme der Zellgröße und Granularität zeigt.

B.2.2.4 Gewinnung von induziertem Sputum und Isolierung von Sputummakrophagen

Die Probanden inhalierten Kochsalzlösung in verschiedenen Konzentrationen, beginnend mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9%) über 3%ige bis hin zur 5%igen NaCl-Lösung. Dafür standen zwei Inhalationsgeräte zur Verfügung: zunächst wurde das Ultraschall Inhalationsgerät multisonic LS 290 verwendet, später aufgrund verbesserter Qualität und modernerer Technik der Ultraschall-Vernebler eflow. Beide wurden nach Herstellerangaben zusammengesetzt und befüllt. Nach der Inhalation wurde durch forciertes Ausatmen das Sputum ausgeworfen und in einer Petrischale aufgefangen.

Das Gesamt-Sputum wurde mit der zwei- bis vierfachen Menge (je nach gewünschter Verdünnung und Konsistenz des Sputums) an Sputolysin (=DTT) versetzt und zur Homogenisierung ca. 45 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Probe wurde anschließend mit dem gleichen Volumen PBS verdünnt und durch ein 100 µm und 40 µm Zellsieb filtriert. Es folgte eine Zentrifugation von 5 min bei 400 x g. Das Pellet wurde in 3 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer bestimmt (siehe B.2.1.1).

Die Isolierung von Sputummakrophagen wurde durch Rosettierung erreicht. Für die Separation der Makrophagen aus Sputum wurden über spezifische bivalente Antikörper alle nicht gewünschten Leukozyten mit Erythrozyten vernetzt. Durch Dichtegradientenzentrifugation wurde das resultierende Konglomerat sedimentiert und somit von der gewünschten Zellfraktion, die in der Interphase auf dem Dichtekissen verbleibt, getrennt. Zur Zellsuspension wurden 10 µl Erythrozyten (maximal eine Woche alt und im Idealfall vom selben Spender) und 50 µl RosetteSep-Reagenz gegeben und 20 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Mischung in einem klaren 15 ml Röhrchen auf 5 ml Lymphoprep aufgeschichtet und 30 min bei 800 x g zentrifugiert. Die

entstandene Interphase wurde abgenommen, zweimal gewaschen, in MM6-Medium aufgenommen und die Zellzahl ermittelt.

Zur Bestimmung der Reinheit wurden die Zellen vor und nach der Rosettierung mit den Antikörpern CD16b-PE, CD66b-FITC und CD14-PC5 gefärbt und die Proben wurden am Durchflusszytometer gemessen (siehe B.2.2.9).

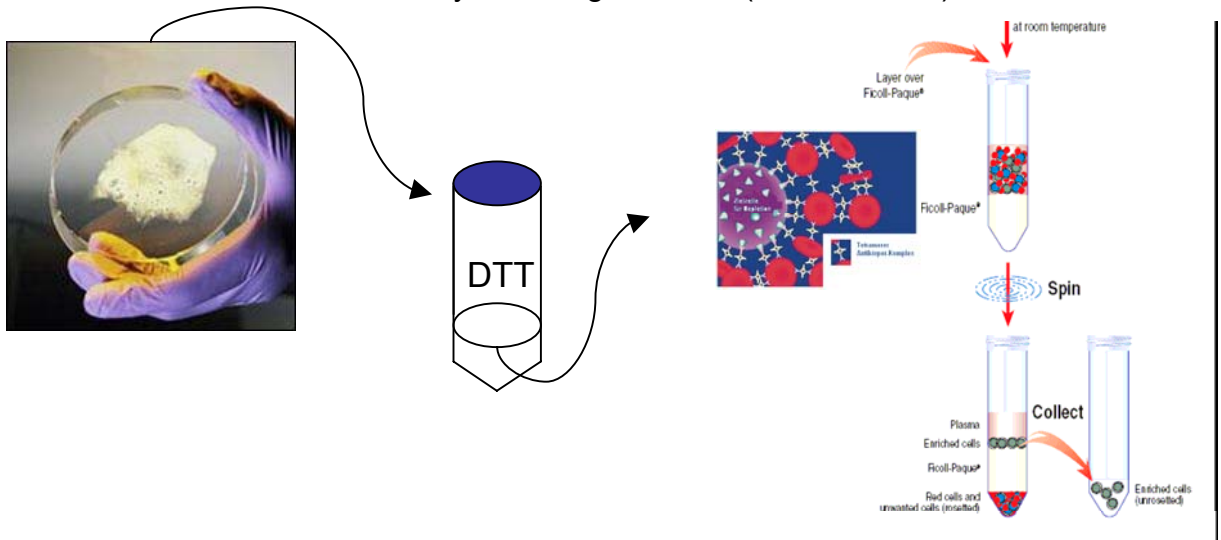


Abbildung 6: Gewinnung von Sputummakrophagen über Rosettierung

B.2.2.5 Gewinnung von Bronchialepithelzellen

Bei Bronchoskopien, die in der Asklepios Fachklinik Gauting durchgeführt wurden, war es möglich durch eine Bürstenbiopsie primäre Bronchialepithelzellen zu gewinnen. Der bronchoskopierende Arzt nahm aus unauffälligen Regionen der Bronchien mit einer Zytologie-Bürste einen Abstrich. Die der Bürste anhaftenden Zellen wurden in 5 ml RPMI Medium ausgewaschen. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt, um genügend Zellmaterial zu gewinnen. Nach einer 5minütigen Zentrifugation bei 400 x g wurde der Überstand verworfen und die Pellets je nach Größe in einem entsprechendem Volumen PBS aufgenommen. Wenn die Probe sehr viel Schleim beinhaltete, folgte eine Inkubation bei 37°C im Wasserbad mit 2 ml Sputolysin, um eine homogenere Lösung zu erhalten. Darauf erfolgte eine erneute Zentrifugation für 5 min bei 400 x g. Die wieder in PBS resuspendierten

Zellen wurden ungezählt weiterverwendet, da sie meist in schlecht vereinzelbaren Konglomeraten vorlagen.

B.2.2.6 Anfertigen von Zytospins

Um isolierte Zellen auch mikroskopisch analysieren zu können, wurden Zytospins angefertigt. Hierzu wurden pro Zytospin ca. 1×10^5 Zellen in 200 μ l PBS aufgenommen und durch Zentrifugation (5 min, 400 x g) auf die Objektträger aufgebracht. Die getrockneten Zytospins wurden nach Herstellerangaben mit Diff-Quik gefärbt und mit Eukitt eingedeckt. Diff-Quik ist eine Schnellfärbemethode, deren Ergebnisse mit denen der Pappenheim-Methode gut vergleichbar sind.

Mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioplan2 und der Digitalkamera iAi protec wurden die Zellen auf den Zytospins dokumentiert.

B.2.2.7 Stimulation

B.2.2.7.1 Partikel und Lipopolysaccharid (LPS)

Um zu untersuchen, ob ultra-feine und feine Partikel Auswirkungen auf die Genexpression in Makrophagen bei Gesunden und COPD-Patienten zeigen, wurden verschiedene Zellarten mit unterschiedlichen Partikeln einzeln oder in Kombination stimuliert. Dabei handelte es sich vor allem um ultra-feines Printex 90 und ultra-feines sowie feines TiO₂, die, wenn nicht anders vermerkt, jeweils in einer Konzentration von 32 μ g / ml eingesetzt wurden. Von den Partikeln wurde jeweils einzeln mit der Feinwaage 1 mg in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß eingewogen und direkt vor Verwendung in 500 μ l RPMI-Medium / 10% FCS suspendiert. Um eine feinere Verteilung zu erreichen, wurde die Suspension 15 min in einem Ultraschallbad inkubiert. Die Partikel-Mischung muss immer vor Verwendung frisch hergestellt werden.

Zusätzlich wurde eine Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) durchgeführt, um die Genexpression im Entzündungsgeschehen zu untersuchen. Das

verwendete LPS ist ein Bestandteil der Bakterienwand von *Salmonella minnesota*. Für die Versuche wurde eine Lösung von 100 µg/ml hergestellt, die bis zu einer Woche verwendet werden kann (Lagerung bei 4°C). Für die Stimulation von Blutzellen wurde eine Konzentration von 10 ng/ml verwendet, bei Sputummakrophagen setzte ich eine Konzentration von 1 µg/ml ein.

B.2.2.7.2 Lipophile Substanzen

Um lipophile Substanzen (z.B. Benzo(a)pyren, α-Naphtoflavon) für Zellen besser verfügbar zu machen, können sie in Liposomen verpackt werden. Dazu wurden Dioleoyl-Phosphoserin (OOPS) und Palmitoyl-Oleoyl-Phosphocholin (POPC) im OOPS / POPC Verhältnis 0,43 in Chloroform gelöst. Die stimulierenden Substanzen wurden ebenfalls in Chloroform gelöst und in den gewünschten Konzentration zu jeweils 500 µl der OOPS / POPC Lösung in einen Rundbodenkolben gegeben. Durch Schwenken und wiederholtes leichtes Erwärmen wurde das Chloroform verdampft. Um den Chloroformdampf vollständig aus dem Kolben zu entlassen, wurde dieser kurz mit der Öffnung nach unten gedreht. Zum trockenen Lipidfilm wurden 1 ml PBS und ca. 20 Glaskügelchen gegeben, um die Lipide mechanisch durch Schwenken vom Kolben abzulösen. Die nun entstandenen Liposomen wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und auf höchster Stufe 30 min zentrifugiert. Danach wurde das Volumen auf 500 µl reduziert.

Die fertigen Liposomen können bei 4°C gelagert werden. Für eine Stimulation wurden die Liposomen in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt.

B.2.2.8 Lysate

Aus dem Stimulationansatz wurde nach gewünschter Stimulationsdauer eine bestimmte Zellzahl (2×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5) mit 200 µl TriReagent (phenol- und thiocyanathaltig) lysiert und gut gemischt. Die Zelllysate können bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

B.2.2.9 Durchflusszytometrie mit dem FACS (Durchflusszytometer)

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse der Fluoreszenz- (über Oberflächenmarker) und Streulichteigenschaften (Größe, Granularität) von Einzelzellen in Suspension. Dabei können die Zellen mittels spezifischer, fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper anhand ihrer Oberflächenantigene charakterisiert werden, was eine Unterteilung von Zellen mit ähnlichen lichtstreuenden Eigenschaften, woraus sich morphologische Eigenschaften ableiten lassen, ermöglicht. Die zu untersuchende Zellsuspension wird über eine Kapillare mit leichtem Druck in den Messbereich befördert, wobei ein feiner Flüssigkeitstrahl entsteht, in dem sich die Zellen einzeln und perlenkettenartig aneinandergereiht von oben nach unten bewegen. Diese Zellsuspension passiert einen Laserstrahl. Jede Zellart streut entsprechend ihrer Größe, der Struktur ihrer Zellmembran und der Art ihrer intrazellulären Bestandteile das auftreffende Licht in spezifischer Weise. Ein Teil des Lichtes wird vorwärts gestreut, wobei das Vorwärtsstreulicht (forward light scatter, FSC) ein Maß für die Größe der Zelle darstellt. Ein weiterer Teil des Lichtes wird im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreut und als Seitwärtsstreulicht (sideward light scatter, SSC) bezeichnet. Die Stärke der Seitwärtsstreuung ist von der Granularität der Zelle abhängig. Zusätzlich können die zu bestimmenden Zellen mit monoklonalen Antikörpern markiert werden, die ihrerseits mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert sind. Diese Farbstoffe werden vom Laser angeregt und emittieren daraufhin Licht unterschiedlicher Wellenlängen.

Für die Reinheitsbestimmung der isolierten CD14-Monozyten wurde ein FITC-markierter Antikörper gegen das Oberflächenmolekül CD14 und ein PE-markierter Antikörper gegen das Oberflächenmolekül CD16 verwendet.

Die isolierten Sputumproben wurden vor und nach dem Rosettierungsschritt mit den Antikörpern CD16b-PE, CD66b-FITC und CD14-PC5 gefärbt, um die Reinheit der isolierten Sputummakrophagen bestimmen und kleine von großen Sputummakrophagen unterscheiden zu können. Im vom Hersteller angegebenen Verhältnis wurden die Antikörper der Zellsuspension zugegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen in 600

µl PBS aufgenommen und am EPICS oder FACSCalibur Durchflusszytometer gemessen.

B.2.3 Molekularbiologische Methoden

B.2.3.1 Isolierung von mRNA

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurden dem Lysat (siehe B.2.2.8) 3 µl tRNA (5,67 µg/ml) zur besseren Fällung zugesetzt. Um die RNA zu extrahieren wurden 40 µl Chloroform zum Homogenat gegeben und dieses 20 sek gemischt. Einer Inkubation von 20 min bei RT folgte eine Zentrifugation (20 min, 20 000 x g, 4°C), um die Phasentrennung zu erreichen. In der farblosen, wässrigen Phase befindet sich die RNA, die vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Für die RNA-Präzipitation wurde zur wässrigen Phase das gleiche Volumen an Isopropanol gegeben und 20 min bei RT inkubiert. Die RNA wurde in einer 20-minütigen Zentrifugation (20 000 x g, 4°C) pelletiert und mit 150 µl Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation (20 min, 20 000 x g, 4°C) wurde der Überstand vollständig abgenommen, das Pellet in 20 µl DEPC-Wasser gelöst und auf Eis gestellt.

B.2.3.2 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die RNA-Menge wurde photometrisch bestimmt. Mithilfe des NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometers misst man die Absorption von 1 µl RNA bei 260 nm. Die RNA-Menge wurde nach der Lambert-Beer-Gleichung berechnet:

$$c = (A \cdot e) : b$$

Hierbei ist c die zu berechnende RNA Konzentration in ng/ml, A die Absorption, e der wellenlängen-abhängige Extinktionskoeffizient und b die Messstrecke. Proteine absorbieren Licht bei 280 nm Wellenlänge. Durch den Quotienten der Absorptionen bei 260 und 280 nm können Protein-Verunreinigungen in der RNA festgestellt werden. Für eine qualitativ hochwertige RNA-Präparation sollte der Quotient zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Die gelöste mRNA kann bei -20°C gelagert werden.

B.2.3.3 Reverse Transkription (RT)

Zur anschließenden Amplifikation von Zielgenen wurde die isolierte mRNA durch das Enzym reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Für die Reaktion wurden 4 µl der Probe eingesetzt, bei der die niedrigste Konzentration gemessen wurde. Um von allen Proben die gleiche Konzentration einzusetzen, wurden die Volumina der anderen Proben entsprechend angepasst (Volumenausgleich mit DEPC-Wasser). Vor der Transkription wurde die RNA 10 min bei 70°C im Heizblock inkubiert, um Sekundärstrukturen aufzubrechen. Anschließend wurde die RNA sofort auf Eis gestellt, damit mögliche Rückfaltungen vermieden werden. Zur RNA wurden 17 µl des Transkriptions-Mixes gegeben.

Reaktionsansatz		
	MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
	10 x PCR-Puffer	2 µl
	Oligo d(T) (50µM)	1 µl
	dNTP (10 mM)	8 µl
	RNAse Inhibitor (20U/µl)	1 µl
	Reverse Transkriptase (50U/µl)	1 µl
	RNA	4 µl

Tabelle 8: RT-Transkriptions-Mix

Dieses Reaktionsgemisch wird mit ca. 5µl Mineralöl überschichtet und im Thermoblock bei 42°C für 30 min umgeschrieben. Die Inaktivierung der reversen Transkriptase erfolgte bei 99°C für 5 min.

Die so gewonnene cDNA kann bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

B.2.3.4 Real-time-PCR

Mit dem LightCycler[®] kann eine quantitative PCR durchgeführt werden, die im Gegensatz zur herkömmlichen PCR eine exakte Quantifizierung der Ziel-DNA ermöglicht und somit Änderungen in der Genexpression erkennen lässt. Dem PCR-Ansatz wird der in doppelsträngige DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green zugesetzt. Die Fluoreszenzintensität nimmt bis einschließlich der exponentiellen Phase direkt proportional mit der Menge an Doppelsträngen zu. Am Ende jeder Elongationsphase erfolgt eine Messung des Fluoreszenzsignals. Je mehr initiale DNA vorliegt, desto weniger Zyklen sind notwendig bis der Punkt erreicht wird, an dem das Fluoreszenzsignal höher ist als der Fluoreszenzhintergrund. Diesen Punkt bezeichnet man als C_t -Wert (Threshold-Cycle). Der C_t -Wert ermöglicht, verschiedene mRNA-Konzentrationen zu bestimmen und untereinander zu vergleichen.

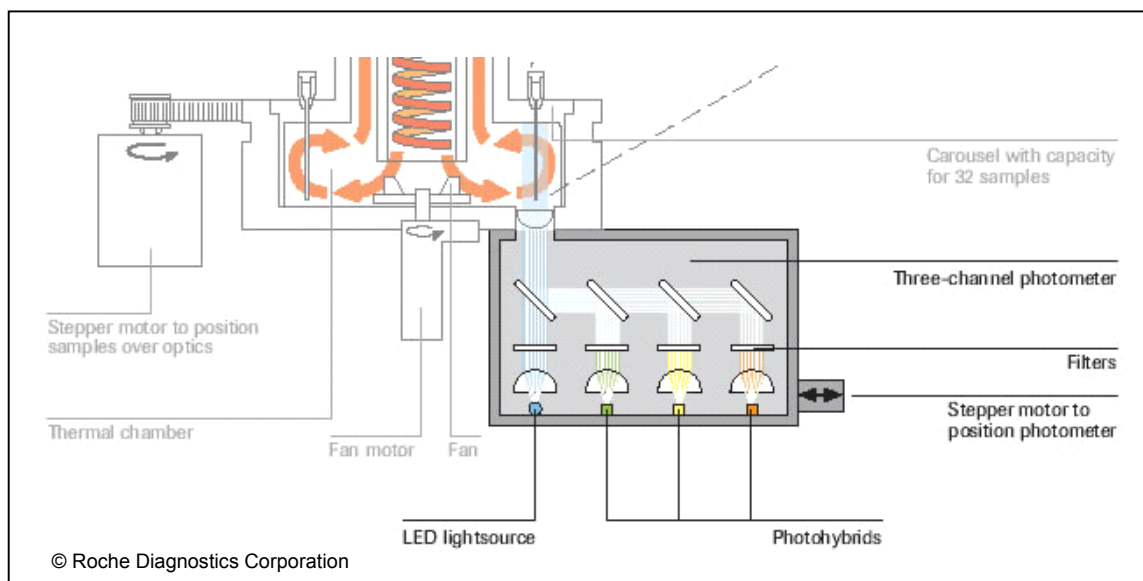


Abbildung 7: Light Cycler Technologie (Quelle: Roche)

In der vorliegenden Arbeit wurde die quantitative real-time PCR mit dem LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit von Roche durchgeführt.

Reaktionsansatz		
	H ₂ O	10,8 µl
	MgCl ₂ (25 mM)	3,2 µl
	5'-Primer (15 µM)	0,5 µl
	3'-Primer (15 µM)	0,5 µl
	SYBR Green	2 µl

Tabelle 9: Reaktionsansatz für die LightCycler-PCR

Alle verwendeten Primer sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Zu den 17 µl des Reaktionsgemisches in einer Kapillare wurden je 3 µl cDNA gegeben. Der Ansatz wurde kurz zentrifugiert, die Kapillaren in das LightCycler Karussell eingesetzt und das folgende Amplifikationsprogramm ausgeführt.

Vorgang	Zyklus	Temperatur (°C)	Zeit (sek)
Denaturierung	1	95°C	600
Amplifizierung	45	95°C	0
		60°C	10
		72°C	25
Schmelzen	1	95°C	0
		60°C	10
		95°C	0
Kühlen	1	40°C	30

Tabelle 10: Amplifikationsprogramm

Wenn die Anzahl der in einer Probe vorliegenden Kopien bestimmt werden sollte, wurde für die PCR der ready-to-use Kit (#447645, #487553, search LC, Heidelberg) verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Ermöglicht wird die genaue Bestimmung der Kopienzahl durch das Erstellen einer Standardkurve. Diese entstand durch Titration eines mitgelieferten Plasmids, dessen Kopienzahl bekannt ist. Wenn bei den zu bestimmenden Proben eine

bekannte Probe mitgeführt wurde, konnte die Standardkurve zur Auswertung herangezogen werden, um so die Kopienzahl zu errechnen.

B.2.3.5 Gelelektrophorese

Um bei neuen Primerpaaren zu überprüfen, ob das synthetisierte DNA-Amplifikat die gewünschte Größe besitzt, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die cDNA wurde auf ein 2%iges Agarosegel mit 0,5 mg/ml Ethidiumbromid und 0,5fachem TBE-Laufpuffer aufgetragen (10 µl Probe + 1µl Auftragspuffer) und der DNA-Molecular-Weight-Marker VI (154 – 2176 bp) als Längenstandard mitgeführt. Die DNA-Fragmente wurden bei 120 V für ca. 60 min aufgetrennt und anschließend unter UV-Beleuchtung als fluoreszierende Banden mit einem Polaroid-Film (Black and White Print Film Type 667) fotografiert.

B.2.3.6 Auswertung der LC-PCR Ergebnisse

Zur Auswertung der PCR wurden die Schmelz- und Fluoreszenzkurven verwendet. Durch die spezifische Schmelztemperatur kann ein Produkt identifiziert werden, anhand der unterschiedlichen Fluoreszenzkurven können die cDNA-Mengen in den einzelnen Proben miteinander verglichen werden. Mithilfe der parallel zum Zielgen amplifizierten α -Enolase (Housekeeping-Gen) wurden die Probenwerte korrigiert, d.h. man bildet die Differenz aus Zielgen und Enolase und berechnet dafür die Potenz von 2. Für Gene, die in einem späteren Zyklus als die α -Enolase die Hintergrundfluoreszenz überschreiten, d.h. also von denen weniger Transkripte vorliegen, wurde der berechnete Wert mit negativem Vorzeichen angegeben.

B.2.3.7 Analyse der mRNA-Stabilität von CYP1B1 mit Hilfe von ActinomycinD

Ein erniedrigter mRNA-Spiegel eines bestimmten Gens nach Inkubation mit einem Stimulus kann sowohl durch verminderte Stabilität des Transkriptes als auch durch verminderte Neusynthese verursacht werden.

Zur Analyse mRNA-Stabilität von CYP1B1 wurde Actinomycin D eingesetzt. Diese Substanz wurde aus Streptomyzeten isoliert und hemmt die Transkription durch Interkalierung: dabei wird das Basenpaar Guanin-Cytosin „verklebt“ und so die Ablesung der DNA verhindert. Actinomycin D wird deshalb als Inhibitor der RNA-Synthese in Eukaryotenzellen verwendet. Ab dem Applikationszeitpunkt kann keine Transkription mehr stattfinden.

Um die mRNA Mengen im zeitlichen Verlauf darzustellen, wurden zunächst 1×10^7 PBMC in 1 ml MM6-Medium 5 min mit 32 µg/ml P90 stimuliert. Mit dem lyophilisierten ActinomycinD wurde eine Stammlösung von 1 mg/ml MM6-Medium hergestellt. Die Zellen wurden mit einer Endkonzentration von 1 µg/ml behandelt, um die RNA-Transkription zu inhibieren. Nach 0 min, 10 min, 30 min, 1h, 3h, 6h und 22h werden die Zellen lysiert und die relativen mRNA-Mengen durch RT-PCR bestimmt.

B.2.4 Proteinnachweis

B.2.4.1 Isolierung von Mikrosomen

Da das CYP1B1 Protein zum größten Teil im endoplasmatischen Retikulum verankert vorliegt, wurden zur Protein-Gewinnung Mikrosomen isoliert.

Dazu wurden Calu-3 Zellen auf Zellkulturplatten mit sechs Vertiefungen ausgesät ($2,5 \times 10^6$ in 3 ml / Vertiefung). Diese adhärirten mindestens 30 min, bevor die 32-stündige Stimulation mit P90 (32 µg/ml) begann. Danach wurden die stimulierten Zellen von den Kulturplatten mit dem Zellschaber abgelöst und 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde im vierfachen Volumen Puffer A mit Proteaseinhibitoren aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte 8-mal hintereinander ein Wechsel zwischen je 10 sec Ultraschall und Inkubation

auf Eis. Danach wurden die lysierten Zellen 10 min bei 3000 x g (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und 15 min bei 12000 x g (4°C) zentrifugiert. Für den folgenden 2-stündigen Zentrifugationsschritt in einer Beckman Ultrazentrifuge bei 25000 rpm (Rotor JA-25.50) wurden spezielle Beckman Zentrifugegefäße verwendet. Das so gewonnene Pellet stellte die isolierten Mikrosomen dar und wurde im entsprechenden Volumen Puffer D mit Proteaseinhibitoren und 0,1% SDS gelöst.

B.2.4.2 Messung des Proteingehalts

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford. In Gegenwart von Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Coomassie-Brilliantblaus (Farbstoff des Bradford-Reagenz) von 465 zu 595 nm, was im Spectrophotometer gemessen werden kann.

Für die Messung wurde in einer 96-Loch-Platte der BSA-Standard nach folgendem Muster aufgetragen: 0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 und 2,0 µg BSA pro ml in 150 µl BioRad Farblösung (jeweils in Doppelwerten). Die Proben, deren Proteingehalt bestimmt werden sollte, wurden entsprechend verdünnt und ebenfalls in Duplikaten gemessen.

B.2.4.3 Western Blot

Für diese Methode wurden die isolierten Mikrosomen der Calu-3 Zelllinie verwendet. Dazu wurden gleiche Gesamtproteinmengen (10 µg) zusammen mit 1/4 Volumen Proben Puffer auf NuPage™ Bis-Tris-Gele (4-12%, Invitrogen) aufgetragen und in einer NOVEX EI9001-XCELL™ II Mini Cell Kammer mit NuPage™ MOPS-SDS Puffer als Laufpuffer aufgetrennt. Als Größen-Marker wurde SeeBlue® Plus2 von Invitrogen eingesetzt.

Das Blotting des Gels erfolgte mindestens 120 min lang auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond™ ECL™) mit NuPage™ Transferpuffer.

Anschließend wurde die Membran 30 min mit 5% Magermilchpulver in TBS/0,05% Tween 20 inkubiert. Über Nacht folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (Verdünnung 1:1000 5% Magermilchpulver in TBS/0,05% Tween) bei 4°C. Zum Entfernen des nicht-gebundenen Antikörpers wurde die Membran zweimal unter laufendem Wasser und zweimal mit TBS/0,05% Tween 20 gespült. Es folgten drei weitere Waschschriffe (20 min und zweimal 10 min) mit TBS/0,05% Tween 20. Vor Zugabe des sekundären Antikörpers wurde die Membran erneut 30 min mit 5% Magermilchpulver in TBS/0,05% Tween 20 inkubiert. Der sekundäre Antikörper (mit Peroxidase konjugiert) wurde dann in einer Verdünnung von 1:750 in TBS/0,05% Tween 20/5% Magermilchpulver für 1 h auf die Membran gegeben. Nach den oben beschriebenen Waschvorgängen erfolgte die Detektion mit den ECL™ Western Blotting Detection Reagents nach Anleitung. Die Exposition des Hyperfilm™ ECL auf der Membran wurde im Dunkeln in einer Röntgenfilmkassette durchgeführt. Die Expositionszeit variierte, unter anderem in Abhängigkeit vom primären Antikörper.

Zur Entwicklung des Films wurde dieser je 5 min in ein Entwicklungs- bzw. Fixierungsbad gelegt, anschließend gut mit Wasser gespült und getrocknet. Die densitometrische Auswertung erfolgte mithilfe des Programms ImageJ, die Statistik wurde mit Excel erstellt.

B.2.4.4 Nachweis von CXCR4-Protein durch Durchflusszytometrie

Unterschiedliche Expressionen von Oberflächenrezeptoren können durch FACS-Analyse nachgewiesen werden. Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu erkennen, werden so genannte Isotyp-Kontrollen in die Analysen integriert. Als solche dienen Antikörper, die genauso markiert sind wie der Primärantikörper und dem gleichen Isotyp entsprechen, allerdings kein spezifisches Epitop erkennen.

Die zu färbenden Zellen (mindestens 2×10^4) wurden in einem Volumen von 50 μ l PBS/2%FCS gefärbt. Der unmarkierte, primäre Antikörper (anti-CXCR4) und der entsprechende Isotyp (IgG2b) wurden in der Verdünnung 1:10 zugesetzt.

Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurde nicht gebundener Antikörper durch 5 min Waschen mit PBS/2% FCS bei 400 x g entfernt. Hierauf erfolgte 20 min auf Eis die Färbung mit dem sekundären Antikörper (goat anti mouse FITC, Verdünnung 1:50). Wenn noch ein weiterer Oberflächenmarker für die Gating-Strategie benötigt wurde und angefärbt werden sollte, mussten freie Bindestellen nach einem weiteren Waschschrift mit MOPC21 geblockt werden (10 min auf Eis, 3 µl auf 50 µl). Ohne zu waschen wurde danach der direkt markierte, primäre CD14-PC5 Antikörper (1:20) zugegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, in 750 µl PBS/2% FCS aufgenommen und am Durchflusszytometer gemessen.

B.2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem Excel-Programm Student's t-Test durchgeführt. Werte, die kleiner als 0,05 sind, wurden als signifikant bezeichnet und sind in den Abbildungen mit * gekennzeichnet.

C Ergebnisse

C.1 Genexpression in Sputummakrophagen

C.1.1 Aufreinigen von Sputummakrophagen

Um Sputummakrophagen zu isolieren, wurde zunächst durch Inhalation von Kochsalzlösung Sputum induziert. Das gewonnene Sputum wurde homogenisiert und die Sputummakrophagen wurden mit dem RosetteSep-Verfahren von den restlichen Leukozyten getrennt (B.2.2.4). Vor und nach dem RosetteSep-Schritt wurde jeweils eine Färbung angefertigt (siehe B.2.2.9), um die Reinheit der isolierten Makrophagen zu bestimmen. Die folgenden zwei Abbildungen zeigen Dot Blots aus einer FACS-Analyse eines COPD-Patienten vor und nach Aufreinigung mit RosetteSep. Die blauen Pfeile kennzeichnen die Lage der Granulozyten, die ein hohes Seitwärtsstreulicht aufweisen und damit sehr granulär sind. Sie sind zudem CD66b-positiv und daher in den abgebildeten Blots auf der y-Achse an höherer Position als die Makrophagen gelegen. Im jeweils linken Dot Blot kennzeichnet die als „H“ eingezeichnete Region die Lage der Granulozyten, in den Bereiche „A“ und „E“ sind die Makrophagen (nach Größe getrennt) zu finden und „D“ fasst alle Zellen zusammen. Die Regionen „J“ und „I“ in den beiden rechten Blots beinhalten auch Makrophagen, wobei sich in I die kleineren Zellen zeigen.

In Abbildung 8 sind die Granulozyten-Ereignisse deutlich zu erkennen, wohingegen sie in Abbildung 9 nach erfolgreicher Aufreinigung eliminiert sind. Dies zeigt, dass es durch diese Methode möglich ist, eine saubere Makrophagenpopulation aus Sputum zu gewinnen.

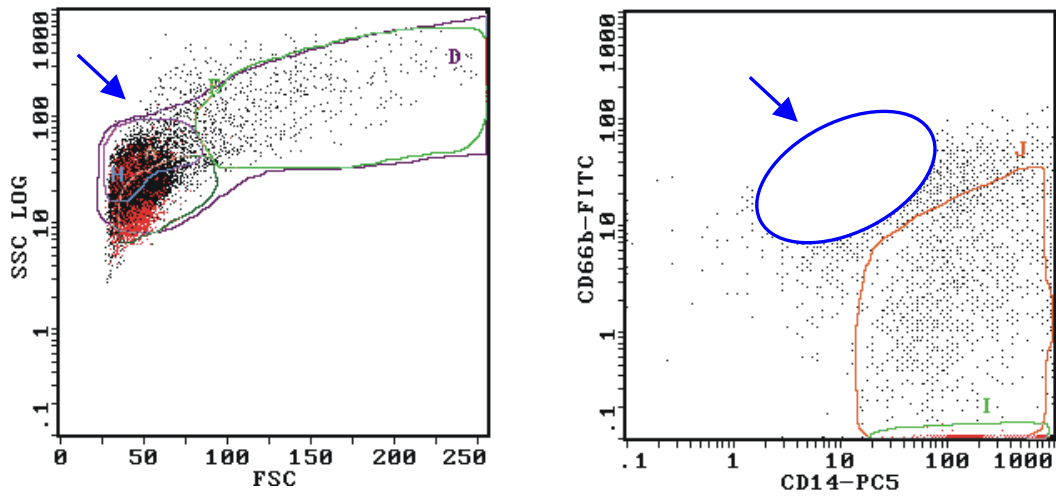


Abbildung 8: FACS-Dot Blots einer Sputumprobe eines COPD-Patienten vor Aufreinigung durch Rosettierung

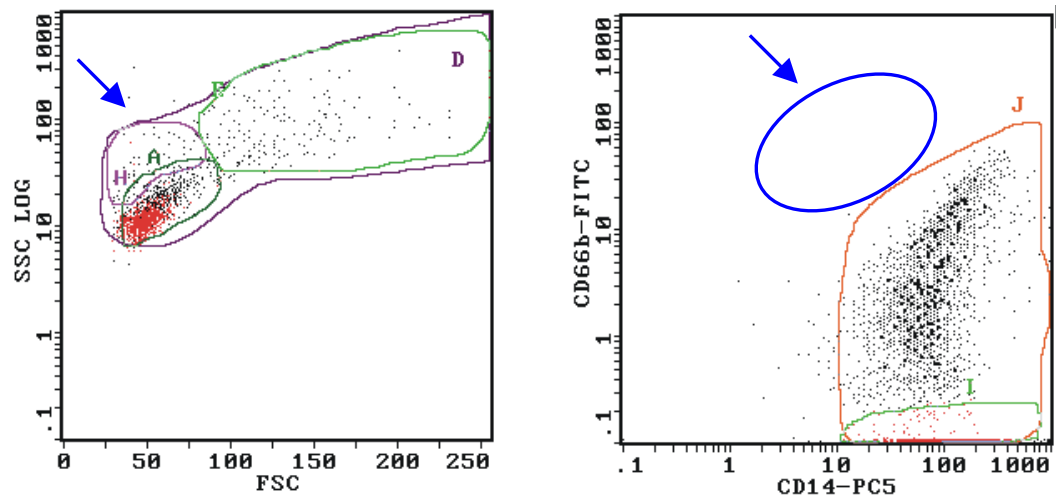


Abbildung 9: FACS-Dot Blots einer Sputumprobe eines COPD-Patienten nach Aufreinigung durch Rosettierung

Die Aufreinigung durch RosetteSep liefert zuverlässige Ergebnisse und zeichnet sich durch gute Reproduzierbarkeit aus. Bei sehr großen Ausgangsmengen von Granulozyten kann es in seltenen Einzelfällen dazu kommen, dass diese nicht alle entfernt werden können. Auch können z.T. Verunreinigungen durch Epithelzellen auftreten, die sich im Rosettierungsschritt

mit in der Interphase anreichern. Im Normalfall werden aber Reinheiten von über 80% Makrophagen erzielt.

C.1.2 Die Population der kleinen Sputummakrophagen

In den aufgereinigten Sputummakrophagen können durch die in B.2.2.9 beschriebene Färbung und eine spezielle Gating-Strategie zusätzlich zwei Subpopulationen unterschieden werden. Diese Unterscheidung beruht zunächst vor allem auf ihrer Größe, weshalb sie als große und kleine Sputummakrophagen bezeichnet werden. Abbildung 10 zeigt die unterschiedliche Lage der zwei Untergruppen im forward scatter. Im linken Dot Plot sind die gereinigten Makrophagen eines gesunden Nichtrauchers zu sehen, die im Vorwärtsstreulicht hauptsächlich im rechten Quadranten N4 dargestellt werden. Die Lage der Zellen eines COPD-Patienten (rechter Dot Plot) verschiebt sich deutlich nach links in den Quadranten N3, was darauf hinweist, dass diese Sputummakrophagen wesentlich kleiner sind als die des Gesunden.

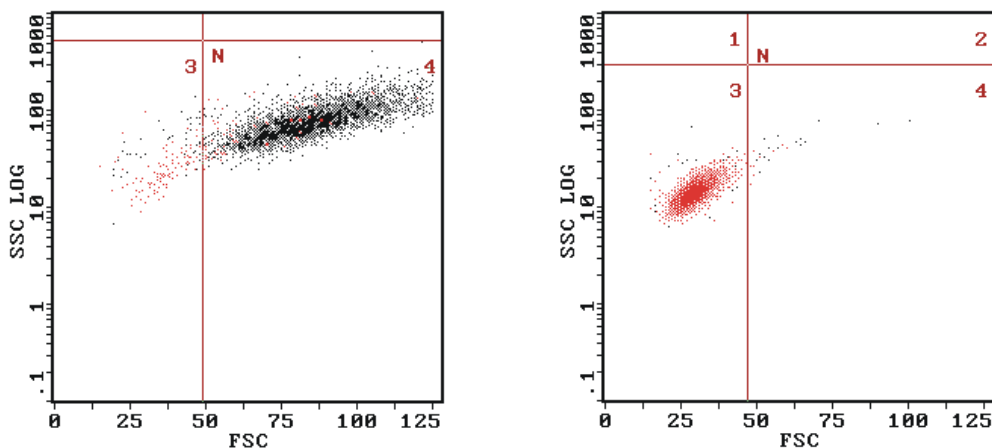


Abbildung 10: Makrophagen-Populationen nach Aufreinigung mit RosetteSep (linker Dot Plot: Probe eines gesunden Spenders, rechter Dot Plot: Probe eines COPD-Patienten)

Um zu zeigen, dass die niedrigen forward scatter-Signale tatsächlich eine geringere Größe der Zellen anzeigen, wurden von den gereinigten Makrophagen Zytospin-Präparate angefertigt und gefärbt. Diese Befunde

stimmen mit denen der FACS-Messungen überein, nämlich dass die als kleine Makrophagen beschriebenen Zellen tatsächlich einen geringen Durchmesser aufweisen. Zusätzlich können durch die mikroskopische Differenzierung noch Aussagen über mögliche Verunreinigungen durch Epithelzellen in der Sputumprobe gemacht werden. Abbildung 11 zeigt Aufnahmen von Zytospin-Präparaten in 100facher Vergrößerung. Nach Ross variiert der Durchmesser von Makrophagen zwischen 25 und 50 μm (Ross 2002). Im linken Bild sind Sputummakrophagen eines gesunden Nichtrauchers zu sehen, die mit einem Durchmesser von ca. 20 μm der Gruppe der großen Makrophagen zugeordnet werden können. Die Sputummakrophagen eines COPD-Patienten sind in der rechten Aufnahme abgebildet. Im direkten Vergleich ist der Größenunterschied zwischen Makrophagen eines gesunden Rauchers und eines COPD-Patienten (in Exazerbationsphase) deutlich erkennbar. Die Makrophagen der kleinen Population haben einen Durchmesser von ca. 10 μm . Das entspricht annähernd der Größe der Granulozyten oder Monozyten (nach Burke 12-15 μm), was auch zur ähnlichen Lage von kleinen Sputummakrophagen und Neutrophilen im forward scatter passt.

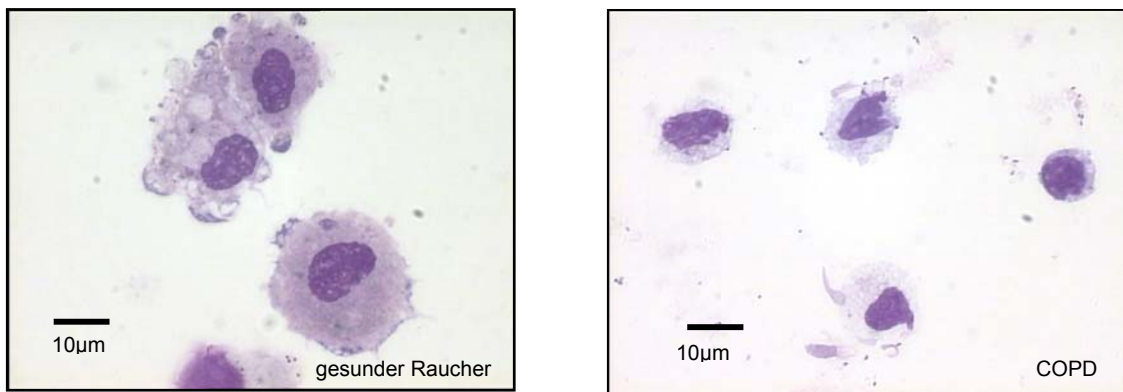


Abbildung 11: 100fache Vergrößerung von Sputummakrophagen (Zytospin).

Der Anteil der kleinen Sputummakrophagen wurde in unterschiedlichen Kollektiven durch oben beschriebene Methoden bestimmt. Als Kontroll-Kollektiv dienten gesunde Nichtraucher ($n=6$). Bei ihnen lag der Anteil der kleinen Sputummakrophagen aller Makrophagen im Mittel bei $11\pm 8\%$. Die zweite Gruppe wurde von gesunden Rauchern mit einem Zigarettenkonsum von durchschnittlich 34 pack years gebildet (1 pack year = 1 Schachtel Zigaretten

pro Tag für ein Jahr). In dieser Gruppe (n=4) zeigte sich eine Zunahme der kleinen Makrophagen auf $60 \pm 15\%$. COPD-Patienten wurden noch zusätzlich in zwei Untergruppen eingeteilt: ambulante Patienten, die sich in stabiler Phase ihrer COPD Erkrankung befinden und Patienten, die sich aufgrund einer Exazerbation stationärer behandelt werden. Die Probenentnahme bei den stationären Patienten fand ca. eine Woche nach Einlieferung statt. Die durchschnittliche Zahl der pack years lag bei den stabilen Patienten bei 54, wobei vier der fünf Probanden seit mindestens 10 Jahren nicht mehr rauchten. Die kleinen Makrophagen der stabilen COPD-Patienten erreichten den Rauchern vergleichbare Werte von rund $60 \pm 22\%$. Bei Patienten in der Exazerbationsphase hingegen überwog die kleine Population deutlich. Im Mittel fanden sich im Sputum der 9 untersuchten Exazerbationspatienten $88 \pm 7\%$ kleine Makrophagen, in Einzelfällen waren diese aber bis zu 98% angestiegen. Die Anzahl der kleinen Sputummakrophagen korrelierte weder mit der Anzahl der pack years, die in diesem Kollektiv durchschnittlich bei 41 ± 36 lag, noch mit der Zeitspanne seit Aufgabe des Tabakkonsums. Zusammenfassend ist ein Vergleich der einzelnen Kollektive in Abbildung 12 dargestellt.

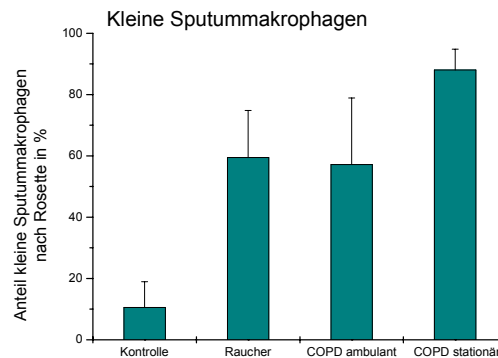


Abbildung 12: Prozentualer Anteil der kleinen Sputummakrophagen in der gesamten Makrophagen-Population, Vergleich von unterschiedlichen Spenderkollektiven (Kontrollen n=6, Raucher n=4, COPD ambulant n=5, COPD stationär n=9, MW ± SD)

C.1.3 Zytokinexpression in Sputummakrophagen

Da es sich bei COPD um eine entzündliche Lungenerkrankung handelt und die Entzündung zu einem erheblichen Teil von Zytokinen bestimmt wird, habe ich zunächst die Zytokinexpression in Sputummakrophagen untersucht. Die konstitutiven mRNA-Expressionen von IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF und TGF β wurden bestimmt und zwischen den Gruppen der Nichtraucher, Raucher und COPD-Patienten verglichen.

Bei Rauchern (11 ± 7) und COPD-Patienten (sowohl stabile Patienten (10 ± 4) als auch Patienten mit Exazerbation (8 ± 4)) konnte eine erhöhte konstitutive mRNA Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-8 im Vergleich zu Gesunden (3 ± 1) beobachtet werden (siehe Abbildung 13), was auf eine chronische Entzündung hinweisen könnte.

Die Expressionen von IL-1 β und IL-6, die beide auch entzündungsfördernd wirken, waren bei COPD-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern 2fach bzw. 10fach niedriger (ohne Abbildung).

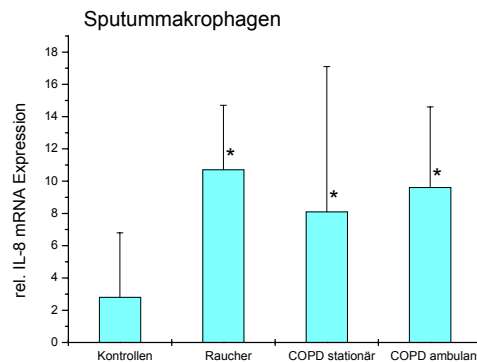


Abbildung 13: Konstitutive IL-8 mRNA-Expression in Sputummakrophagen, dargestellt relativ zu α -Enolase (Kontrollen n=4, Raucher n=4, COPD stationär n=9, COPD ambulanz n=5, MW \pm SD, * = p < 0,05 bezogen auf Kontrollen).

Um die Zytokinexpression in vitro zu induzieren, wurden auch Stimulationsexperimente mit LPS durchgeführt. Bei allen hier untersuchten Zytokinen war die Genexpression nach 3-stündiger Behandlung mit 1 μ g

LPS/ml im Vergleich zur unbehandelten Probe nach 3h weder bei den gesunden Kontrollen noch bei den COPD-Patienten erhöht (Tabelle 11).

Gen	Kontrollen		COPD	
	3h ohne	3h LPS	3h ohne	3h LPS
IL-1 β	11 \pm 6	13 \pm 7	11 \pm 5	12 \pm 6
IL-6	3 \pm 1	3 \pm 1	-3 \pm 1	-3 \pm 1
IL-8	34 \pm 14	39 \pm 10	26 \pm 12	26 \pm 9
IL-10	-83 \pm 72	-56 \pm 30	-27 \pm 29	-27 \pm 24
TGF β	-10 \pm 3	-10 \pm 6	-17 \pm 8	-18 \pm 12
TNF	6 \pm 3	7 \pm 4	2 \pm 0	1 \pm 2

Tabelle 11: Expression der mRNA verschiedener Zytokine nach 3h \pm 1 μ g LPS/ml

In Abbildung 14 ist zu erkennen, dass TGF β bei stationären COPD-Patienten im Vergleich zu den anderen Kontrollgruppen signifikant weniger exprimiert wird. Diese geringere Expression könnte die Entzündung bei einer Exazerbation weiter verstärken, da TGF β als antiinflammatorisches Zytokin bekannt ist.

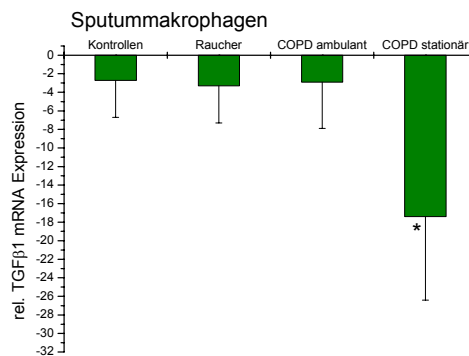


Abbildung 14: Konstitutive TGF β mRNA-Expression in Sputummakrophagen, dargestellt relativ zu α -Enolase (Kontrollen n=4, Raucher n=4, COPD ambulant n=5, COPD stationär n=9, MW \pm SD, * = p < 0,05 bezogen auf Kontrollen).

Die weiteren untersuchten Zytokine lieferten keine aussagekräftigen Expressionsunterschiede zwischen gesunden Spendern und COPD-Patienten.

Zur besseren Übersicht sind in Tabelle 12 die konstitutiven mRNA-Expressionsniveaus aller in den verschiedenen Kollektiven untersuchter Cytokine zusammenfassend dargestellt. Die Werte beziehen sich relativ auf die mRNA-Expression der α -Enolase (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Gen	Kontrollen	Raucher	COPD stationär
IL-1 β	11 \pm 6	11 \pm 9	5 \pm 4
IL-1 RA	-0 \pm 2	-1 \pm 2	0 \pm 2
IL-6	-5 \pm 2	-8 \pm 8	-46 \pm 43
IL-8	3 \pm 1	11 \pm 7	8 \pm 4
IL-10	-44 \pm 37	-17 \pm 22	-35 \pm 26
TGF β	-3 \pm 4	-3 \pm 1	-17 \pm 13
TNF	-5 \pm 2	-8 \pm 11	-3 \pm 3

Tabelle 12: Konstitutive mRNA Expressionen der untersuchten Cytokine, dargestellt relativ zu α -Enolase \pm SD.

Da bei IL-8 ein deutlicher Unterschied in den Expressionen beobachtet werden konnte und es auch zur Untergruppe der Chemokine gehört, sollten diese aufgrund ihrer bedeutenden Rolle im Entzündungsgeschehen genauer auf Expressionsunterschiede hin untersucht werden.

C.1.4 Expression der Chemokinrezeptoren CCR5, CCR9, CXCR1 und CXCR2 in Sputummakrophagen

Chemokine stellen eine spezielle Untergruppe der Zytokine dar, die chemotaktische Eigenschaften aufweisen. IL-8 zählt sowohl zur Gruppe der Zytokine als auch der Chemokine. Da diese im entzündlichen Prozess auch eine Rolle spielen können, wurden verschiedene Chemokinrezeptoren bezüglich ihrer mRNA Expression untersucht und ebenfalls zwischen Nichtrauchern (Kontrollen), Rauchern und COPD-Patienten (stabil und in Exazerbation) verglichen.

Bei den Rezeptoren CCR5, CCR9 und CXCR2 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Bei CXCR1 zeigte sich bei COPD-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung der mRNA um Faktor 2,6 (Abbildung 15).

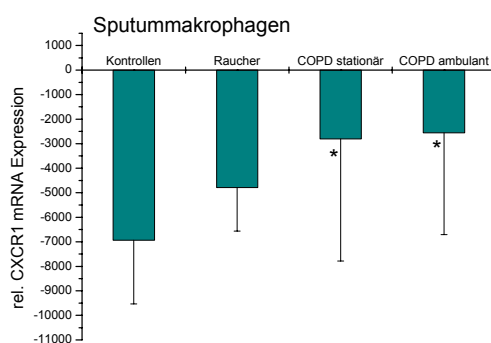


Abbildung 15: Konstitutive mRNA-Expression des Chemokinrezeptors CXCR1 in Sputummakrophagen, dargestellt relativ zu α -Enolase (Kontrollen n=6, Raucher n=4, COPD stationär n=8, COPD ambulanz n=5, MW \pm SD, * = p < 0,05 bezogen auf Kontrollen).

Zur besseren Übersicht sind in Tabelle 13 die konstitutiven mRNA-Expressionsniveaus aller in den verschiedenen Kollektiven untersuchter Chemokinrezeptoren zusammenfassend dargestellt. Die Werte beziehen sich relativ auf die mRNA-Expression der α -Enolase (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Gen	Kontrollen	Raucher	COPD
CCR5	-218 \pm 143	-113 \pm 41	-79 \pm 50
CCR9	-32295 \pm 37879	-7871 \pm 5568	-18360 \pm 35398
CXCR1	-6935 \pm 2597	-4788 \pm 1779	-2711 \pm 4493
CXCR2	-575 \pm 299	-1369 \pm 462	-1553 \pm 2730

Tabelle 13: Konstitutive mRNA Expressionen der untersuchten Chemokinrezeptoren, dargestellt relativ zu α -Enolase \pm SD.

C.1.5 Der Chemokinrezeptor CXCR4

C.1.5.1 mRNA-Expression

Der deutlichste Unterschied zwischen den Expressionen in den Vergleichskollektiven zeigte sich beim Rezeptor CXCR4. Dieser ist bei COPD-Patienten in Exazerbation auf mRNA-Ebene 26fach höher exprimiert als in der gesunden Kontrollgruppe. Auch bei COPD-Patienten in der stabilen Phase ist die Expression signifikant, aber irrelevant erhöht.

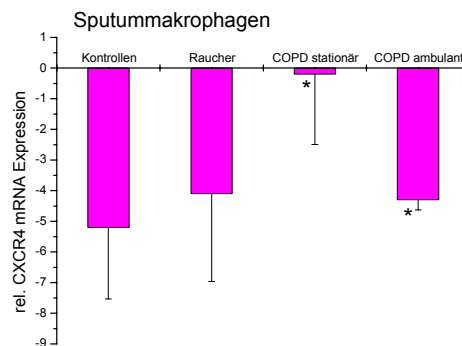


Abbildung 16: Konstitutive mRNA-Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 in Sputummakrophagen, dargestellt relativ zu α -Enolase (Kontrollen n=6, Raucher n=4, COPD stationär n=13, COPD ambulanz n=8, MW \pm SD, * = p < 0,05 bezogen auf Kontrollen).

C.1.5.2 Protein-Daten der FACS-Analyse

Die Oberflächen-Expression des CXCR4 Proteins auf den Sputummakrophagen von Gesunden und Patienten wurde mithilfe der Durchflusszytometrie bestimmt.

Die gereinigten Sputummakrophagen wurden wie in B.2.4.4 beschrieben gefärbt und am FACSCalibur analysiert. Als Vergleichswert wird die Fläche der Fluoreszenzintensität, der sog. Mnl-Wert, herangezogen. Hier wird jeweils die Differenz zwischen der Färbung (in Abbildung 17 bunt hinterlegt) und dem entsprechenden Isotyp (in Abbildung 17 dargestellt als nicht hinterlegte Kurvenfläche) berechnet (Δ Mnl), was als spezifisches Signal für die Färbung

gewertet wird. Es wurden Sputummakrophagen von 5 COPD-Patienten gewonnen und angefärbt. Hier lag der Anteil der kleinen Makrophagen im Mittel bei $82\pm 6\%$. Aufgrund dieses hohen Anteils konnten auch bei Patienten nur Daten zu kleinen Sputummakrophagen erhoben werden, da für ein deutliches Fluoreszenzsignal der Anteil der großen Zellen nicht ausreichte. Dementsprechend wurde bei den drei gesunden Spendern aufgrund des geringen Anteils der kleinen Makrophagen ($13\pm 6\%$) nur das CXCR4-Signal auf den großen Makrophagen bestimmt.

In Abbildung 17 ist je ein Beispiel eines gesunden Spenders (linkes Histogramm) und eines COPD-Patienten (rechtes Histogramm) dargestellt. Die orange hinterlegte Fläche ist im Vergleich zur grün hinterlegten nach rechts verschoben, wohingegen der Isotyp beider Färbungen (nicht hinterlegt) an unveränderter Position bleibt.

Die mittlere Differenz der Fluoreszenzintensitäten auf den kleinen Sputummakrophagen der 5 COPD-Patienten lag bei rund 6 ± 2 , auf den großen Makrophagen von gesunden Spendern konnte ein Signal von 3 ± 0 berechnet werden. Hiermit lässt sich die Erhöhung der CXCR4-mRNA auch auf Proteinebene bestätigen: auf kleinen Sputummakrophagen von COPD-Patienten ist der CXCR4-Rezeptor doppelt so hoch exprimiert wie auf den großen Zellen der gesunden Kontrollspender.

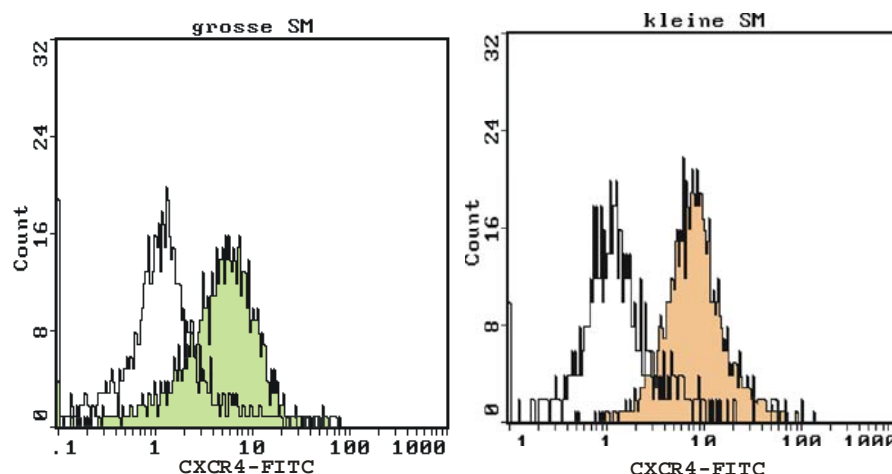


Abbildung 17: CXCR4-FITC Fluoreszenzintensitäten mit entsprechendem Isotyp. Linkes Histogramm: CXCR4-FITC Signal auf großen Sputummakrophagen eines ausgewählten gesunden Spenders. Rechts: CXCR4-FITC Signal auf kleinen Sputummakrophagen eines COPD-Patienten.

C.1.5.3 Ligand des CXCR4-Rezeptors

Der einzig bekannte Ligand, der an den CXCR4-Rezeptor bindet, ist SDF-1 (Stromal Derived Factor 1). Zellen, die den CXCR4-Rezeptor exprimieren, wandern chemotaktisch entlang eines Konzentrationsgradienten zum Ort mit der höchsten SDF-1 Konzentration. Deshalb habe ich die SDF-1 mRNA Menge in Bronchialepithelzellen untersucht.

Die aus Bürstenbiopsien gewonnenen Bronchialzellen (siehe B.2.2.5) wurden lysiert und auf ihre konstitutive SDF-1 mRNA Expression hin untersucht. Da die Zellen vor der Lyse nicht gezählt werden konnten, wurde die Zellzahl der Bronchialepithelzellen anhand von Enolase-Äquivalenten von CD14⁺⁺-Lysaten (à 2 x 10⁴ Zellen) berechnet. Als Vergleichsgruppe wurde durch Abschaben mit einem Spatel Epithel aus Mundschleimhaut gewonnen. Auch hier wurde die konstitutive SDF-1 Expression einer bekannten Zellzahl ermittelt. Der Vergleich der beiden Kollektive ergab eine knapp 600fach höhere SDF-1 Expression im Bronchialepithel als in der Mundschleimhaut, was eine Chemotaxis der Makrophagen in die Lunge auslösen könnte.

C.1.6 Weitere Genexpressionsunterschiede zwischen COPD-Patienten und gesunden Kontrollen

C.1.6.1 Matrix-Metalloproteinase 9 und ihr Inhibitor TIMP-1

Die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind eine Gruppe von Enzymen, die morphologische Gewebeveränderungen und den Abbau z.B. von Lungengewebe verursachen können. Zu pathologischen Veränderungen kann es kommen, wenn das Verhältnis zwischen den MMPs und ihren endogenen Inhibitoren, den TIMPs, aus dem Gleichgewicht gerät.

Durch Mitführen eines Standards bei der PCR ist es möglich, die Anzahl der in einer Probe vorhandenen mRNA-Kopien zu bestimmen. Das Verhältnis zwischen MMP-9 und TIMP-1 stieg bei Rauchern im Vergleich zum Nichtraucher-Kollektiv signifikant an (Abbildung 18). Diese Tendenz setzte sich

auch bei COPD-Patienten fort, hier ergab sich aber aufgrund der großen Streuung der Einzelwerte keine Signifikanz.

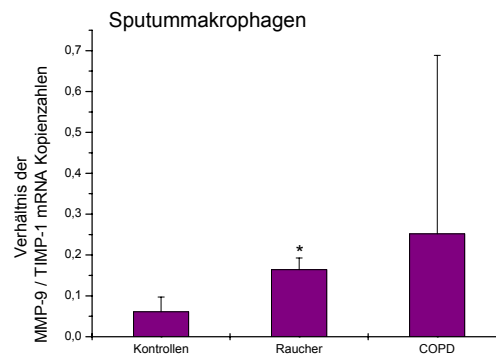


Abbildung 18: Verhältnis der mRNA-Kopien von MMP-9 und TIMP-1 in Sputummakrophagen (Kontrollen n=4, Raucher n=4, COPD stationär n=13, MW ± SD, * = p < 0,05 bezogen auf Kontrollen).

C.1.6.2 Hämoxygenase1

Die Hämoxygenase1 (HO-1) wirkt in der Lunge protektiv gegen oxidativen Stress, der durch inhalierte Partikel verursacht werden kann.

Im Vergleich zu gesunden Kontrollspendern war die HO-1 mRNA Expression bei Rauchern und COPD-Patienten gesenkt. Der deutlichste Effekt war bei COPD-Patienten in Exazerbation zu beobachten: bei diesen wurde 6fach weniger HO-1 mRNA exprimiert als bei der gesunden Kontrollgruppe (Abbildung 19).

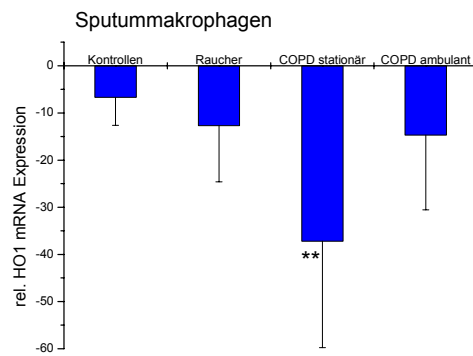


Abbildung 19: Konstitutive mRNA-Expression der Hämoxigenase1 in Sputummakrophagen, dargestellt relativ zu α -Enolase (Kontrollen n=6, Raucher n=4, COPD stationär n=8, COPD ambulant n=5, MW \pm SD, ** = p < 0,005 bezogen auf Kontrollen).

C.1.6.3 Phagozytoserezeptor MARCO (macrophage receptor with collagenous structure)

Inhalierte Partikel werden teilweise über Phagozytose aus der Lunge entfernt. Ein Rezeptor, über den Phagozytose vermittelt werden kann, ist der MARCO-Rezeptor.

Auch dieser Rezeptor zeigte zwischen den untersuchten Kollektiven große mRNA Expressionsunterschiede. Während gesunde Kontrollspender eine deutliche konstitutive Expression aufwiesen, konnte man bei Rauchern eine signifikante Abnahme um Faktor 2 beobachten. COPD-Patienten exprimierten 31fach weniger MARCO mRNA auf als die gesunde Kontrollgruppe.

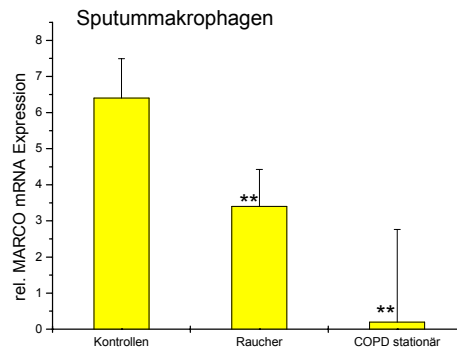


Abbildung 20: Konstitutive mRNA-Expression des Phagozytoserezeptors MARCO in Sputummakrophagen, dargestellt relativ zu α -Enolase (Kontrollen n=4, Raucher n=4, COPD stationär n=8, MW \pm SD, ** = p < 0,005 bezogen auf Kontrollen).

C.1.7 Effekt von Partikeln auf die Genexpression in Sputummakrophagen

Da COPD meist durch inhalierte Aerosole hervorgerufen wird, wurden gereinigte Sputummakrophagen mit einer Mischung aus ultra-feinen Printex 90 und feinen TiO₂ Partikeln inkubiert und anschließend die Genexpressionen von IL-8 und CXCR4 untersucht.

Wie Abbildung 21 verdeutlicht, ließ sich weder bei IL-8 (links) noch CXCR4 (rechts) durch die 3-stündige Behandlung mit dem Partikel-Gemisch eine mRNA-Expressionsänderung induzieren. Auch beide Vergleichs-Gruppen verhielten sich ähnlich: gesunde Spender und COPD-Patienten zeigten jeweils keine nennenswerte Reaktion auf die Partikel-Exposition.

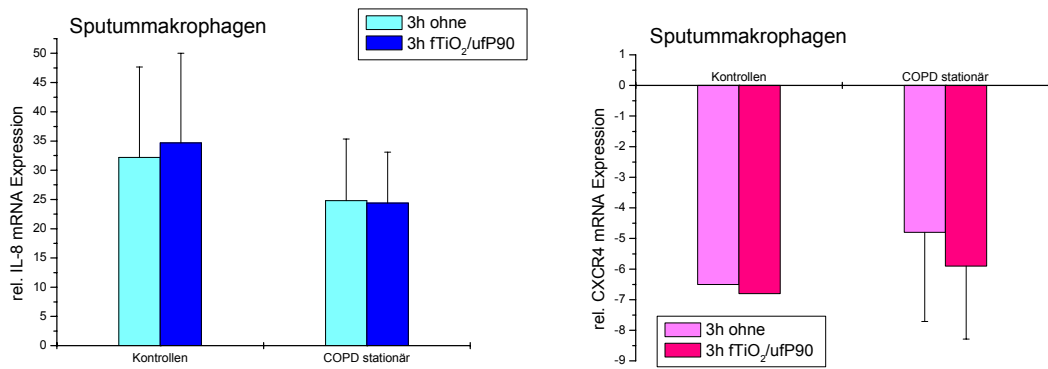


Abbildung 21: Expression von IL-8 (links) und CXCR4 (rechts) in Sputummakrophagen nach 3h +/- fTiO₂/ufP90 Behandlung, dargestellt relativ zu α -Enolase (IL-8: Kontrollen n=2, COPD stationär n=5, CXCR4: Kontrollen n=1, COPD stationär n=4, MW \pm SD).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich jedoch ein Gen ermitteln, welches auf Partikel-Behandlung reagiert: Cytochrom P450 1B1. Die dazu durchgeführten Untersuchungen und Ergebnisse sind in folgendem Abschnitt genauer dargestellt.

C.2 Effekt von Teilchen auf die Genexpression in Monozyten und Makrophagen

C.2.1 Auswahl der Gene

Die Auswahl der in dieser Arbeit untersuchten Gene basierte auf einem bereits durchgeführten cDNA-Array, in dem MDM von gesunden Spendern und von COPD-Patienten jeweils mit LPS und einer Mischung aus f TiO₂ und uf P90 stimuliert wurden. Hierbei sollten einerseits Gene identifiziert werden, die Unterschiede in der Genexpression zwischen Gesunden und Patienten aufweisen oder die auf die Stimulation mit LPS oder der Partikel Mischung reagieren. Für die genauere Untersuchung wurden solche Gene ausgewählt, die jeweils mindestens in einem der Vergleichsparameter im Array einen Wert aufweisen, der über oder unter einem bestimmten Schwellenwert (Expressionsänderung mind. um Faktor 2) liegt. In folgender Tabelle (Tabelle 14) sind diese ausgewählten Gene in der Reihenfolge, in der sie getestet wurden, aufgelistet:

Abkürzung	Vollständiger Name
CYP1B1	Cytochrom P4501B1
PTP4A1	Protein-Tyrosin-Phosphatase
CDV3	Carnitin-defizient-Ventrikel Homolog
JAG1	Jagged1
EIF4G3	Eukaryotic translation initiation factor
RASSF5	Ras association domain family
GAL3	Galectin 3
hepAcR2	Hepatitis A virus cellular Receptor 2
H2AFY	H2A histone family, member 4
HSP40	Heat shock protein 40
SIGLEC1	Sialoadhesin precursor
HO-1	Haemoxigenase 1

Abkürzung	Vollständiger Name
MARCKS	Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate
OPN	Osteopontin
DUSP1	Dual specificity phosphatase 1

Tabelle 14: Untersuchte Gene, die im Array verändertes Expressionsmuster aufwiesen.

Nur für CYP1B1 konnte eine Regulation durch Partikel bestätigt werden.

C.2.2 CYP1B1 und 1A1 in MDM

Cytochrom P450 Enzyme gehören zur Klasse der Monooxygenasen und spielen eine wichtige Rolle in der Metabolisierung von Fremdstoffen (Medikamente, Umweltschadstoffe) als auch körpereigenen Stoffen (u.a. Steroide, Zytokine). Die Expression von CYP1B1 wurde zunächst auf mRNA Ebene untersucht.

Für die Durchführung der PCR-Analysen wurde RNA aus monocyte-derived macrophages (MDM) isoliert, da der Array auch diese in vitro generierten Makrophagen als Untersuchungsgrundlage hatte.

Zunächst wurde aus Blut von gesunden Spendern und COPD-Patienten die PBMC-Fraktion gewonnen, daraus mithilfe von MACS-Separation Monozyten isoliert und in Gegenwart von M-CSF (100 ng/ml) 5 Tage zu MDM ausgereift.

Reife MDM wurden für 3h mit einer LPS-Konzentration von 10 ng/ml und mit einem Partikel-Gemisch aus Printex 90 und fTiO₂ (je 32 µg/ml) stimuliert. Als Kontrolle wurden MDM herangezogen, die für die gleiche Zeit unbehandelt blieben.

Aus den nach 3h Inkubationszeit hergestellten Lysaten wurde RNA isoliert, revers transkribiert und eine quantitative PCR für die in Tabelle 14 aufgelisteten Zielgene und das Haushaltsgen α -Enolase durchgeführt. Die Ergebnisse wurden an α -Enolase angeglichen (B.2.3.6).

Abbildung 22 zeigt eine bei den unbehandelten Zellen eine konstitutive Expression von CYP1B1, welche 20 bis 40fach niedriger als die von Enolase

ist. Bei COPD-Patienten fällt die relative CYP1B1 mRNA-Menge nach Partikel Stimulation um Faktor 2 ab, bei gesunden Spendern um Faktor 3.

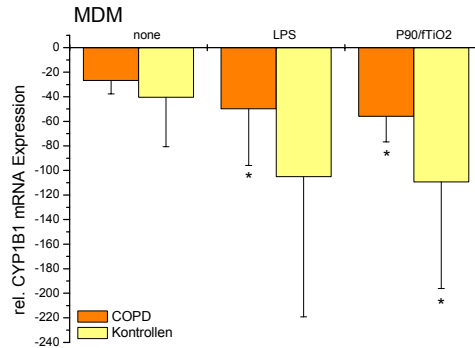


Abbildung 22: Effekt von Partikeln auf die CYP1B1 mRNA bei MDM nach 3h Stimulation (n=5 COPD, n=3 gesund, \pm SD, * = $p < 0,05$ gegen none).

Ein anderer Vertreter der Cytochrom-Familie ist CYP1A1. Es zählt mit einer 40%-igen Übereinstimmung in der Gensequenz zu den engsten Verwandten von CYP1B1. Um zu untersuchen, ob der Effekt durch Partikel-Stimulation nur selektiv für CYP1B1 gilt, wurde auch CYP1A1 mithilfe der PCR analysiert. Wie in Abbildung 23 deutlich wird, ist die konstitutive Expression von CYP1A1 wesentlich geringer verglichen mit der CYP1B1-Expression. Deren Expression ist mindestens 100fach geringer als die der Enolase. Auch die durch Partikel vermittelte reduzierende Wirkung auf die mRNA Expression ist sowohl bei Gesunden als auch bei COPD-Patienten nicht signifikant.

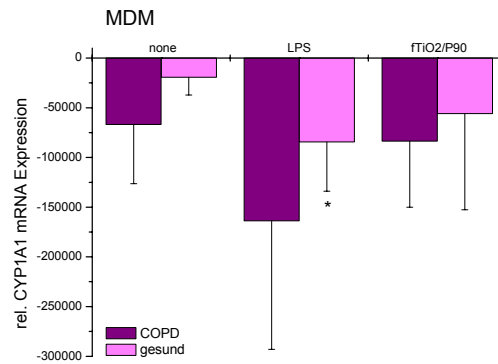


Abbildung 23: Effekt von Partikeln auf die CYP1A1 mRNA bei MDM nach 3h Stimulation (n=4 COPD, n=5 gesund, \pm SD, * = $p < 0,05$ gegen none).

C.2.3 CYP1B1 in CD14⁺⁺ Monozyten

Bei Untersuchungen von gereinigten CD14⁺⁺ Monozyten konnte nach Partikel-Stimulation eine wesentlich größere Abnahme der CYP1B1 mRNA festgestellt werden. Bei COPD-Patienten ließ sich eine Senkung der Expression um Faktor 85 beobachten, bei Gesunden um Faktor 60 (Abbildung 24). Aufgrund dieser viel stärkeren Effekte wurden weitere Experimente mit Monozyten durchgeführt.

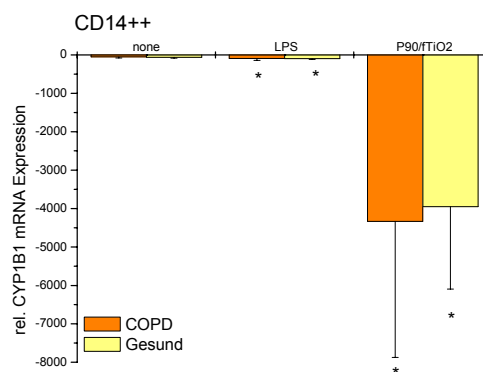


Abbildung 24: Effekt von Partikeln auf die CYP1B1 mRNA bei CD14⁺⁺ Monozyten nach 3h Stimulation (n=7 COPD, n=3 gesund, \pm SD; * = $p < 0,05$ gegen none).

C.2.4 Identifizierung der aktiven Komponente in der Partikelmischung

Um zu bestimmen, welcher der beiden eingesetzten Partikel den beobachteten Effekt auf CYP1B1 auslöst, wurden je 32 µg/ml P90 und fTiO₂ auf Monozyten getrennt appliziert und für 3h inkubiert. Zusätzlich wurden eine unbehandelte Kontrolle, LPS und das Partikel-Gemisch untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass P90 für den Effekt verantwortlich ist und eine 140fache Abnahme der CYP1B1 mRNA bewirkt. FTiO₂ hebt diesen signifikanten Effekt sogar wieder etwas auf (Abbildung 25).

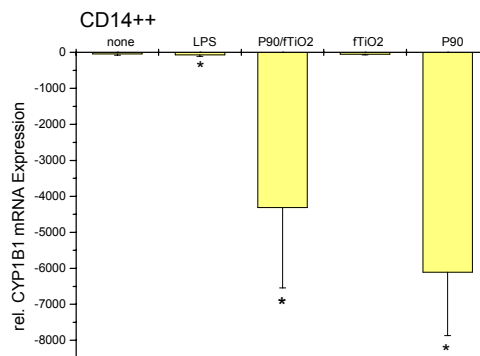


Abbildung 25: Relative CYP1B1 mRNA Menge nach 3h Stimulation mit P90 und fTiO₂ einzeln (n=3 gesund, ± SD, * = p<0,05 bezogen auf none).

Bei Monozyten lässt sich ein ähnliches Expressionsmuster für CYP1A1 erkennen (Abbildung 26), wobei die konstitutive Expression um die Hälfte geringer ist als bei 1B1. Auch die inhibierende Wirkung von P90 fällt nicht so deutlich aus (nur 13fach statt 140fach bei CYP1B1).

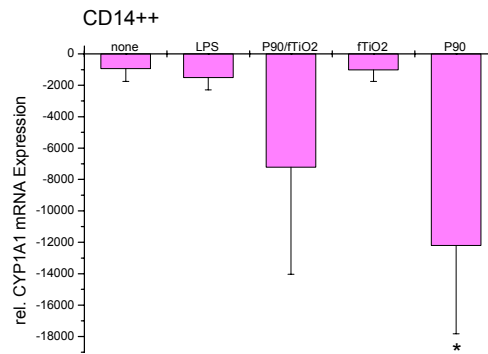


Abbildung 26: Relative CYP1A1 mRNA Menge nach 3h Stimulation mit P90 und tTiO₂ einzeln (n=3 gesund, ± SD, * = p<0,05 bezogen auf none).

C.2.5 Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen P90-Exposition und der CYP1B1 mRNA Expression

Die Dosis-Wirkungs-Analyse erlaubt die Ermittlung der optimalen Dosis von P90, die den größten Effekt in der Abnahme der CYP1B1 mRNA bewirkt. Die gereinigten CD14⁺⁺ Monozyten wurden dazu in verschiedenen Konzentrationen mit P90 (0; 0,32; 3,2; 32; 320 und 1000 µg/ml) für 3h stimuliert. In Abbildung 27 sind die Ergebnisse aus 5 unabhängigen Experimenten bei gesunden Spendern zusammengefasst. Das Ergebnis der quantitativen PCR zeigt nach einer 3-stündigen Stimulation mit P90 in jeder Konzentration einen signifikanten Abfall der CYP1B1 mRNA-Menge gegenüber der unbehandelten Probe, wobei sich bei der bisher verwendeten Konzentration von 32 µg/ml eine ca. 100fache Abnahme zeigt. Diese wird für weitere Versuche beibehalten, einerseits weil die Verwendung höherer Partikelkonzentrationen sehr materialintensiv ist, ohne dass der zweifach stärkere Effekt für die weiteren Untersuchungen von Bedeutung wäre, andererseits weil alle Konzentrationen über 32 µg/ml nicht umweltrelevant sind.

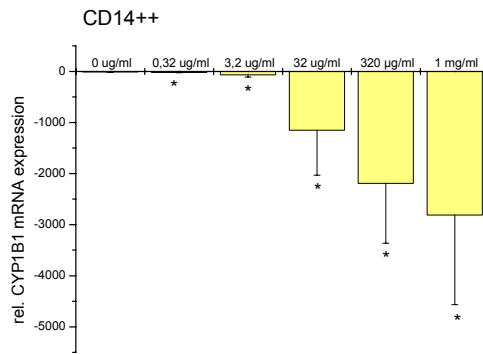


Abbildung 27: Dosis-Wirkungs-Beziehung der Expression von CYP1B1 in CD14⁺⁺ Monozyten gesunder Probanden nach 3h Stimulation mit P90 (n=5, ± SD, * = p<0,05 bezogen auf 0 µg/ml).

Da sich in den anfänglichen Experimenten, die mit MDM durchgeführt wurden, nur eine wesentlich geringere Abnahme der CYP1B1 mRNA als bei gereinigten CD14⁺⁺ Monozyten zeigte, wurde bei MDM noch zusätzlich eine Konzentration von 320 µg/ml P90 getestet. Bei dieser höheren Konzentration konnte im Mittel von 3 unabhängigen Experimenten ein etwas stärkerer reduzierender Effekt auf die CYP1B1 mRNA Expression nachgewiesen werden als bei Stimulation mit 32 µg/ml, der aber wegen der großen Streuung nicht signifikant war (Abbildung 28).

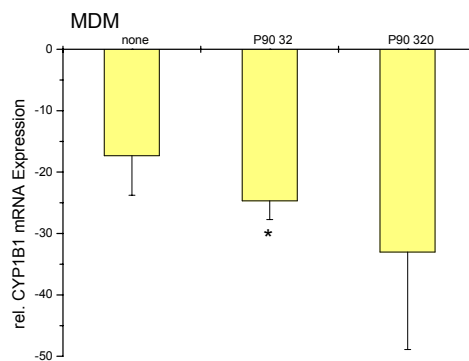


Abbildung 28: CYP1B1 mRNA Expression nach 3h Stimulation mit einer Dosis von 320 µg/ml P90 in MDM gesunder Spender (n=3, ± SD, * = p<0,05 bezogen auf none).

C.2.6 Kinetik der CYP1B1 mRNA Suppression

Um herauszufinden, nach welcher Zeit die deutlichste Unterdrückung der CYP1B1 mRNA durch P90 stattfindet, wurde eine Zeit-Wirkungs-Analyse erstellt. Dazu wurden die Monozyten 0,5, 1, 2, 3, 6 und 20h mit P90 in einer Konzentration von 32 µg/ml stimuliert.

Schon nach einer halben Stunde konnte nur noch die Hälfte der anfänglichen mRNA-Menge zum Zeitpunkt 0h nachgewiesen werden. Zwischen 3h und 6h erreicht die relative CYP1B1 mRNA-Menge ein Plateau (ca. 115fach weniger verglichen mit Zeitpunkt 0), wohingegen die produzierte mRNA-Menge bei 20h wieder etwas zunimmt. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde für alle weiteren Experimente mit mRNA eine Inkubationszeit von 3h gewählt.

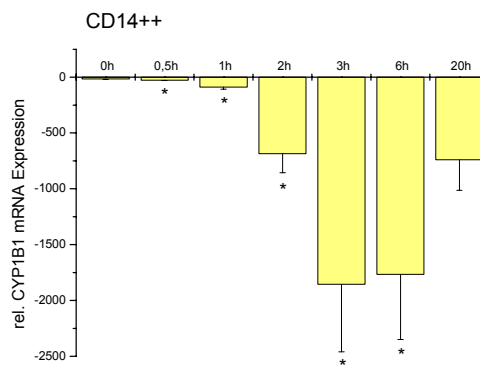


Abbildung 29: Zeit-Wirkungs-Beziehung der mRNA-Expression von CYP1B1 in CD14⁺⁺ Monozyten gesunder Probanden nach 3h Stimulation mit P90 (n=3, ± SD, * = p<0,05 bezogen auf 0h).

C.2.7 Ausschluss einer LPS-Kontamination von P90

Auch nach LPS-Stimulation konnte eine reduzierende Wirkung auf die CYP1B1 mRNA Expression beobachtet werden. In folgendem Experiment sollte ausgeschlossen werden, dass der beobachtete P90 Effekt durch mögliche Kontamination mit LPS zustande kommt. Hierzu wird die Substanz Polymyxin B (PMB) eingesetzt, die LPS bindet und inaktiviert. Monozyten blieben als

Kontrolle unbehandelt oder wurden 10 min mit PMB 10 µg/ml vorbehandelt. Anschließend erfolgte eine 3-stündige Stimulation mit LPS bei 10 ng/ml auf Zellen mit und ohne PMB. Abbildung 30 fasst 6 Experimente zusammen. Die alleinige Behandlung mit Polymyxin B hat keinen Einfluss auf die relative CYP1B1 mRNA-Menge, wohingegen PMB die LPS induzierte Reduktion von -12 (none) auf -24 (LPS) wieder auf -13 (PMB+LPS) neutralisieren konnte. Nachdem die P90-verursachte signifikante Abnahme der mRNA-Menge durch Zugabe von PMB nicht verändert wurde, konnte eine relevante Kontamination von LPS bei P90 ausgeschlossen werden.

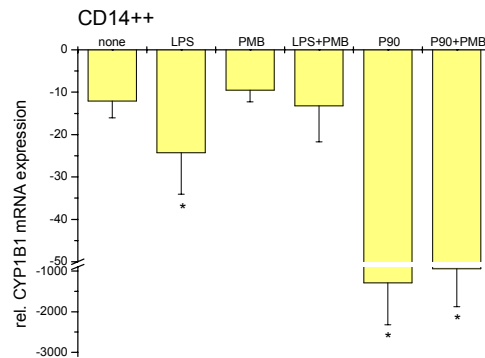


Abbildung 30: CYP1B1 mRNA Expression nach 3h LPS- und P90- Stimulation mit und ohne PMB in CD14⁺⁺-Monozyten gesunder Probanden (n=6, ± SD, * = p < 0,05).

C.2.8 CYP1B1 Effekt in weiteren Zelltypen

Da die Makrophagen in den Luftwegen bei Atmung Partikeln ausgesetzt sind, sollte die Auswirkung von Partikeln auf die CYP1B1 Expression in Sputummakrophagen untersucht werden. Hierzu wurden Makrophagen aus induziertem Sputum von gesunden Rauchern und COPD-Patienten isoliert. Die Behandlung mit P90 hatte bei Sputummakrophagen von COPD-Patienten eine 3fache und bei Nichtrauchern eine 4fache Senkung der mRNA-Menge im Vergleich zum Wert nach 3h Inkubation ohne weitere Behandlung zur Folge, wobei beides aufgrund der großen Streuung nicht signifikant war. Bei der

Gruppe der Raucher hingegen traten keine bemerkenswerten Expressionsänderungen auf.

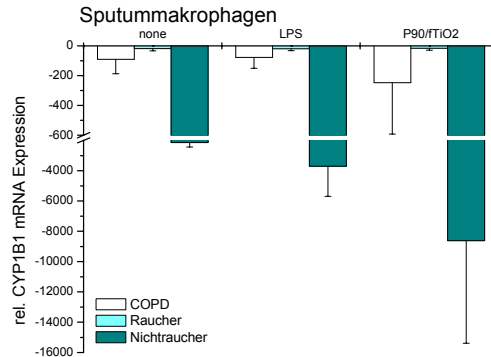


Abbildung 31: CYP1B1 mRNA Expression in Sputummakrophagen von COPD-Patienten (n=7), gesunden Rauchern (n=4) und gesunden Nichtrauchern (n=2) nach 3-stündiger Behandlung mit Partikel-Gemisch (P90 und fTiO2 je 32 µg/ml) ± SD.

Bei in vitro generierten MDM, die durch IL-13 aktiviert wurden, zeigte sich durch P90 eine 3fache Abnahme der CYP1B1 mRNA. Bei unreifen dendritischen Zellen (DC), die durch Zusatz von IL-13 und GM-CSF generiert wurden, konnte kein signifikanter Effekt beobachtet werden (Abbildung 32)

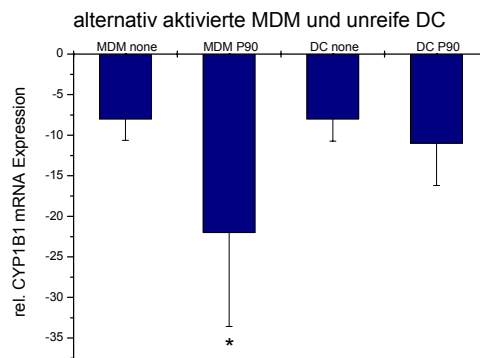


Abbildung 32: Effekt von P90 auf die CYP1B1 mRNA von in vitro generierten MDM und unreifen DC von gesunden Spendern (n=4, MW ± SD, * = p<0,5).

Da inhalierte Partikel sich nicht nur in Makrophagen ansammeln, sondern auch in Epithelzellen, wurden außerdem zwei epitheliale Zelllinien A549 (alveolär)

und Calu3 (bronchial) auf den Effekt in der CYP1B1 mRNA Expression hin untersucht. Beide Zelllinien zeigen den stärksten Effekt auf P90 nach 22h. Bei A549 zeigte sich nach Inkubation mit P90 über Nacht ein 4,5facher Abfall der CYP1B1 mRNA, bei Calu3 eine deutlichere Senkung um den Faktor 9,4.

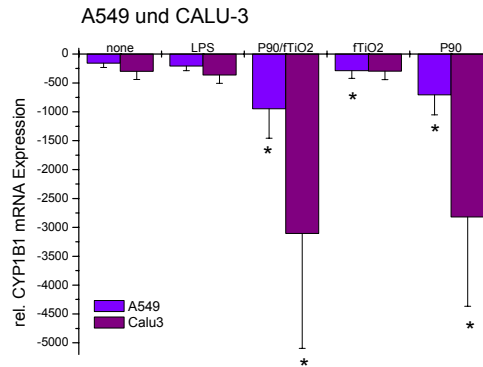


Abbildung 33: CYP1B1 mRNA Expression in den Zelllinien A549 (n=3) und Calu3 (n=4) nach 22h Stimulation, \pm SD, * = $p < 0,05$ bezogen auf none.

In primären Epithelzellen, die durch Bürstenbiopsien gewonnen wurden, konnte schon nach 3h P90 Stimulation eine rund 4fache Senkung der CYP1B1 mRNA beobachtet werden (Abbildung 34).

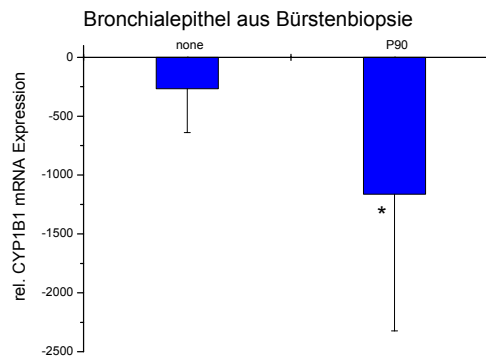


Abbildung 34: CYP1B1 mRNA Expression in Epithelzellen aus Bürstenbiopsien (n=7) nach 3h Stimulation mit P90 (32 μ g/ml), \pm SD, * = $p < 0,05$ bezogen auf none.

Diese Daten zeigen, dass uf P90 die CYP1B1 Expression in verschiedenen Zellen reduziert. Der stärkste Effekt findet sich bei Blutmonozyten.

C.2.9 Effekt von Benzo[a]pyren auf die CYP1B1 mRNA Expression

Neben anderen Xenobiotika werden auch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) von Enzymen der CYP-Familie abgebaut. Ein repräsentatives Mitglied dieser Substanzklasse, das auch als Umwelt-Schadstoff auftritt, stellt Benzo[a]pyren (BaP) dar. BaP induziert die CYP1B1 mRNA Expression in PBMC. Zunächst wurden Experimente zur Wirkungs-Zeit-Beziehung durchgeführt, wobei PBMC für Zeitpunkte von 0h bis 22h mit 10 μ M BaP behandelt wurden. BaP wurde zur besseren biologischen Verfügbarkeit in Liposomen verpackt appliziert. Verglichen zur CYP1B1-Transkript Menge zum Zeitpunkt 0h (-88 ± 20) zeigte sich die deutlichste Erhöhung der mRNA nach 3h (-6 ± 2) und 6h (-4 ± 2). Basierend auf diesen Daten wurde für folgende Versuche eine Inkubationszeit von 3h gewählt.

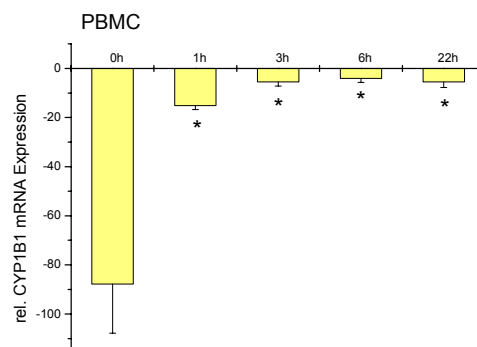


Abbildung 35: Zeit-Wirkungs-Beziehung für die CYP1B1 mRNA Expression in PBMC nach Behandlung mit 10 μ M BaP (n=3 gesund, \pm SD, * = $p < 0,05$).

Um herauszufinden, ob BaP die P90-induzierte Repression von CYP1B1 abschwächen oder sogar aufheben kann, wurden PBMC für 30 min mit 32 μ g/ml P90 und mit dem CYP1B1 Inhibitor α -Naphthoflavon (5 μ M, in Liposomen verpackt) vorstimuliert. Anschließend wurde den Zellen BaP in Konzentrationen von 0,1 μ M, 1 μ M und 10 μ M zugesetzt. Um auszuschließen, dass die Zellen durch bloße Behandlung mit Liposomen beeinflusst werden, wurde auch die Zugabe von leeren Liposomen in einfacher und doppelter Menge untersucht und durch PCR analysiert. Aus Abbildung 36 wird ersichtlich, dass keine Effekte

durch die Liposomen-Behandlung an sich auftreten. Die Stimulation mit BaP hingegen konnte die CYP1B1 mRNA-Menge in der höchsten Konzentration um das 3,6fache anheben und P90 allein senkte die RNA Expression um den Faktor 40. Von diesem deutlich gesenkten Niveau konnte die CYP mRNA durch 0,1 μ M BaP wieder um das 16fache erhöht werden, durch 10 μ M BaP konnte die Senkung durch P90 sogar gänzlich aufgehoben werden.

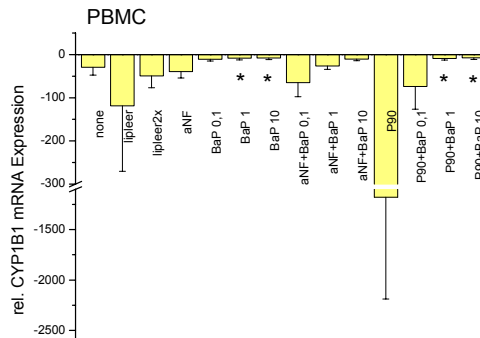


Abbildung 36: Gegenseitige Beeinflussung der CYP1B1 mRNA Expression durch BaP und P90 in PBMC gesunder Probanden (n=4, \pm SD, * = $p < 0,05$ gegen none).

C.2.10 Nachweis der RNA-Stabilität mithilfe von Actinomycin D

Ein erniedrigter mRNA-Spiegel eines bestimmten Gens nach Inkubation mit einem Stimulus kann sowohl durch verminderte Stabilität des Transkriptes als auch durch verminderte Neusynthese verursacht werden.

Ob die CYP1B1-RNA-Stabilität durch Printex 90 gesenkt wird, lässt sich mithilfe von Actinomycin D (ActD) testen: Durch Zugabe von ActD ist die Halbwertszeit von RNA zu bestimmen, da ab Zugabezeitpunkt keine neue RNA mehr nachsynthetisiert werden kann. Dazu wurden vier Ansätze hergestellt: im ersten wurden die Zellen ohne weitere Zusätze kultiviert, zum zweiten und vierten wurden 32 μ g/ml P90 Partikel gegeben und 5 min bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde zum dritten und vierten Ansatz ActD (1 μ g / ml) hinzugefügt. Nach 0,5, 1, 3, 6 und 22 h werden mit TRI-Reagent Lysate mit 2×10^5 PBMC angefertigt.

Nach Analyse durch RT-PCR konnte gezeigt werden, dass die Halbwertszeit der CYP1B1 mRNA keine großen Unterschiede zwischen der Behandlung mit (HWZ 1,2h) oder ohne (HWZ 1,6h) Partikeln aufweist.

Der leichte Anstieg, der bei der Enolase mRNA ohne ActD-Zusatz zu beobachten ist, kann durch wachsende Zellgröße im Laufe der Inkubationszeit erklärt werden.

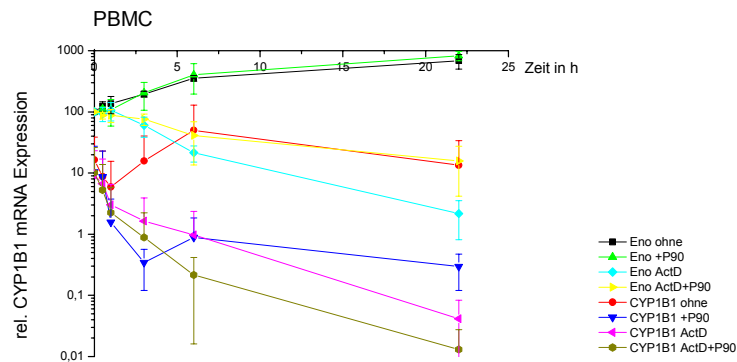


Abbildung 37: Bestimmung der Halbwertszeit von CYP1B1 mRNA mit und ohne Partikel-Stimulation in PBMC gesunder Probanden (n=4, ± SD).

C.2.11 CYP1B1 Expression in PBMC nach Stimulation in unterschiedlichen Kulturgefäßen

Aufgrund unterschiedlicher Zellausbeuten in den einzelnen Experimenten wurden passend zu den Zellzahlen entsprechende Kulturgefäße verwendet. Deshalb sollte hier getestet werden, ob der Effekt der Partikelstimulation auf die CYP1B1 Expression durch verschiedene Kulturgefäße beeinflusst wird.

Hierzu wurden PBMC drei Stunden jeweils mit und ohne 32 µg/ml P90 bei 37°C wie folgt inkubiert: je 2x10⁴/100 µl im Eppendorf-Reaktionsgefäß und je 1x10⁶/ml im Polystyrol Zellkultur Röhrchen oder auf der LA-Platte. Nach der angegebenen Inkubationszeit wurden je 2x10⁴ Zellen lysiert.

Die Ergebnisse der LC-PCR zeigen einen deutlich besseren Effekt der CYP1B1 mRNA Herunterregulation durch P90 in Zellkultur Röhrchen (21fach, in

Abbildung 38 als Redcap bezeichnet) oder auf LA-Platten (40fach) im Vergleich zum Eppendorf Reaktionsgefäß (6fach, in Abbildung 38 als Eppi bezeichnet). Diese Beobachtung muss in die Interpretation der Ergebnisse miteinbezogen werden.

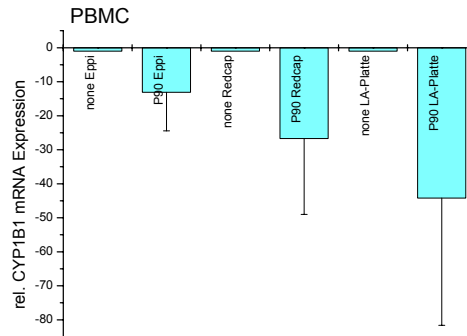


Abbildung 38: Beeinflussung der CYP1B1 mRNA Regulation durch Kultur in unterschiedlichen Gefäßen (PBMC gesunder Spender, n=3, MW ± SD).

C.2.12 Wirkung weiterer Partikel auf die CYP1B1 Expression

Da in der ursprünglich verwendeten Partikelmischung von uf P90 und f TiO₂ der uf Partikel die aktive Komponente darstellt, stellt sich die Frage, ob andere uf Partikel oder uf TiO₂ einen ähnlichen Effekt auslösen können. Alle Partikel wurden für die 3-stündige Stimulation von PBMC so eingesetzt, dass sich die Oberflächen entsprechen und nicht die Masse.

Ein deutlicher Effekt zeigt sich nach wie vor nur bei uf P90 Partikeln, uf EC90 reduziert die CYP1B1 zwar auch leicht, aber nicht signifikant. Zwischen uf und f TiO₂ besteht kein Unterschied, beide beeinflussen die CYP1B1 mRNA unwesentlich.

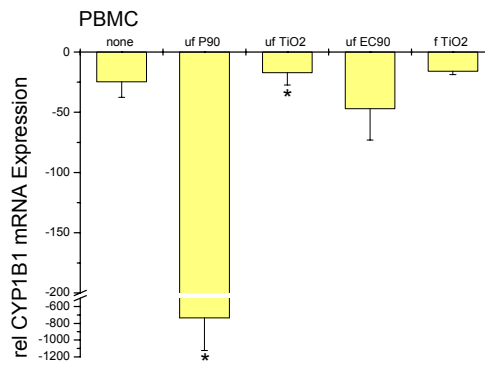


Abbildung 39: CYP1B1 mRNA Expression in PBMC nach 3h Inkubation mit verschiedenen Partikeln (PBMC gesunder Spender, n=5 (bei f TiO₂ n=2), ± SD, * = p<0,05).

C.2.13 Effekt von P90 auf CYP1B1-Proteinebene

Die Untersuchung, ob die Folge der beobachteten Senkung der CYP1B1 mRNA durch P90 auch eine Reduktion des CYP1B1 Proteins ist, wurde mit unterschiedlichen Experimenten durchgeführt.

Eine Möglichkeit ist, den P90-Einfluss über die Enzym-Aktivität von CYP1B1 zu untersuchen, indem Metaboliten bestimmt werden, die durch CYP1B1 aus BaP entstehen. Andererseits kann die Enzymaktivität von P450 Systemen gemessen werden, wozu die Methode des EROD-Assays am häufigsten angewendet wird.

Die in unserem Fall erfolgreichste Methode, stellte der Western Blot dar. Dazu wurden zunächst Mikrosomen aus Calu-3 Zellen isoliert. Die Zellen wurden hierfür 32h mit und ohne P90 (32 µg/ml) behandelt. Parallel zur Proteinisolierung wurde jeweils auch ein Zellysat zur Bestimmung der mRNA-Menge angefertigt.

In Abbildung 40 ist der deutliche Effekt durch P90 zu erkennen: sowohl die mRNA (im Mittel Faktor 11) als auch das CYP1B1 Protein (im Mittel Faktor 8) wurden durch P90 deutlich gesenkt. Die densitometrischen Auswertung der Blots ergab bei den unbehandelten Zellen einen Mittelwert von 2 721 541 ± 379 059 units gegen 342 109 ± 46 303 units im Mittel bei mit P90 behandelten Zellen.

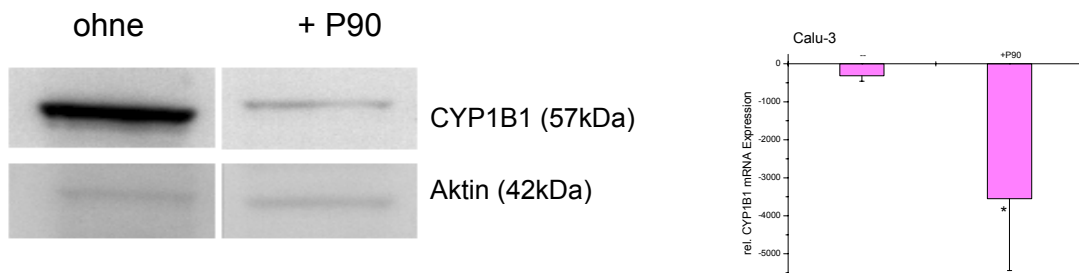


Abbildung 40: links: Proteinbanden von CYP1B1 bei 57 kDa und Aktin bei 42 kDa derselben Probe im Western Blot, jeweils ohne und mit 32h 32 µg P90/ml Behandlung (ein repräsentatives Beispiel von drei Experimenten, bei CYP1B1: 3 036 276 units für unbehandelte Zellen, 373 799 units für mit P90 behandelte Zellen); rechts: CYP1B1 mRNA Expression in Calu-3 nach 32h (MW n=3, ± SD, * = p<0,05).

D Diskussion

D.1 Genexpression in Sputummakrophagen

D.1.1 Gewinnung von Sputummakrophagen

Die Induktion von Sputum mit isotoner und hypertoner Kochsalzlösung ist eine wenig invasive Methode, um Untersuchungsmaterial aus der Lunge zu gewinnen. Viele Studien belegen, dass diese Methode bei Patienten, die sich in der stabilen Phase einer moderaten bis schweren COPD befinden, ohne nennenswertes Risiko durchgeführt werden kann (Brightling *et al.* 2001; Ryttila *et al.* 2000; Sutherland *et al.* 2002; Vlachos-Mayer *et al.* 2000). Bathoorn und Kollegen bestätigten auch bei COPD-Patienten in einer Exazerbationsphase eine vergleichbare Sicherheit der Methode wie bei Patienten in der stabilen Phase. Die beobachteten leichten Verschlechterungen in der FEV₁ sind bei Exazerbationspatienten von gleichem oder sogar geringerem Ausmaß als bei Patienten, die sich in der stabilen Phase befinden (Bathoorn *et al.* 2007).

Das Protokoll, das für die Sputuminduktion in dieser Arbeit angewendet wurde, sieht eine aufsteigende Reihenfolge der zu inhalierenden NaCl-Konzentrationen vor, beginnend mit physiologischer (0,9%) über 3%ige bis hin zu max. 5%iger hypertoner Kochsalz-Lösung. Durch die Inhalation der NaCl-Lösungen soll der Schleim, der den Atemwegen aufliegt, verflüssigt werden, damit er leichter abgehustet werden kann. Bei COPD-Patienten in der Exazerbationsphase ist aber oft nur eine Inhalation der 0,9%igen NaCl-Lösung möglich, da die konzentrierteren Lösungen zu einer stärkeren Reizung und somit auch zu Atemnot führen können. In einer Studie von Taube *et al.* konnten aber keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der totalen und differentiellen Zellzahl zwischen Sputum, das mit 0,9% und 3% Kochsalzlösung induziert wurde, festgestellt werden (Taube *et al.* 2001). In der vorliegenden Arbeit konnten weder qualitativ noch quantitativ Unterschiede zwischen Sputum festgestellt werden, das durch Inhalation von nur 0,9% NaCl-Lösung gewonnen wurde, und Sputum, das nach zweimaligem Inhalieren (0,9% und 3%) ausgeworfen wurde, was durch die Befunde von Taube *et al.* unterstützt wird. Dementsprechend

wurden auch in der vorliegenden Arbeit die Materialien nicht unterschiedlich behandelt, sondern zusammen verarbeitet und die Ergebnisse zusammengefasst.

Bei COPD-Patienten besteht ein grundlegendes Problem bei der Sputumgewinnung darin, dass die Probanden durch ihre Krankheit oft zu geschwächt sind, um die nötige Kraft aufzubringen, Sputum auszuwerfen. Für gesunde Probanden wiederum ist es teils nicht möglich, Sputum abzuhusten, da in der gesunden Lunge wenig Schleim produziert wird.

Das für diese Arbeit gewünschte Untersuchungsmaterial sind die Sputummakrophagen, die bei ausreichender Menge an Ausgangsmaterial isoliert werden können. In unserer Arbeitsgruppe wurde eine Methode entwickelt, in der diese Makrophagen mithilfe eines bestimmten Antikörpercocktails (CD2, CD3, CD8, CD19, CD56, CD66b) angereichert werden können. Die „RosetteSep“ Antikörpermischungen wurden ursprünglich für die Anreicherung unterschiedlicher Zellpopulationen aus Vollblut entwickelt. Uns gelang es, diese Anwendung auf Sputum zu übertragen und dadurch Sputummakrophagen mit einer Reinheit von über 80% zu isolieren. Durch diesen hohen Reinheitsgrad wurde es erstmals möglich, molekulare Analysen speziell für die Population der Sputummakrophagen durchzuführen. Ein ebenfalls neuer Befund, der sich durch diese Methode ergab, war die Möglichkeit der deutlichen Unterscheidung zwischen der herkömmlichen Population der großen Sputummakrophagen und den neuen kleinen Sputummakrophagen. Die Population der kleinen Zellen konnte vor Aufreinigung nie so klar dargestellt werden, da immer Verunreinigungen durch Granulozyten im Scatter-Bild der FACS-Analysen auftraten und somit die prozentualen Anteile falsch erhöhten.

Einen limitierenden Faktor stellt der geringe Anteil von Makrophagen im Sputum von COPD-Patienten dar. Rutgers und Kollegen beobachteten im induzierten Sputum von COPD-Patienten einen signifikant höheren Anteil an neutrophilen Granulozyten (77%) und einen niedrigeren Gehalt an Makrophagen (19%) als im Sputum gesunder Kontrollspender (57% Granulozyten, 36% Makrophagen). Wenn man die Gesamtzellzahl im Sputum je ml vergleicht, fällt aber auf, dass im Sputum von COPD-Patienten ca. doppelt so viele Zellen vorliegen wie bei

gesunden Spendern (Rutgers *et al.* 2000). Diese Befunde stimmen mit den Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit überein: der Makrophagenanteil von COPD-Patienten liegt bei 14,1% (n=6) und gesunde Raucher und Nichtraucher (n=8) weisen einen hochsignifikant größeren Prozentsatz an Makrophagen von 38,8% auf.

Die durchschnittlichen Ausbeuten nach Aufreinigung liegen bei 20,2% ohne wesentliche Unterschiede zwischen Patienten, gesunden Rauchern und Nichtrauchern. Verluste, die durch die Handhabung bei der Aufreinigung entstehen, dürften erfahrungsgemäß bei ca. 50% liegen. Eine mögliche Erklärung für die geringere Ausbeute könnte an Kreuzreaktionen der in RosetteSep beinhalteten Antikörper mit Monozyten liegen. Diese Theorie erscheint allerdings eher unwahrscheinlich. Es gibt wenige Studien, in denen Subpopulationen von Monozyten beschrieben wurden, die z.B. die Antikörper CD2, CD8 oder CD56 exprimieren. Diese Subpopulationen liegen nur in sehr geringen Prozentsätzen von ca. 1% vor (Baba *et al.* 2006; Cheng *et al.* 2006; Grip *et al.* 2007) und würden auch somit nur sehr geringfügig zum Zellverlust beitragen. Um dies zu prüfen, könnte als Kontrolle das nach Dichtegradientenzentrifugation entstandene Pellet auf Kontaminationen mit CD68- oder CD14-positiven Makrophagen hin untersucht werden.

Einen unkontrollierbaren Faktor stellt die Verunreinigung durch Mundepithelzellen dar. Versuche, die Schleimhautzellen durch MACS-Separation zu entfernen, waren nicht erfolgreich. Um sicherzustellen, dass die durch LC-PCR bestimmte mRNA-Menge der Zielgene auch wirklich die mRNA Expression der Monozyten bzw. Makrophagen widerspiegelt und nicht eventuell durch Epithel-Kontaminationen in den Proben verfälscht wird, wurde aus Mundschleimhautzellen ebenfalls RNA isoliert und für alle Zielgene eine PCR durchgeführt. Anhand dieser PCR-Ergebnisse kann für die Gene α -Enolase, CXCR4 und MARCO eine Beeinflussung durch Epithelzellen ausgeschlossen werden: die Epithelzellen exprimieren weniger als 1‰ der oben genannten Zielgene. Auch bei IL-8 und HO-1 kann man von einer sehr geringen Einflussnahme auf die mRNA-Daten ausgehen, da bei einem Epithelanteil von 90% maximal 5% zum Signal beigetragen werden. Bei CXCR1 und 2 wurden für Monozyten und Makrophagen überhaupt nur sehr schwache mRNA-Signale

gemessen, weshalb hier bei einer 10%-igen Schleimhautzellen-Verunreinigung ein Beitrag bis zu 10% des Signals möglich ist. Daher ist sogar bei erheblicher Kontamination mit Mundepithelien kein relevanter Einfluss auf die PCR-Ergebnisse zu erwarten.

D.1.2 Zytokinexpression in Sputummakrophagen

Da COPD durch eine chronische Entzündung der zentralen und peripheren Atemwege bedingt ist, sollte in vorliegender Arbeit eine Beteiligung inflammatorischer Zytokine, wie z.B. TNF oder IL-8, nachgewiesen werden.

TNF wird eine zentrale Rolle im Entzündungsgeschehen bei COPD zugeschrieben (Mukhopadhyay *et al.* 2006). In dieser Arbeit konnte nur eine erhöhte IL-8, jedoch keine erhöhte TNF mRNA Expression in gereinigten Sputummakrophagen von COPD-Patienten im Vergleich zu einem gesunden Nichtraucher-Kontrollkollektiv gezeigt werden. Dieser Befund ist kontrovers zu Daten anderer Arbeitsgruppen, die einen signifikanten Anstieg der TNF und IL-8 Proteinkonzentration im Gesamtsputum jeweils von COPD-Patienten gegenüber gesunden Kontrollgruppen nachweisen konnten (Chung 2005; Daldegan *et al.* 2005; Keatings *et al.* 1996). Im Jahr 2005 wurde von van der Vaart *et al.* eine Studie zu antiinflammatorischen Wirkstoffen für mögliche Therapieansätze durchgeführt. COPD-Patienten wurde ein monoklonaler Antikörper, der TNF bindet und dessen biologische Aktivität neutralisiert, verabreicht. Die Behandlung hatte im Vergleich zur Placebo-Gruppe keine signifikanten Änderungen in der Anzahl der inflammatorischen Zellen oder des IL-8 Expressionsspiegels zur Folge (van der Vaart *et al.* 2005). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass TNF möglicherweise nicht das zentrale Zytokin in der Pathophysiologie der COPD ist. Das oft beobachtete erhöhte TNF-Niveau könnte durch Exazerbation bedingt sein, wobei das TNF in Remission wieder auf Normalwerte absinkt. Die IL-8 Expression, die bei Rauchern, ambulanten und stationären COPD-Patienten im Vergleich zu Kontrollspendern signifikant erhöht war, könnte mit einer übermäßigen Rekrutierung von Neutrophilen in die Lunge in Zusammenhang gebracht

werden. Die Neutrophilen wandern im Entzündungsgeschehen früher ein als die Makrophagen. Maus *et al.* berichten in einer Studie, dass Monozyten durch ihre CCR2-Rezeptoren von dem auch von Neutrophilen ausgeschütteten CCL2 chemotaktisch angezogen werden, somit verstärkt in die Lunge einwandern und dort wiederum die Inflammation erhalten (Maus *et al.* 2005). In vorliegender Arbeit könnte man durch das erhöhte IL-8 Niveau auf eine größere Neutrophilenzahl in der Lunge schließen, die zur zusätzlichen Makrophagenrekrutierung beiträgt.

Das als anti-inflammatorisches Zytokin bekannte TGF β ist bei stationären COPD-Patienten im Vergleich zu allen anderen Kollektiven erniedrigt, was noch verstärkt zu der bei diesen Probanden vorliegenden Exazerbation beitragen könnte.

Generell können den Variationen in der Zytokinexpression mehrere Ursachen zugrunde liegen. Alle Patienten befinden sich bei Sputuminduktion in unterschiedlichen gesundheitlichen Ausgangssituationen und werden individuell behandelt. Der Termin für die Sputuminduktion wurde zwar möglichst einheitlich gewählt, d.h. ca. eine Woche nach Beginn des stationären Aufenthaltes, der Gesundheitszustand kann dennoch von Patient zu Patient sehr variieren. In diesem Zusammenhang muss auch die individuelle Medikation des Einzelnen berücksichtigt werden. Da die lokale und systemische Inflammation für die Pathogenese der COPD ein zentraler Punkt zu sein scheint, werden zur antiinflammatorischen Therapie inhalative und systemische Kortikosteroide eingesetzt. Neutrophile Granulozyten, T-Lymphozyten und Makrophagen, die alle eine Rolle im Krankheitsgeschehen der COPD spielen, können ihr biologisches Verhalten, z.B. die Ausschüttung von Mediatoren, durch die Behandlung mit Kortikosteroiden ändern (Falk *et al.* 2008). Die für diese Arbeit verwendeten Daten stammen alle von Patienten, die zum Zeitpunkt der Sputuminduktion sowohl mit inhalativen als auch oralen Glukokortikoiden therapiert wurden. Daher kann hier eine durch unterschiedliche Verabreichung von Glukokortikoiden bedingte Beeinflussung der Zytokinexpression eher vernachlässigt werden.

Ein weiterer bedeutender Faktor, der in die Änderung der Genexpression eingreifen kann, ist der Konsum von Tabak. Bei der Auswertung der jeweiligen

Daten wurde hinsichtlich der Anzahl der pack years der einzelnen Probanden nicht unterschieden. Einige Spender sind seit Jahren Ex-Raucher, andere sind zum Zeitpunkt der Probenentnahme noch aktive Raucher. Dass Tabakkonsum die Zytokinexpression beeinflussen kann, zeigten Gaschler und Mitarbeiter an einem Maus-Inhalationsmodell: Alveolarmakrophagen von Mäusen, die Zigarettenrauch inhalierten, zeigten auf Stimulation mit TLR eine reduzierte Produktion von inflammatorischen Mediatoren und damit eine beeinträchtigte Fähigkeit, eine Immunantwort zu initiieren (Gaschler *et al.* 2008). Der Konsum von Tabakrauch könnte also dazu beitragen, dass die TNF-Produktion bei Rauchern und COPD-Patienten gegenüber dem gesunden Kontrollkollektiv nicht deutlich erhöht ist. In der Gruppe der ambulanten und stationären Patienten befindet sich jeweils noch ein aktiver Raucher. In Bezug auf die Zytokinexpression können bei diesen beiden Spendern allerdings keine aussagekräftigen Unterschiede festgestellt werden, die sie vom Kollektiv der Ex-Raucher unterscheidet.

Induzierte konstitutive Expressionen können auch auf einen Schritt in der Sputumaufarbeitung zurückzuführen sein. Da das Sputum zur Homogenisierung 30 bis 45 min bei 37°C inkubiert wird, wäre es denkbar, dass in dieser Zeit bereits durch die im Sputum vorhandenen oralen Bakterien eine Induktion der Zytokine stattfindet. Eine Möglichkeit, diesen Effekt gering zu halten, wäre eine Inkubation bei 4°C oder RT.

Bei den Stimulationsversuchen von Sputummakrophagen mit LPS konnten wir nach 3-stündiger Behandlung keine induzierte Zytokinexpression beobachten. Nach gleichem Versuchsaufbau mit Blutmonozyten bewirkten jedoch nur 10 ng LPS/ml eine deutliche Induktion der Zytokine. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Sputummakrophagen durch bereits bestehende oben erwähnte *in vivo* LPS-Kontaminationen durch Bakterien schon voraktiviert waren und sich die proinflammatorischen Zytokine aufgrund einer möglichen Toleranzreaktion nicht mehr induzieren lassen.

D.1.3 Der CXCR4-Rezeptor

Neben Zytokinen stellen auch Chemokine eine wichtige Gruppe von Faktoren im Entzündungsgeschehen dar. Durch sie werden inflammatorische Zellen in Atemwege und Lunge gelockt (Larsson 2007). Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit einige Vertreter aus der Klasse der Chemokine und ihrer Rezeptoren untersucht, wobei ein interessanter Befund genauer bearbeitet wurde.

Der CXCR4-Rezeptor ist einer der bestuntersuchten Chemokin-Rezeptoren. Er wird mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht: bei HIV fungiert er als Co-Rezeptor beim Eintreten des Virus (Fauci 1996), er vermittelt die Metastasierung in verschiedenen Krebsarten (Kucia *et al.* 2004) und wurde in Zusammenhang mit dem WHIM-Syndrom beschrieben (Diaz and Gulino 2005). In vorliegender Arbeit konnte beim CXCR4 Chemokinrezeptor im Kollektiv der COPD-Patienten eine 25fach erhöhte mRNA-Expression gegenüber dem RNA-Niveau der gesunden Probanden beobachtet werden. Da für durchflusszytometrische Analysen nur gereinigte Sputummakrophagen verwendet werden sollten, also somit nur wenig Untersuchungsmaterial zur Verfügung stand, und die CXCR4 mRNA Expression den deutlichsten Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen aufwies, beschränkte ich mich bei der Untersuchung auf Proteinebene auf den CXCR4-Rezeptor. Bei Messungen zum CXCR4-Protein zeigte sich eine Verdopplung der mittleren Fluoreszenzintensität bei COPD-Patienten, was zwar eine Erhöhung auf Proteinebene bestätigt, aber nur in geringerem Ausmaß als es auf mRNA-Ebene beobachtet wurde. Eine mögliche Begründung hierfür liefern Hartl *et al.*, die u.a. bei Patienten mit COPD eine proteolytische Aktivität beobachteten, die in deren Studie zu einem Abbau des CXCR1-Rezeptors führten (Hartl *et al.* 2007). Vielleicht liegen der im Vergleich zur mRNA nur geringen Erhöhung des CXCR4-Proteins ähnliche Mechanismen zugrunde. In Bezug darauf wäre es interessant, auch für die anderen auf mRNA-Ebene weniger regulierten Chemokinrezeptoren zusätzlich die Proteinexpression zu untersuchen, da z.B. durch Proteolyse entstandene Effekte erst dann zu beobachten sind.

Im Unterschied zu anderen Chemokinrezeptoren, die meist mehrere Chemokine binden können, gibt es für den CXCR4 Rezeptor nur einen passenden natürlichen Liganden, nämlich SDF-1 (stromal derived factor-1), welcher auch umgekehrt nur an CXCR4 binden kann (Horuk 2001). Diese Tatsache deutet darauf hin, dass der SDF-1-CXCR4-Achse eine wichtige und einzigartige biologische Rolle zukommt.

Triantafilou und Kollegen identifizierten den CXCR4-Rezeptor kürzlich als Komponente in der „LPS-Erkennungs-Maschinerie“. In Wettbewerbsversuchen konnten sie zeigen, dass LPS und SDF-1 um den CXCR4-Rezeptor konkurrieren. Chemotaxis-Assays ergaben, dass LPS wie der natürliche Ligand SDF-1 direkt chemotaktisch fungieren kann. Diese LPS-vermittelte Migration ist abhängig vom G_i-Protein, was darauf hinweist, dass die Bindung von LPS dieselben biologischen Effekte auslöst wie SDF-1 (Triantafilou *et al.* 2008). Die in dieser Arbeit dokumentierte erhöhte Expression des CXCR4-Rezeptors bei COPD-Patienten könnte also auf eine Verstärkung der LPS-Signalkaskade hinweisen, was wiederum in einer Inflammation resultieren könnte.

Die Mechanismen des schnellen ersten Einströmens von reifen zirkulierenden Blutmonozyten in die Lunge z.B. bei ALI (acute lung injury) sind genauer erforscht, über die daran anschließende langsamere und länger anhaltende Rekrutierungsphase von Zellen aus dem Knochenmark über das Blut in die Lunge jedoch ist relativ wenig bekannt. Petty *et al.* untersuchten, inwieweit SDF-1 in diese zweite Phase der Rekrutierung eingreift. SDF-1 konnte vor allem in CD45-negativen Zellen, also im nicht leukozytären Lungenepithel, nachgewiesen werden und scheint seine höchste Aktivität in der späten Phase (nach 24h) zu erreichen. Die aus dem Knochenmark rekrutierten Zellen zeigen erhöhte CXCR4-Expression, was dazu beiträgt, dass diese Zellen selektiv in die Lunge gelockt werden (Petty *et al.* 2007). Ein ähnliches Szenario wäre unter Umständen bei COPD denkbar. Die Sputummakrophagen von COPD-Patienten, also vor allem die kleinen Sputummakrophagen, weisen eine hohe CXCR4 Expression auf, wodurch sie vermehrt aus dem Blut in die Lunge rekrutiert werden. Eine heterozygote Mutation im CXCR4 Gen kann zu einer seltenen Immundefizienz führen, dem WHIM-Syndrom. Die bisher beschriebenen Mutationen resultieren alle in einem CXCR4-Protein mit

verkürztem C-Terminus, was nach Rezeptor-Aktivierung zu mangelhafter Desensibilisierung und verstärkter Chemotaxis führt (Gulino *et al.* 2004). Durch diese gesteigerte Reaktion werden Neutrophile im Knochenmark zurückgehalten und am Auswandern in den Blutkreislauf gehindert. Da Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit ergaben, dass die SDF-1 Expression im Bronchialepithel im Vergleich zur Mundschleimhaut rund 600fach erhöht ist, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die hoch CXCR4 exprimierenden kleinen Sputummakrophagen nicht nur vermehrt in die Lunge einwandern, sondern auch verstärkt in der Lunge zurückgehalten werden.

Gomperts *et al.* berichteten über eine CXCR4-positive Zellpopulation von Vorläufer-Epithelzellen im Knochenmark, die im Laufe der Ausreifung die CXCR4-Expression verlieren (Gomperts *et al.* 2006), was sich mit der Theorie vereinbaren ließe, dass die kleinen Sputummakrophagen weniger ausgereift sind als die großen und frisch aus dem Blut in die Lunge einwandern.

In einem Übersichtsartikel von Busillo *et al.* wurde über Studien berichtet, die nach Aktivierung von CXCR4 eine Stimulation der Metalloproteinasen beobachteten, welche in den Abbau von Geweben involviert sind (Busillo and Benovic 2007) und bei COPD-Patienten an der Emphysementwicklung beteiligt sein könnten, worauf in folgendem Abschnitt näher eingegangen werden soll.

D.1.4 Weitere COPD-relevante Genexpressionen

Das Ungleichgewicht zwischen Proteasen und Antiproteasen scheint bei der Entwicklung eines Emphysems eine der pathologischen Hauptursachen darzustellen (Abboud and Vimalanathan 2008). Die freigesetzten Proteasen (z.B. MMP-9), die nicht vollständig durch Antiproteasen (z.B. TIMP-1) inhibiert werden, können zur Proteolyse von Lungenbindegewebe (im Speziellen Elastin) führen. Die Zerstörung von Elastin resultiert im Verlust der Elastizität des Lungenparenchyms. Das Konzept der Protease/Antiprotease Imbalance wurde aus Studien abgeleitet, die die Emphysementstehung bei Patienten mit einer Defizienz an α_1 -Antitrypsin (Hauptinhibitor der Neutrophilen-Elastase) untersuchten (MacNee 2005). Ein gestörtes Verhältnis zwischen Proteasen und

deren Inhibitoren kann jedoch auch bei Emphysem-Patienten ohne α_1 -Antitrypsin-Mangel auftreten. Hier wird der Effekt aber vor allem auf die elastolytischen Matrix-Metalloproteinasen (MMP), die von den Alveolarmakrophagen produziert werden, zurückgeführt und nicht auf die Produkte der neutrophilen Granulozyten (Abboud and Vimalanathan 2008). Studien zeigten, dass TNF und IL-1 β die MMP-9 Expression von Alveolarmakrophagen steigern können, ohne aber den Inhibitor (TIMP-1) entsprechend zu erhöhen, wodurch eine Imbalance entsteht (Saren *et al.* 1996). Oben beschriebene Theorien und Beobachtungen unterstützen auch die Ergebnisse dieser Arbeit: Raucher zeigten in Sputummakrophagen einen signifikant erhöhten Quotient aus MMP-9 und TIMP-1 im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Bei den untersuchten COPD-Probanden konnte eine weitere Erhöhung im berechneten Verhältnis beobachtet werden, der Wert zeigte aufgrund der großen Streuung in den Einzeldaten keine Signifikanz.

Auch das Eindringen von Bakterien und Umweltpartikeln in die Lunge spielt bei der COPD eine entscheidende Rolle. Lungenmakrophagen sind dabei die erste Linie der Abwehr und die auf ihrer Oberfläche exprimierten Rezeptoren tragen maßgeblich zu dieser Abwehr bei. Ein auf Makrophagen exprimierter Rezeptor, der zur Gruppe der scavenger-Rezeptoren Klasse A gehört, ist MARCO (Elomaa *et al.* 1998). Neben der Aufnahme von Bakterienbestandteilen, z.B. LPS, und intakten Bakterien (Arredouani *et al.* 2004), vermittelt MARCO auch die Bindung von nicht opsonierten Umweltpartikeln wie TiO₂ (Durchmesser ca. 1 μ m) (Palecanda *et al.* 1999). Kürzlich wurde von Kanno *et al.* beschrieben, dass MARCO auch an der Aufnahme und Beseitigung von ultra-feinen Partikeln im alveolären Bereich beteiligt ist (Kanno *et al.* 2007). In einer noch unveröffentlichten Studie von Wright *et al.* wurden Untersuchungen zur Expression von MARCO auf Sputummakrophagen von Patienten mit zystischer Fibrose (CF) durchgeführt. Wright *et al.* konnten eine deutlich reduzierte Expression des MARCO-Rezeptors auf Sputummakrophagen von CF-Patienten zeigen. Mithilfe von Antikörper-Blockierung des Rezeptors konnte eine eindeutige Beteiligung von MARCO an der Aufnahme von 1 μ m Latex-Partikeln demonstriert werden. Diese Blockade-Experimente wurden z.T. von mir durchgeführt. In Verbindung mit der erniedrigten MARCO Expression äußerte

sich dies in einer stark reduzierten Partikelaufnahme durch Sputummakrophagen von CF-Patienten (Wright *et al.* submitted). Auch in vorliegender Arbeit konnte eine deutliche Abnahme der MARCO-Rezeptor mRNA bei COPD-Patienten gegenüber gesunden Probanden um Faktor 32 gezeigt werden. Die Befunde beider Arbeiten legen nahe, dass Sputummakrophagen von CF- und COPD-Patienten eine geringere Phagozytosefähigkeit aufweisen und somit nur eine unzureichende Beseitigung inhalierter Partikel gewährleisten können. Darüber hinaus kann das Fehlen von MARCO durch reduzierte Beseitigung von oxidierten Lipiden zu einer stärkeren Schädigung durch inhalierte Aerosole führen (Dahl *et al.* 2007).

In der Pathogenese der COPD ist auch das Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien von Bedeutung (Rahman and MacNee 2000). Die Lunge ist immer wieder exogenen Oxidantien ausgesetzt (z.B. durch Zigarettenrauch), denen körpereigene antioxidative Schutzmechanismen entgegenwirken. Ein Enzym mit bedeutender antioxidativer Wirkung ist die Hämoxigenase1 (HO-1), die Lungenzellen höchst effektiv gegen oxidativen Stress schützen kann (Lakari *et al.* 2001). Die protektive Wirkung wird vermutlich über die Produkte vermittelt, die bei HO-1 vermitteltem Abbau von HÄM entstehen: CO, Fe²⁺ und Biliverdin, welches schnell zu Bilirubin weiter abgebaut wird. Jedes dieser Produkte weist Kapazitäten als Radikalfänger auf (Bach 2006). Die Reduktion in der HO-1 mRNA in Sputummakrophagen von COPD-Patienten, die in vorliegenden Untersuchungen beobachtet wurde, steht im Einklang mit den Ergebnissen von Maestrelli *et al.*, die in Alveolarmakrophagen von COPD-Patienten eine erniedrigte HO-1-Expression im Vergleich zu gesunden Rauchern zeigten (Maestrelli *et al.* 2003). Diese Befunde lassen vermuten, dass COPD-Patienten eine geschwächte Abwehr gegen oxidativen Stress vorweisen. Ein weiterer interessanter Aspekt für die Immunantwort wird von Bach beschrieben: der antiinflammatorische Effekt durch IL-10 auf Makrophagen benötigt die HO-1 Expression. Wenn HO-1 blockiert wird, kann IL-10 seine antiinflammatorischen Eigenschaften nicht entfalten (Bach 2006), was wiederum die Inflammation verstärkt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die kleinen Sputummakrophagen, die bei COPD-Patienten in Exazerbation drastisch ansteigen, eine unterschiedliche Genexpression zwischen den untersuchten Kollektiven aufweisen. Erhöhte IL-8 und erniedrigte TGF β mRNA Expression könnten einen Beitrag zur chronischen Inflammation leisten. Die anderen differenziell exprimierten Gene, wie CXCR4, HO-1 oder MARCO könnten auch über oben diskutierte Mechanismen die Entstehung einer COPD eingreifen.

D.2 Effekt von Teilchen auf die Genexpression in Monozyten und Makrophagen

Da neben dem aktiven Rauchen auch Feinstaub als wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung einer COPD angesehen wird, wurde im Rahmen vorliegender Arbeit auch der Einfluss von ultra-feinen Partikeln auf die Genexpression in Makrophagen und Monozyten untersucht. Zunächst wurde bei Sputummakrophagen die Genexpression von IL-8 und CXCR4 nach Behandlung mit ultra-feinen Partikeln ermittelt, da bei diesen Genen der größte Unterschied zwischen dem Kontroll- und Patientenkollektiv beobachtet werden konnte. Bei diesen zwei Genen zeigte sich jedoch kein Expressionsunterschied zwischen unbehandelten und mit ultra-feinem P90 behandelten Zellen. Dieser Befund veranlasste uns, mithilfe eines bereits von Dr. Hofer (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, accession number GSE 8608) durchgeführten Arrays nach anderen Gene zu suchen, die durch Partikelexposition ihr Expressionsverhalten ändern.

D.2.1 Veränderungen im mRNA-Expressionsmuster durch ultra-feine Partikel bei Cytochrom P450 1B1

Die Technik des cDNA-Arrays ist eine Methode, um erste Hinweise auf veränderte mRNA Expressionsmuster zu erhalten. Diese Ergebnisse müssen jedoch zusätzlich mit RT-PCR in Einzelproben verifiziert werden.

Bei nur einem von insgesamt 15 untersuchten Genen konnte durch RT-PCR die im Array beobachtete Expressionsänderung bestätigt werden: die Cytochrom P450 1B1 mRNA in MDM wurde durch Stimulation mit dem Partikel-Gemisch um Faktor 2,5 reduziert. Der Effekt konnte nicht nur in MDM bestätigt werden, in Blutmonozyten zeigten sich sogar wesentlich höhere Effekte nach Partikel-Exposition (bis zu Faktor 85). Auch Sputummakrophagen und durch IL-13 aktivierte MDM wurden bezüglich CYP1B1 Expression nach Partikel-Exposition untersucht. Hier wurde die CYP1B1 mRNA durch Partikel-Exposition um Faktor 3 bis 4 gesenkt (bei alternativ aktivierten Makrophagen signifikant), was vermuten lässt, das CYP1B1 in Makrophagen im Gewebe auch durch P90 reguliert sein könnte. Zusammengefasst deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass Monozyten im Laufe ihrer Ausreifung zu Makrophagen weniger sensitiv auf die Partikel reagieren könnten, was möglicherweise an einer besseren Aufnahme der Partikel in die Monozyten liegen oder durch eine verstärkte Signalkaskade in Monozyten vermittelt werden könnte.

Eine wichtige Zellart in der Lunge, die direkt von Partikelexposition betroffen ist, stellt das Bronchialepithel dar, das durch Bürstenbiopsie gewonnen werden kann. Das Material kann neben den gewünschten Epithelzellen auch Leukozyten enthalten, die die Ergebnisse beeinflussen könnten. An zwei Beispielen von Bürstenbiopsien wurde durch FACS-Analyse und Kontrolle der Zellen auf dem Zytospin die Probenzusammensetzung nachgeprüft. Die CD45-Färbung (Marker für Leukozyten) zeigte im Vergleich zu ihrem Isotyp kein nennenswertes Fluoreszenzsignal und auch die mikroskopische Auswertung bestätigte, dass die Proben weitgehend nicht mit Leukozyten kontaminiert sind. Die durch P90 verursachte Senkung der CYP1B1 mRNA kann daher auch auf die Bronchialepithelzellen bezogen werden. In den sieben untersuchten Proben traten allerdings nach der 3-stündigen P90 Inkubation unterschiedliche starke Effekte auf. Im Mittel wurde die CYP1B1 mRNA Expression um das 4fache reduziert. Beachtet werden muss jedoch hierbei, dass bei zwei Proben, die sich durch keine offensichtlichen Faktoren von den anderen unterscheiden, ein wesentlich stärkerer Effekt mit einer 14 und 35fachen Reduktion auftrat. Eine mögliche Erklärung für die weite Streuung könnte in der Auswahl der Spender liegen. Die Patienten, von denen Material aus der Lunge gewonnen wurde,

konnten nicht einheitlich nach Diagnose ausgewählt werden. So variieren hier sowohl die Erkrankung des jeweiligen Spenders als auch dessen Medikation, was sich auch auf die Suszeptibilität gegenüber den uf Partikeln und die damit verbundene CYP1B1 mRNA Expression auswirken kann.

D.2.2 Individuelle Variabilität in der CYP1B1 Expression

Nicht nur die Medikation kann zur großen individuellen Variabilität der CYP1B1 Expression beitragen. Speziell bei diesem Gen sind die inter- und intra-individuellen Expressionsunterschiede sehr groß. Dazu untersuchten Tuominen und Kollegen über einen Zeitraum von 20 Monaten die konstitutive CYP1B1-mRNA Expression in PBMC von gesunden Probanden. Dabei ergab sich eine Streuung von 3 bis 21fach für die CYP1B1 Expression bei den einzelnen Individuen zu unterschiedlichen Zeitpunkten und auch die Variation zwischen den unterschiedlichen Spendern zu einem Zeitpunkt rangierte zwischen 3- und 16fach. Es konnten aber keine signifikante Assoziationen zwischen Alter, Geschlecht, möglichen Infektionen, Alkohol-Konsum oder Umweltbelastung durch PAH hergestellt werden (Tuominen *et al.* 2003).

Nicht nur die CYP1B1 mRNA unterliegt großen individuellen Schwankungen, auch die durch diese Enzyme vermittelte katalytische Aktivität, die mit dem EROD-Assay bestimmt werden kann, weist große Unterschiede auf. Nach Stimulation von Blutlymphozyten mit 10 nM TCDD konnten van Duursen *et al.* eine Variation im maximal erreichten Induktionsniveau der EROD-Aktivität von Faktor 10 bis 150fach beobachten. Die unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber TCDD könnte auf die verschieden starke Expression des Ah-Rezeptors in Lymphozyten zurückzuführen sein (van Duursen *et al.* 2005).

D.2.3 Aktive Komponente: ultra-feines Printex 90

Nachdem durch getrennte Applikation der Partikel als aktive Komponente eindeutig das uf P90 identifiziert wurde, stellten sich zwei Fragen. Zum einen, ob der beobachtete Effekt durch eine mögliche LPS Kontamination von P90

zustande kommt, zum anderen, ob die Aktivität von P90 an seinen Eigenschaften als ultra-feiner Partikel liegt, also von seiner Oberfläche abhängig ist.

Immer wieder berichten Studien von Endotoxin-Kontaminationen, wodurch der beobachtete Effekt nicht auf die eingesetzte Substanz selbst, sondern zumindest teilweise auf das kontaminierende LPS zurückgeführt werden muss. Konno und Kollegen wiesen nach, dass kommerziell erhältliches Osteopontin (OPN) mit Endotoxin kontaminiert sein kann. Daher war wahrscheinlich, dass die beobachtete Induktion der proinflammatorischen Cytokine nicht durch OPN selbst hervorgerufen wurde, sondern durch die vorliegende LPS-Kontamination (Konno *et al.* 2005). Um für uf P90 ausschließen zu können, dass der beobachtete Effekt durch eine Verunreinigung mit LPS zustande kommt, wurden Versuche mit der Substanz Polymyxin B (PMB) durchgeführt, die in der Lage ist, LPS zu neutralisieren. Diese Experimente zeigten eindeutig, dass die Wirkung auf die CYP1B1 Expression von uf P90 ausgelöst wird und nicht durch eine LPS-Kontamination: Die Zugabe von PMB alleine beeinflusste die Genexpression von CYP1B1 im Vergleich zur unbehandelten Probe nicht, während die LPS vermittelte CYP1B1 Reduktion aufgehoben wurde und das PMB somit als wirksamer Neutralisator von LPS fungiert. Der durch P90 entstandene Effekt auf die CYP1B1 mRNA Expression blieb in An- und Abwesenheit von PMB unverändert.

Um zu klären, ob die unterschiedliche Wirkung von uf P90 und f TiO₂ auf die CYP1B1 mRNA Expression von der Partikelgröße bestimmt wird, wurden als weitere ultra-feine Teilchen uf TiO₂ in der gleichen Konzentration (32 µg/ml) und uf EC90 Partikel mit einer Konzentration von 16 µg/ml eingesetzt. Ein signifikant reduzierender Effekt zeigte sich aber weiterhin nur bei uf P90. Das könnte darauf hindeuten, dass die uf P90 vermittelte CYP1B1 Genexpressionsänderung durch dessen Partikelgröße (12 nm) und relativ große spezifische Oberfläche (300 m²/g) verursacht werden kann. Uf TiO₂ ist mit einem Durchmesser von 20 nm etwas größer und weist auch eine kleinere spezifische Oberfläche von 48 m²/g auf, was den schwächeren Effekt erklären könnte.

Ein anderer Partikel, EC90, ist im Durchmesser größer (90 nm), hat aber die größte spezifische Oberfläche von 900 m²/g, d.h., die Aggregate bilden kleinere Untereinheiten (Moller *et al.* 2005; Moller *et al.* 2002). Bei Rußpartikeln (P90, EC90) wurde das oxidative Potential auf deren Oberfläche zurückgeführt. Beck-Speier und Kollegen konnten z.B. eine hochsignifikante Korrelation zwischen der PGE₂/TXB₂ Bildung und der Partikeloberfläche, nicht aber der eingesetzten Partikel-Masse zeigen (Beck-Speier *et al.* 2005). Bei EC90 könnte man aufgrund der größeren Oberfläche auch einen größeren Effekt erwarten, da es aber nur mit halber Masse und folglich mit der gleichen Oberfläche wie P90 eingesetzt wurde, können keine Rückschlüsse hinsichtlich der Wechselbeziehung zwischen Oberfläche und Wirkung gezogen werden. Auch die erhöhte Assoziation zwischen Erkrankungen und uf Partikeln wird meistens auf deren große spezifische Oberfläche zurückgeführt (Donaldson *et al.* 2005). Eine weitere Rolle bei der Reaktivität der Partikel können chemische Zusammensetzung sowie Verunreinigungen durch Übergangsmetalle oder organische Substanzen spielen. P90 und EC90 sind beides kontrolliert hergestellte uf Kohlenstoff-Partikel, die geringe Mengen an Verunreinigungen aufweisen: während P90 sehr wenige organische Substanzen enthält, können Kontaminationen mit Übergangsmetallen auftreten. EC90 kann bis zu 5% mit organischen Stoffen beladen sein, ist aber nur sehr selten mit Übergangsmetallen verunreinigt (Moller *et al.* 2005). Die absorbierten Stoffgruppen können zur Beeinflussung der Genexpression beitragen. Rouse und Mitarbeiter konnten große Unterschiede zwischen der Wirkung von hoch gereinigten Kohlenstoffpartikeln und Kohlenstoffpartikeln mit adsorbierten PAH zeigen. Während die Inhalation von mit PAH beladenen Partikel akute Entzündungsreaktionen in der Lunge von Mäusen auslöste und damit verbunden die Induktion von Genen, die für Biotransformation, oxidativen Stress und Inflammation verantwortlich sind, zeigten sich nach der Inhalation von inerten Kohlenstoffpartikel ohne Verunreinigungen kaum proinflammatorische Antworten (Rouse *et al.* 2008). Für die Untersuchungen mit Printex 90 in vorliegender Arbeit spielt PAH-Einfluss jedoch eher eine untergeordnete Rolle, da P90 kaum solche Verunreinigungen aufweist.

Durch Inkubation mit P90 lassen sich konzentrationsabhängige Wirkungen induzieren. CD14⁺⁺ Monozyten wurden mit P90-Konzentrationen von 0 µg/ml über 0,32 µg/ml, 3,2 µg/ml, 32 µg/ml, 320 µg/ml bis 1000 µg/ml behandelt. Mit steigender Konzentration war auch ein größerer Abfall in der CYP1B1 mRNA Expression zu verzeichnen. Da die Konzentration von 32 µg/ml schon einen starken Effekt zeigte und um Material zu sparen, wurde für die weiteren Versuche eine P90-Konzentration von 32 µg/ml ausgewählt. Diese zeigt die größte Praxisnähe, was umweltrelevante Partikelbelastung in der Luft betrifft (Hofer *et al.* 2004). Alle höheren Konzentrationen stellen keine realistischen physiologischen Bedingungen dar. Um auszuschließen, dass der beobachtete Effekt bei den hohen Konzentrationen (von 32 µg/ml bis 1000 µg/ml) durch Zytotoxizität zustande kommt, wurde ein Test mit Trypanblau durchgeführt, der die Vitalität der Zellen bestätigte, unabhängig davon, mit welcher P90-Konzentration sie behandelt wurden.

Bevor die Partikel auf Zellfunktionen und Genexpressionen Einfluss nehmen, werden sie von den Zellen aufgenommen. Eine mögliche Art des Transports von ultra-feinen Partikeln stellt der Weg über den MARCO-Rezeptor dar. In einer Arbeit von Kanno *et al.* konnte eine Assoziation zwischen der Aufnahme von feinen und ultra-feinen Partikeln und dem MARCO Rezeptor gezeigt werden (Kanno *et al.* 2007). Für die vorliegende Arbeit wurde ein Pilotexperiment mit PBMC durchgeführt, indem die Zellen mit einem Antikörper behandelt wurden, der den MARCO-Rezeptor blockiert. Hierbei konnte im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle die P90 induzierte Reduktion von CYP1B1 mRNA nicht aufgehoben oder zumindest wieder angehoben werden. Demzufolge läuft der P90 Transport und die nachfolgende Herunterregulation von CYP1B1 nicht über diesen Rezeptor.

D.2.4 CYP1B1 Protein nach P90 Stimulation

Um zu überprüfen, welchen Effekt P90 auf die CYP1B1 Protein-Expression hat, gibt es unterschiedliche Untersuchungsmethoden.

Zum einen wurde der P90-Einfluss über die Enzym-Aktivität von CYP1B1 untersucht, indem Metaboliten bestimmt werden sollten, die durch CYP1B1 katalysiert aus BaP entstehen. Hierzu wurden die gereinigten Monozyten für 18h mit P90 behandelt und lysiert. Der Überstand wurde mit 20 µM BaP in DMSO versetzt. Die anschließende HPLC-Analyse wurde von einem Kooperationspartner, PD Dr. Albrecht Seidel (Biochemisches Institut für Umweltcarcinogene, Großhansdorf), durchgeführt. Hierbei konnte in den analysierten Proben nur BaP, es konnten jedoch keine Metaboliten nachgewiesen werden. Um auszuschließen, dass die Ausgangsmenge an Enzym zu gering ist, wurden bis Zellzahl erhöht (bis zu 15×10^6 Monozyten) und Zelllinien verwendet, um größere Zellmengen einsetzen zu können. Auch durch diese Maßnahmen wurde es nicht möglich, eine grundsätzliche Enzym-Aktivität von CYP1B1 zu messen. Somit konnte auch der P90 Effekt auf Proteinebene mit diesem Experiment nicht bestätigt werden.

Eine der am häufigsten verwendeten Methoden, die Enzymaktivität von P450 Ezymsystemen zu messen, ist der EROD-Assay. CYP1B1 de-ethyliert in Gegenwart von NADPH und O₂ das Substrat 7-Ethoxyresorufin zu Resorufin, welches fluoreszenzphotometrisch nachgewiesen werden kann. Zur Bewertung der Aktivität wird ein TCDD Standard mitgeführt. Zusätzlich wird auch die Proteinmenge der Zellen als Bezugsgröße bestimmt. Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für ökologische Chemie des Helmholtz Zentrums München durchgeführt. Der EROD-Assay konnte bei unseren Versuchen aber keine Erkenntnisse über die Enzymaktivität nach Behandlung der Zellen mit P90 liefern, da die Partikel die Fluoreszenzmessung beeinflussen und den Wert falsch erniedrigen. Ähnliche Beobachtungen machten Casey et al., die Interaktionen zwischen Kohlenstoff-Nanotubes und verschiedenen Farbstoffen wie Coomassie Blue, Alamar Blue und Neutral Red untersuchten. Die Interaktion zwischen Nanotubes und Farbstoffen reduzierte die assoziierte Absorption bzw. Fluoreszenz-Emission, die im Rahmen von Zytotoxizitätstests bestimmt wird, und verfälschten so die Ergebnisse (Casey et al. 2007).

In vorliegender Arbeit war das CYP1B1 Protein am besten im Western Blot nachweisbar. Um aussagenkräftige Daten zu erhalten, müssen alle Proben mit einheitlichen Proteinkonzentrationen eingesetzt werden. Nachdem der P90-

vermittelte Effekt in Monozyten am deutlichsten war, sollten zunächst auch diese Zellen für die Proteinbestimmung verwendet werden. Da CYP1B1 in der Membran des endoplasmatischen Retikulums gebunden ist, muss die Mikrosomenfraktion durch Ultraschall erzeugt und aus den Zellen isoliert werden. Auch nach Erhöhung der Zellzahl auf 75×10^6 Monozyten (Pool aus vier Spendern) konnte nicht genügend Protein isoliert werden, um im Bradfordassay die Konzentration bestimmen zu können. Da eine Zelllinie problemlos in höherer Zellzahl zur Verfügung gestellt werden kann und die Zellen auch größer sind und somit mehr Protein enthalten, wurden zur Durchführung des Western Blots Calu-3 Zellen ausgewählt. Calu-3 Zellen scheinen als Modellsystem geeignet, da sie auch eine Regulation von CYP1B1 durch P90 zeigen. Nachdem diese Zellen nach 22 h den größten P90-induzierten Abfall in der CYP1B1 mRNA Expression zeigten, wurden sie 32h (Zeitzugabe für die Translation) mit $32 \mu\text{g P90 / ml}$ behandelt, um anschließend Mikrosomen zu isolieren. Hier konnte über die Bradford Protein-Bestimmung erfolgreich Protein gemessen und von allen Proben dieselbe Menge Gesamtprotein von $10 \mu\text{g}$ in den Western Blot eingesetzt werden. Die densitometrische Analyse der Blots konnte eine Reduktion des CYP1B1 Proteins durch Behandlung mit P90 zeigen. Da die CYP1B1 mRNA in Calu-3 Zellen ähnlich reguliert ist, wie in Monozyten könnte man davon ausgehen, dass sich auch das CYP1B1 Protein in Monozyten in ähnlicher Weise verhält und ebenfalls reduziert wird.

D.2.5 Regulation von CYP1B1 – mögliche Wirkmechanismen von P90

Die Regulation des CYP1B1 und CYP1A1 Gens wird durch polyaromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) über den zytosolischen Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) gesteuert. Der wirksamste AhR-Agonist ist Dioxin (Murray *et al.* 2001), aber auch TCDD oder BaP können den Rezeptorkomplex aktivieren (Harrigan *et al.* 2005). Tabakrauch und Dieselruß enthalten große Mengen von PAH, die auf den Partikeln absorbiert sind (Kim *et al.* 2004; Rouse *et al.* 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte eine konzentrationsabhängige Induktion der

CYP1B1-Expression in PBMC durch die Behandlung mit BaP gezeigt werden. Bei gleichzeitiger Zugabe von P90 und BaP konnte die P90-induzierte Reduktion der CYP1B1 mRNA je nach BaP-Konzentration abgeschwächt bzw. ganz aufgehoben werden. Dass mit steigender BaP-, aber gleich bleibender P90-Konzentration der BaP-Effekt überwiegt, könnte ein Hinweis auf konkurrierendes Verhalten von P90 und BaP sein. Eine ähnliche Interaktion beobachteten auch Kaminsky et al., die den Einfluss von Spurenmetallen auf die durch BaP induzierte CYP1B1 Expression untersuchten. Nach Behandlung mit BaP allein konnten sie eine höhere Induktion der CYP1B1 Aktivität beobachten als nach Inkubation mit einem Gemisch aus Arsenit und BaP (Kaminsky 2006). Gleichzeitige Exposition von PAH und bestimmten Spurenmetallen, die auf Partikeln absorbiert sein können, mindert den PAH-Effekt auf CYP1B1. Dadurch könnte die Karzinogenität, die durch CYP1B1-vermittelten Abbau von PAH entsteht, reduziert werden.

Die Reduzierung der CYP1B1 mRNA durch P90 kann unterschiedliche Ursachen haben. Einerseits könnte der in vorliegender Arbeit beobachtete Effekt durch eine verminderte Transkription oder posttranskriptionell durch eine erhöhte RNA Instabilität zustande kommen. Dies wurde mithilfe von Actinomycin D untersucht. Diese Substanz interkaliert in die DNA und bindet über Phenoxazon spezifisch an Guanin und Cytosin reiche Stellen der DNA. Dadurch wird die DNA-abhängige RNA-Polymerase blockiert und somit die Transkription gehemmt (Delepierre *et al.* 1989). Nach Analyse durch RT-PCR kann die Halbwertszeit (HWZ) der vorliegenden RNA bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass die Halbwertszeit der CYP1B1 mRNA keine großen Unterschiede zwischen der Behandlung mit (HWZ 1,2 h) oder ohne (HWZ 1,6 h) Partikel aufweist. Wenn die auf Partikel das RNA-Transkript destabilisieren würden, müsste die HWZ bei mit P90 behandelten Zellen kürzer als bei unbehandelten Zellen sein. Die hier gewonnenen Ergebnisse sprechen dafür, dass P90 die Synthese der CYP1B1 mRNA inhibiert und nicht etwa das mRNA-Transkript an sich destabilisiert.

Im Gegensatz zum Wissen, das über die Induktion von CYP-Genen vorhanden ist, ist über deren Suppression noch wenig bekannt. Dass in diesem Bereich bisher weniger untersucht wurde, liegt wohl oft an der Schwierigkeit, eine

Genexpression zu messen, die von einem schon konstitutiv niedrigen Spiegel durch weitere Verminderung an die Grenzen der Sensitivität einer Analyse­methode stößt (Riddick *et al.* 2004). Untersuchungen zur CYP-Repression sind jedoch nötig, um Mechanismen zu verstehen, wie ein Organismus auf physiologische und pathophysiologische Signale reagiert. Die reduzierte Expression von CYP mRNA kann mehrere Bedeutungen haben: sie kann eine pathophysiologische Antwort auf Stresssignale (z.B. toxische Substanzen oder Inflammation), eine adaptive homeostatische Antwort (z.B. zur kontrollierten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies) oder einen Teil eines streng regulierten physiologischen Signalwegs (z.B. Produktion von Gallensäure) darstellen (Morgan 2001). Ausgelöst werden kann eine Herunterregulierung der CYP-mRNA u.a. durch inflammatorische Mediatoren (Morgan *et al.* 2002). Eine mechanistische Erklärung für die Beobachtungen, dass inflammatorische Zytokine und LPS im Speziellen die CYP1A1 mRNA reduzieren, lieferten Ke *et al.* (Ke *et al.* 2001). Sie zeigten eine direkte Interaktion zwischen dem AhR und NFκB, indem sie den suppressiven Effekt von LPS und TNF auf ein AhR-aktiviertes Reporter­gen (Luziferase) durch PDTC unterdrückten. PDTC ist dafür bekannt, NFκB-vermittelte Aktionen zu inhibieren. In den von Ke *et al.* durchgeführten Versuchen, wurde durch LPS Behandlung sowohl eine reduzierte CYP1A1 als auch CYP1B1 mRNA Expression beobachtet. Da diese beiden Gene sehr große Ähnlichkeiten aufweisen und deshalb auch durch sehr ähnliche Mechanismen reguliert werden, liegt die Vermutung nahe, dass die LPS-vermittelte Reduktion der CYP1B1 mRNA ebenfalls über Interaktionen mit NFκB laufen könnte.

In Bezug auf die Partikel-vermittelte Suppression könnte auch ein Zusammenhang über oxidativen Stress hergestellt werden. Bei den durch CYP katalysierten Reaktionen können O_2^- - Radikale oder H_2O_2 entstehen (Yasui *et al.* 2005). Diese reaktiven Sauerstoffspezies und auch Partikel, die eigenes oxidatives Potential haben, können in der Zelle zu oxidativem Stress führen. Um diesen Stress nicht noch durch weitere Katalysereaktionen durch CYP zu vergrößern, könnte die P450 Herunterregulierung, die auch in dieser Arbeit auf Behandlung mit uf P90 hin beobachtet wurde, eine Art Schutzmechanismus gegen zusätzliche oxidative Schädigungen darstellen. Andererseits könnte die

geringere CYP1B1 Expression jedoch auch bedeuten, dass sich durch ultrafeine Partikel die Empfindlichkeit gegenüber weiteren Xenobiotika erhöht, da die Entgiftungsmechanismen von CYP1B1 nicht mehr genügend effektiv arbeiten.

Basierend auf den Daten eines Arrays war es möglich, ein Gen zu identifizieren, das durch Behandlung mit ultra-feinen Partikeln reguliert wird. Die reduzierte Expression von Cytochrom P450 1B1 konnte in Monozyten sowie in weiteren Partikel exponierten Zellarten auf mRNA Ebene gezeigt werden. Auf Proteinebene wurde die verringerte Expression in einer Modell-Zelllinie bestätigt.

E Zusammenfassung

Im Krankheitsgeschehen der COPD spielen Makrophagen aufgrund ihrer Zytokinbildung und Phagozytosefähigkeit eine wichtige Rolle. Ein Ziel dieser Arbeit war es, Sputummakrophagen von COPD-Patienten, Rauchern und gesunden Probanden zu isolieren und ihre Eigenschaften zu untersuchen, um die Krankheit genauer diagnostizieren zu können und Grundlagen für neue Therapieverfahren zu schaffen. Die Sputuminduktion stellt eine nicht invasive Methode zur Gewinnung von Material aus der Lunge dar, die auch bei COPD-Patienten in einer Exazerbationsphase als ungefährlich eingestuft wird. In der Zellzusammensetzung des Sputums zeigen sich hinsichtlich der einzelnen Gruppen Unterschiede. Bei COPD-Patienten, die absolut gesehen eine höhere Zellzahl im Sputum vorweisen, überwiegt im Vergleich zu gesunden Kontrollspendern der Anteil der neutrophilen Granulozyten und der Prozentsatz an Makrophagen sinkt. Die in der absoluten Zahl leicht erhöhten Makrophagen lassen sich zusätzlich in zwei Subpopulationen unterteilen, die so genannten kleinen und großen Makrophagen. Bei COPD-Patienten in Exazerbation kann der Anteil dieser kleinen Makrophagen bis auf 90 % ansteigen, während Gesunde nur ca. 10 % dieser Zellen aufweisen.

In dieser Arbeit habe ich ein neues Verfahren zur Aufreinigung der Sputummakrophagen durch Depletion aller Nicht-Makrophagen entwickelt. Damit konnte ich erstmals die Genexpression in dieser Zellpopulation untersuchen. Dabei fand ich, dass in Sputummakrophagen das proinflammatorische Zytokin IL-8 in den Kollektiven der Raucher, ambulanten und stationären COPD-Patienten im Vergleich zu Gesunden höher exprimiert ist und das antiinflammatorische Zytokin TGF β bei stationären COPD-Patienten niedrigere mRNA Mengen zeigt, was beides auf eine erhöhte Inflammation hindeutet. Der Chemokinrezeptor CXCR4 ist sowohl auf mRNA als auch auf Protein-Ebene bei COPD-Patienten höher exprimiert als in den Vergleichsgruppen, was möglicherweise zu verstärkter Einwanderung aus dem Blut und längerem Verbleiben in der Lunge führen könnte. Das Verhältnis der Proteinasen und Antiproteinase ist COPD-Patienten in Richtung der

Proteinasen verschoben, was zur Emphysementstehung beitragen könnte. Bei COPD-Patienten konnte eine verminderte HO-1 mRNA Expression gezeigt werden. Somit wird die protektive Wirkung von HO-1 gegen oxidativen Stress in der Lunge gesenkt. Des Weiteren konnte ich eine reduzierte mRNA Expression des Phagozytoesrezeptors MARCO bei COPD-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden feststellen. Da MARCO ein wichtiger Rezeptor für die Elimination feiner und ultra-feiner Partikel ist, kann sein Fehlen zu einer mangelnden Beseitigung inhalierter Partikel und damit zur Inflammation in der Lunge führen. Damit konnte ich die eingangs formulierte Hypothese bestätigen und zeigen, dass die Genexpression in den Sputummakrophagen von COPD-Patienten deutlich verändert ist. Diese Veränderung ist im Sinne einer erhöhten Inflammation zu interpretieren.

Inwieweit ultra-feine und feine Partikel einen Beitrag zur Entstehung einer COPD leisten und Einfluss auf die Genexpression in Monozyten und anderen Partikeln exponierten Zellen nehmen können, habe ich in dieser Arbeit am Beispiel von Cytochrom P450 1B1 untersucht. Als aktiv wirksame Komponente wurde aus dem Partikelgemisch von uf P90 und f TiO₂ das uf P90 identifiziert. Mit einer Konzentration von 32 µg P90 / ml konnte nach 3h Stimulation die größte Reduktion der CYP1B1 mRNA in Monozyten beobachtet werden. Auch andere Zellarten, die Partikeln durch Inhalation ausgesetzt sein können, zeigen ein ähnliches Expressionsmuster. Dass der beobachtete Effekt nicht durch eine mögliche LPS-Kontamination auf den P90 Partikeln zustande kommt, wurde durch LPS-Neutralisationsversuche ausgeschlossen. Um zu testen, ob die Suppression der CYP1B1 mRNA allein auf die Größe der P90 Partikel zurückzuführen ist, wurde auch mit weiteren uf Partikeln stimuliert, die aber keinen vergleichbaren Effekt auslösten. Versuche zur mRNA-Stabilität legen die Vermutung nahe, dass der P90-vermittelte Effekt durch Eingreifen in den Transkriptionsmechanismus zustande kommt und nicht durch eine Destabilisierung des RNA-Transkripts ausgelöst wird. Auf Protein-Ebene konnte ich in einer bronchialen Epithelzelllinie die Reduktion von CYP1B1 demonstrieren. Somit konnte ich die Hypothese bestätigen, dass ultra-feine Partikel die Expression von CYP1B1 in Monozyten und Makrophagen regulierten. Die hier beschriebene Reduktion von CYP1B1 bedingt eine

geringere Entgiftungskapazität und fördert daher eine Schädigung des Organismus.

F Literaturverzeichnis

- Abboud, R. T., and Vimalanathan, S. (2008). Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema. *Int J Tuberc Lung Dis* **12**, 361-7.
- Alfaro-Moreno, E., Nawrot, T. S., Nemmar, A., and Nemery, B. (2007). Particulate matter in the environment: pulmonary and cardiovascular effects. *Curr Opin Pulm Med* **13**, 98-106.
- Arredouani, M., Yang, Z., Ning, Y., Qin, G., Soininen, R., Tryggvason, K., and Kobzik, L. (2004). The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles. *J Exp Med* **200**, 267-72.
- Baba, T., Ishizu, A., Iwasaki, S., Suzuki, A., Tomaru, U., Ikeda, H., Yoshiki, T., and Kasahara, M. (2006). CD4+/CD8+ macrophages infiltrating at inflammatory sites: a population of monocytes/macrophages with a cytotoxic phenotype. *Blood* **107**, 2004-12.
- Bach, F. H. (2006). Heme oxygenase-1 and transplantation tolerance. *Hum Immunol* **67**, 430-2.
- Barnes, P. J. (2007). Chronic obstructive pulmonary disease: a growing but neglected global epidemic. *PLoS Med* **4**, e112.
- Bathoorn, E., Liesker, J., Postma, D., Koeter, G., van Oosterhout, A. J., and Kerstjens, H. A. (2007). Safety of sputum induction during exacerbations of COPD. *Chest* **131**, 432-8.
- Beck-Speier, I., Dayal, N., Karg, E., Maier, K. L., Schumann, G., Schulz, H., Semmler, M., Takenaka, S., Stettmaier, K., Bors, W., Ghio, A., Samet, J. M., and Heyder, J. (2005). Oxidative stress and lipid mediators induced in alveolar macrophages by ultrafine particles. *Free Radic Biol Med* **38**, 1080-92.
- Brightling, C. E., Monterio, W., Green, R. H., Parker, D., Morgan, M. D., Wardlaw, A. J., and Pavord, D. (2001). Induced sputum and other outcome measures in chronic obstructive pulmonary disease: safety and repeatability. *Respir Med* **95**, 999-1002.
- Brook, R. D., Franklin, B., Cascio, W., Hong, Y., Howard, G., Lipsett, M., Luepker, R., Mittleman, M., Samet, J., Smith, S. C., Jr., and Tager, I. (2004). Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation* **109**, 2655-71.
- Brown, D. M., Stone, V., Findlay, P., MacNee, W., and Donaldson, K. (2000). Increased inflammation and intracellular calcium caused by ultrafine carbon black is independent of transition metals or other soluble components. *Occup Environ Med* **57**, 685-91.
- Busillo, J. M., and Benovic, J. L. (2007). Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 952-63.
- Casey, A., Herzog, E., Davoren, M., Lyng, F. M., Byrne, H. J., and Chambers, G. (2007). Spectroscopic analysis confirms the interactions between single

- walled carbon nanotubes and various dyes commonly used to assess cytotoxicity *Carbon* **45**, 1425-1432.
- Cheng, Y. X., Foster, B., Holland, S. M., Klion, A. D., Nutman, T. B., Casale, T. B., Metcalfe, D. D., and Prussin, C. (2006). CD2 identifies a monocyte subpopulation with immunoglobulin E-dependent, high-level expression of Fc epsilon RI. *Clin Exp Allergy* **36**, 1436-45.
- Chung, K. F. (2005). Inflammatory mediators in chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **4**, 619-25.
- Criée C.-P., D. B., D. Heise, P. Kardos, D. Köhler, W. Leupold, H Magnussen, W. Marek, R. Merget, H. Mitfessel, M. Rolke, S. Sorichter, H. Worth, H. Wuthe (2006). Empfehlungen der Deutschen Atemwegsliga zur Spirometrie. Pneumologie, Ev. Krankenhaus Gö.- Weende.
- Dahl, M., Bauer, A. K., Arredouani, M., Soininen, R., Tryggvason, K., Kleeberger, S. R., and Kobzik, L. (2007). Protection against inhaled oxidants through scavenging of oxidized lipids by macrophage receptors MARCO and SR-AI/II. *J Clin Invest* **117**, 757-64.
- Daldegan, M. B., Teixeira, M. M., and Talvani, A. (2005). Concentration of CCL11, CXCL8 and TNF-alpha in sputum and plasma of patients undergoing asthma or chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *Braz J Med Biol Res* **38**, 1359-65.
- Delepierre, M., Van Heijenoort, C., Igolen, J., Pothier, J., Le Bret, M., and Roques, B. P. (1989). Reassessment of structural characteristics of the d(CGCG)₂:actinomycin D complex from complete ¹H and ³¹P NMR. *J Biomol Struct Dyn* **7**, 557-89.
- Diaz, G. A., and Gulino, A. V. (2005). WHIM syndrome: a defect in CXCR4 signaling. *Curr Allergy Asthma Rep* **5**, 350-5.
- Donaldson, K., and Stone, V. (2003). Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Ann Ist Super Sanita* **39**, 405-10.
- Donaldson, K., Tran, L., Jimenez, L. A., Duffin, R., Newby, D. E., Mills, N., MacNee, W., and Stone, V. (2005). Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. *Part Fibre Toxicol* **2**, 10.
- Donnelly, L. E., and Barnes, P. J. (2006). Chemokine receptors as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Trends Pharmacol Sci* **27**, 546-53.
- Elomaa, O., Sankala, M., Pikkarainen, T., Bergmann, U., Tuuttila, A., Raatikainen-Ahokas, A., Sariola, H., and Tryggvason, K. (1998). Structure of the human macrophage MARCO receptor and characterization of its bacteria-binding region. *J Biol Chem* **273**, 4530-8.
- Falk, J. A., Minai, O. A., and Mosenifar, Z. (2008). Inhaled and systemic corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* **5**, 506-12.
- Fathi, M., Johansson, A., Lundborg, M., Orre, L., Skold, C. M., and Camner, P. (2001). Functional and morphological differences between human alveolar and interstitial macrophages. *Exp Mol Pathol* **70**, 77-82.
- Fauci, A. S. (1996). Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature* **384**, 529-34.
- Ferin, J., Oberdorster, G., and Penney, D. P. (1992). Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* **6**, 535-42.

- Fletcher, C. M. (1976). Letter: Natural history of chronic bronchitis. *Br Med J* **1**, 1592-3.
- Frankenberger, M., Menzel, M., Betz, R., Kassner, G., Weber, N., Kohlhauf, M., Haussinger, K., and Ziegler-Heitbrock, L. (2004). Characterization of a population of small macrophages in induced sputum of patients with chronic obstructive pulmonary disease and healthy volunteers. *Clin Exp Immunol* **138**, 507-16.
- Gaschler, G. J., Zavitz, C. C., Bauer, C. M., Skrtic, M., Lindahl, M., Robbins, C. S., Chen, B., and Stampfli, M. R. (2008). Cigarette smoke exposure attenuates cytokine production by mouse alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* **38**, 218-26.
- Gilmour, P. S., Ziesenis, A., Morrison, E. R., Vickers, M. A., Drost, E. M., Ford, I., Karg, E., Mossa, C., Schroepel, A., Ferron, G. A., Heyder, J., Greaves, M., MacNee, W., and Donaldson, K. (2004). Pulmonary and systemic effects of short-term inhalation exposure to ultrafine carbon black particles. *Toxicol Appl Pharmacol* **195**, 35-44.
- Gomperts, B. N., Belperio, J. A., Rao, P. N., Randell, S. H., Fishbein, M. C., Burdick, M. D., and Strieter, R. M. (2006). Circulating progenitor epithelial cells traffic via CXCR4/CXCL12 in response to airway injury. *J Immunol* **176**, 1916-27.
- Grip, O., Bredberg, A., Lindgren, S., and Henriksson, G. (2007). Increased subpopulations of CD16(+) and CD56(+) blood monocytes in patients with active Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **13**, 566-72.
- Gulino, A. V., Moratto, D., Sozzani, S., Cavadini, P., Otero, K., Tassone, L., Imberti, L., Pirovano, S., Notarangelo, L. D., Soresina, R., Mazzolari, E., Nelson, D. L., Notarangelo, L. D., and Badolato, R. (2004). Altered leukocyte response to CXCL12 in patients with warts hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome. *Blood* **104**, 444-52.
- Harrigan, J. A., McGarrigle, B. P., Sutter, T. R., and Olson, J. R. (2005). Tissue specific induction of cytochrome P450 (CYP) 1A1 and 1B1 in rat liver and lung following in vitro (tissue slice) and in vivo exposure to benzo(a)pyrene. *Toxicol In Vitro*.
- Hartl, D., Latzin, P., Hordijk, P., Marcos, V., Rudolph, C., Woischnik, M., Krauss-Etschmann, S., Koller, B., Reinhardt, D., Roscher, A. A., Roos, D., and Griese, M. (2007). Cleavage of CXCR1 on neutrophils disables bacterial killing in cystic fibrosis lung disease. *Nat Med* **13**, 1423-30.
- Hasler, J., Estabrook, R., Murray, M., and Pikuleva, I., Waterman, M., Capdevila, J., (1999). Human cytochromes P450. *Molecular Aspects of Medicine* **20** (1999), 1-137.
- Hofer, T. P., Bitterle, E., Beck-Speier, I., Maier, K. L., Frankenberger, M., Heyder, J., and Ziegler-Heitbrock, L. (2004). Diesel exhaust particles increase LPS-stimulated COX-2 expression and PGE2 production in human monocytes. *J Leukoc Biol* **75**, 856-64.
- Horuk, R. (2001). Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **12**, 313-35.
- Kaminsky, L. (2006). The role of trace metals in cytochrome P4501 regulation. *Drug Metab Rev* **38**, 227-34.

- Kanno, S., Furuyama, A., and Hirano, S. (2007). A murine scavenger receptor MARCO recognizes polystyrene nanoparticles. *Toxicol Sci* **97**, 398-406.
- Ke, S., Rabson, A. B., Germino, J. F., Gallo, M. A., and Tian, Y. (2001). Mechanism of suppression of cytochrome P-450 1A1 expression by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *J Biol Chem* **276**, 39638-44.
- Keatings, V. M., Collins, P. D., Scott, D. M., and Barnes, P. J. (1996). Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **153**, 530-4.
- Kim, J. H., Sherman, M. E., Curriero, F. C., Guengerich, F. P., Strickland, P. T., and Sutter, T. R. (2004). Expression of cytochromes P450 1A1 and 1B1 in human lung from smokers, non-smokers, and ex-smokers. *Toxicol Appl Pharmacol* **199**, 210-9.
- Kitamura, M., and Kasai, A. (2007). Cigarette smoke as a trigger for the dioxin receptor-mediated signaling pathway. *Cancer Lett* **252**, 184-94.
- Klingenberg, M. (1958). Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* **75**, 376-86.
- Konno, S., Hoshi, T., Taira, T., Plunkett, B., and Huang, S. K. (2005). Endotoxin contamination contributes to the in vitro cytokine-inducing activity of osteopontin preparations. *J Interferon Cytokine Res* **25**, 277-82.
- Kreyling, W. G., Semmler, M., Erbe, F., Mayer, P., Takenaka, S., Schulz, H., Oberdorster, G., and Ziesenis, A. (2002). Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J Toxicol Environ Health A* **65**, 1513-30.
- Kucia, M., Jankowski, K., Reza, R., Wysoczynski, M., Bandura, L., Allendorf, D. J., Zhang, J., Ratajczak, J., and Ratajczak, M. Z. (2004). CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J Mol Histol* **35**, 233-45.
- Lakari, E., Pylkas, P., Pietarinen-Runtti, P., Paakko, P., Soini, Y., and Kinnula, V. L. (2001). Expression and regulation of hemeoxygenase 1 in healthy human lung and interstitial lung disorders. *Hum Pathol* **32**, 1257-63.
- Larsson, K. (2007). Aspects on pathophysiological mechanisms in COPD. *J Intern Med* **262**, 311-40.
- Locati, M., Bonecchi, R., and Corsi, M. M. (2005). Chemokines and their receptors: roles in specific clinical conditions and measurement in the clinical laboratory. *Am J Clin Pathol* **123 Suppl**, S82-95.
- Lopez, A. D., Shibuya, K., Rao, C., Mathers, C. D., Hansell, A. L., Held, L. S., Schmid, V., and Buist, S. (2006). Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. *Eur Respir J* **27**, 397-412.
- MacNee, W. (2005). Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* **2**, 258-66; discussion 290-1.
- Maestrelli, P., Paska, C., Saetta, M., Turato, G., Nowicki, Y., Monti, S., Formichi, B., Miniati, M., and Fabbri, L. M. (2003). Decreased haem oxygenase-1 and increased inducible nitric oxide synthase in the lung of severe COPD patients. *Eur Respir J* **21**, 971-6.
- Maus, U. A., Wellmann, S., Hampl, C., Kuziel, W. A., Srivastava, M., Mack, M., Everhart, M. B., Blackwell, T. S., Christman, J. W., Schlondorff, D., Bohle, R. M., Seeger, W., and Lohmeyer, J. (2005). CCR2-positive monocytes recruited to inflamed lungs downregulate local CCL2 chemokine levels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**, L350-8.

- Moller, W., Brown, D. M., Kreyling, W. G., and Stone, V. (2005). Ultrafine particles cause cytoskeletal dysfunctions in macrophages: role of intracellular calcium. *Part Fibre Toxicol* **2**, 7.
- Moller, W., Felten, K., Sommerer, K., Scheuch, G., Meyer, G., Meyer, P., Haussinger, K., and Kreyling, W. G. (2008). Deposition, retention, and translocation of ultrafine particles from the central airways and lung periphery. *Am J Respir Crit Care Med* **177**, 426-32.
- Moller, W., Hofer, T., Ziesenis, A., Karg, E., and Heyder, J. (2002). Ultrafine particles cause cytoskeletal dysfunctions in macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol* **182**, 197-207.
- Morgan, E. T. (2001). Regulation of cytochrome p450 by inflammatory mediators: why and how? *Drug Metab Dispos* **29**, 207-12.
- Morgan, E. T., Li-Masters, T., and Cheng, P. Y. (2002). Mechanisms of cytochrome P450 regulation by inflammatory mediators. *Toxicology* **181-182**, 207-10.
- Mukhopadhyay, S., Hoidal, J. R., and Mukherjee, T. K. (2006). Role of TNFalpha in pulmonary pathophysiology. *Respir Res* **7**, 125.
- Murray, G. I., Melvin, W. T., Greenlee, W. F., and Burke, M. D. (2001). Regulation, function, and tissue-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 297-316.
- Nelson, D. R. Cytochrome P450 Homepage. Nelson, D.R.
- Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C., and Nebert, D. W. (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**, 1-42.
- Nemmar, A., Hoet, P. H., Vanquickenborne, B., Dinsdale, D., Thomeer, M., Hoylaerts, M. F., Vanbilloen, H., Mortelmans, L., and Nemery, B. (2002). Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* **105**, 411-4.
- Oberdorster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Lunts, A., Kreyling, W., and Cox, C. (2002). Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A* **65**, 1531-43.
- Omura, T., and Sato, R. (1964a). The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature. *J Biol Chem* **239**, 2370-8.
- Omura, T., and Sato, R. (1964b). The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification, and Properties. *J Biol Chem* **239**, 2379-85.
- Palecanda, A., Paulauskis, J., Al-Mutairi, E., Imrich, A., Qin, G., Suzuki, H., Kodama, T., Tryggvason, K., Koziel, H., and Kobzik, L. (1999). Role of the scavenger receptor MARCO in alveolar macrophage binding of unopsonized environmental particles. *J Exp Med* **189**, 1497-506.
- Pauwels, R. A., Buist, A. S., Ma, P., Jenkins, C. R., and Hurd, S. S. (2001). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: National Heart, Lung, and Blood Institute and World Health Organization Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD): executive summary. *Respir Care* **46**, 798-825.

- Peleman, R. A., Ryttila, P. H., Kips, J. C., Joos, G. F., and Pauwels, R. A. (1999). The cellular composition of induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* **13**, 839-43.
- Peters, A., von Klot, S., Heier, M., Trentinaglia, I., Hormann, A., Wichmann, H. E., and Lowel, H. (2004). Exposure to traffic and the onset of myocardial infarction. *N Engl J Med* **351**, 1721-30.
- Peters, A., Wichmann, H. E., Tuch, T., Heinrich, J., and Heyder, J. (1997). Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am J Respir Crit Care Med* **155**, 1376-83.
- Petty, J. M., Sueblinvong, V., Lenox, C. C., Jones, C. C., Cosgrove, G. P., Cool, C. D., Rai, P. R., Brown, K. K., Weiss, D. J., Poynter, M. E., and Suratt, B. T. (2007). Pulmonary stromal-derived factor-1 expression and effect on neutrophil recruitment during acute lung injury. *J Immunol* **178**, 8148-57.
- Rahman, I., and MacNee, W. (2000). Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J* **16**, 534-54.
- Richmond, R. J., and Zellner, K. M. (2005). Alpha1-antitrypsin deficiency: incidence and implications. *Dimens Crit Care Nurs* **24**, 255-60; quiz 261-2.
- Riddick, D. S., Lee, C., Bhatena, A., Timsit, Y. E., Cheng, P. Y., Morgan, E. T., Prough, R. A., Ripp, S. L., Miller, K. K., Jahan, A., and Chiang, J. Y. (2004). Transcriptional suppression of cytochrome P450 genes by endogenous and exogenous chemicals. *Drug Metab Dispos* **32**, 367-75.
- Ross, J. A., Auger, M.J. (2002). *The macrophage*.
- Rouse, R. L., Murphy, G., Boudreaux, M. J., Paulsen, D. B., and Penn, A. L. (2008). Soot nanoparticles promote biotransformation, oxidative stress, and inflammation in murine lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* **39**, 198-207.
- Rutgers, S. R., Timens, W., Kaufmann, H. F., van der Mark, T. W., Koeter, G. H., and Postma, D. S. (2000). Comparison of induced sputum with bronchial wash, bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies in COPD. *Eur Respir J* **15**, 109-15.
- Ryttila, P. H., Lindqvist, A. E., and Laitinen, L. A. (2000). Safety of sputum induction in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* **15**, 1116-9.
- Saren, P., Welgus, H. G., and Kovanen, P. T. (1996). TNF-alpha and IL-1beta selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *J Immunol* **157**, 4159-65.
- Shimada, T., Hayes, C. L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S. S., Guengerich, F. P., and Sutter, T. R. (1996). Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res* **56**, 2979-84.
- Smith, K. R. (2000). Inaugural article: national burden of disease in India from indoor air pollution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13286-93.
- Sutherland, E. R., Pak, J., Langmack, E. L., Silkoff, P. E., and Martin, R. J. (2002). Safety of sputum induction in moderate-to-severe chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* **96**, 482-6.
- Sutter, T. R., Tang, Y. M., Hayes, C. L., Wo, Y. Y., Jabs, E. W., Li, X., Yin, H., Cody, C. W., and Greenlee, W. F. (1994). Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome P450 that maps to chromosome 2. *J Biol Chem* **269**, 13092-9.

- Taube, C., Holz, O., Mucke, M., Jorres, R. A., and Magnussen, H. (2001). Airway response to inhaled hypertonic saline in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **164**, 1810-5.
- Teramoto, S. (2007). 1. COPD pathogenesis from the viewpoint of risk factors. *Intern Med* **46**, 77-9.
- Triantafilou, M., Lepper, P. M., Briault, C. D., Ahmed, M. A., Dmochowski, J. M., Schumann, C., and Triantafilou, K. (2008). Chemokine receptor 4 (CXCR4) is part of the lipopolysaccharide "sensing apparatus". *Eur J Immunol* **38**, 192-203.
- Tuominen, R., Warholm, M., Moller, L., and Rannug, A. (2003). Constitutive CYP1B1 mRNA expression in human blood mononuclear cells in relation to gender, genotype, and environmental factors. *Environ Res* **93**, 138-48.
- van der Vaart, H., Koeter, G. H., Postma, D. S., Kauffman, H. F., and ten Hacken, N. H. (2005). First study of infliximab treatment in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **172**, 465-9.
- van Duursen, M. B., Sanderson, J. T., and van den Berg, M. (2005). Cytochrome P450 1A1 and 1B1 in human blood lymphocytes are not suitable as biomarkers of exposure to dioxin-like compounds: polymorphisms and interindividual variation in expression and inducibility. *Toxicol Sci* **85**, 703-12.
- van Eeden, S. F., Yeung, A., Quinlan, K., and Hogg, J. C. (2005). Systemic response to ambient particulate matter: relevance to chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* **2**, 61-7.
- Vlachos-Mayer, H., Leigh, R., Sharon, R. F., Hussack, P., and Hargreave, F. E. (2000). Success and safety of sputum induction in the clinical setting. *Eur Respir J* **16**, 997-1000.
- WHO (2008). World health statistics 2008.
- Wright, A. K. A., Rao, S., Range, S., Eder, C., Hofer, T. P. J., Frankenberger, M., Kobzik, L., Brightling, C., Grigg, J., and Ziegler-Heitbrock, H. W. (submitted). Expansion of Small Sputum Macrophages in Cystic Fibrosis: Failure to Express MARCO- and Mannose-Receptors.
- Yasui, H., Hayashi, S., and Sakurai, H. (2005). Possible involvement of singlet oxygen species as multiple oxidants in p450 catalytic reactions. *Drug Metab Pharmacokinet* **20**, 1-13.
- Ziegler-Heitbrock, H. W., Thiel, E., Futterer, A., Herzog, V., Wirtz, A., and Riethmuller, G. (1988). Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer* **41**, 456-61.

G Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lungenaufbau	5
Abbildung 2: Größeneinteilung von Partikeln (modifiziert nach (Brook <i>et al.</i> 2004)); PM = particulate matter, UFP = ultra-fine particles	7
Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme von uf P90 – Aerosol (Gilmour <i>et al.</i> 2004)	8
Abbildung 4: Aufgaben und Effekte von Makrophagen bei COPD (Larsson 2007).....	12
Abbildung 5: Vereinfachte schematische Darstellung der Regulation des CYP1B1 (CYP1A1) Gens über den Ah-Rezeptor	17
Abbildung 6: Gewinnung von Sputummakrophagen über Rosettierung.....	36
Abbildung 7: Light Cycler Technologie (Quelle: Roche).....	42
Abbildung 8: FACS-Dot Blots einer Sputumprobe eines COPD-Patienten vor Aufreinigung durch Rosettierung.....	50
Abbildung 9: FACS-Dot Blots einer Sputumprobe eines COPD-Patienten nach Aufreinigung durch Rosettierung	50
Abbildung 10: Makrophagen-Populationen nach Aufreinigung mit RosetteSep (linker Dot Blot: Probe eines gesunden Spenders, rechter Dot Blot: Probe eines COPD-Patienten)	51
Abbildung 11: 100fache Vergrößerung von Sputummakrophagen (Zytospin)..	52
Abbildung 12: Prozentualer Anteil der kleinen Sputummakrophagen in der gesamten Makrophagen-Population, Vergleich von unterschiedlichen Spenderkollektiven (Kontrollen n=6, Raucher n=4, COPD ambulant n=5, COPD stationär n=9, MW ± SD)	53
Abbildung 13: Konstitutive IL-8 mRNA-Expression in Sputummakrophagen, dargestellt relativ zu α -Enolase (Kontrollen n=4, Raucher n=4, COPD stationär n=9, COPD ambulant n=5, MW ± SD, * = p < 0,05 bezogen auf Kontrollen).....	54

Abbildung 14: Konstitutive TGFβ mRNA-Expression in Sputummakrophagen, dargestellt relativ zu α-Enolase (Kontrollen n=4, Raucher n=4, COPD ambulant n=5, COPD stationär n=9, MW ± SD, * = p < 0,05 bezogen auf Kontrollen).	55
Abbildung 15: Konstitutive mRNA-Expression des Chemokinrezeptors CXCR1 in Sputummakrophagen, dargestellt relativ zu α-Enolase (Kontrollen n=6, Raucher n=4, COPD stationär n=8, COPD ambulant n=5, MW ± SD, * = p < 0,05 bezogen auf Kontrollen).	57
Abbildung 16: Konstitutive mRNA-Expression des Chemokinrezeptors CXCR1 in Sputummakrophagen, dargestellt relativ zu α-Enolase (Kontrollen n=6, Raucher n=4, COPD stationär n=13, COPD ambulant n=8, MW ± SD, * = p < 0,05 bezogen auf Kontrollen).	58
Abbildung 17: CXCR4-FITC Fluoreszenzintensitäten mit entsprechendem Isotyp. Linkes Histogramm: CXCR4-FITC Signal auf großen Sputummakrophagen eines ausgewählten gesunden Spenders. Rechts: CXCR4-FITC Signal auf kleinen Sputummakrophagen eines COPD-Patienten.	59
Abbildung 18: Verhältnis der mRNA-Kopien von MMP-9 und TIMP-1 in Sputummakrophagen (Kontrollen n=4, Raucher n=4, COPD stationär n=13, MW ± SD, * = p < 0,05 bezogen auf Kontrollen).	61
Abbildung 19: Konstitutive mRNA-Expression der Hämoxigenase1 in Sputummakrophagen, dargestellt relativ zu α-Enolase (Kontrollen n=6, Raucher n=4, COPD stationär n=8, COPD ambulant n=5, MW ± SD, ** = p < 0,005 bezogen auf Kontrollen).	62
Abbildung 20: Konstitutive mRNA-Expression des Phagozytoserezeptors MARCO in Sputummakrophagen, dargestellt relativ zu α-Enolase (Kontrollen n=4, Raucher n=4, COPD stationär n=8, MW ± SD, ** = p < 0,005 bezogen auf Kontrollen).	63
Abbildung 21: Expression von IL-8 (links) und CXCR4 (rechts) in Sputummakrophagen nach 3h +/- fTiO ₂ /ufP90 Behandlung, dargestellt relativ zu α-Enolase (IL-8: Kontrollen n=2, COPD stationär n=5, CXCR4: Kontrollen n=1, COPD stationär n=4, MW ± SD).	64

Abbildung 22: Effekt von Partikeln auf die CYP1B1 mRNA bei MDM nach 3h Stimulation (n=5 COPD, n=3 gesund, \pm SD, * = $p < 0,05$ gegen none). ... 67

Abbildung 23: Effekt von Partikeln auf die CYP1A1 mRNA bei MDM nach 3h Stimulation (n=4 COPD, n=5 gesund, \pm SD, * = $p < 0,05$ gegen none). ... 68

Abbildung 24: Effekt von Partikeln auf die CYP1B1 mRNA bei CD14⁺⁺ Monozyten nach 3h Stimulation (n=7 COPD, n=3 gesund, \pm SD; * = $p < 0,05$ gegen none)..... 68

Abbildung 25: Relative CYP1B1 mRNA Menge nach 3h Stimulation mit P90 und fTiO₂ einzeln (n=3 gesund, \pm SD,* = $p < 0,05$ bezogen auf none). 69

Abbildung 26: Relative CYP1A1 mRNA Menge nach 3h Stimulation mit P90 und fTiO₂ einzeln (n=3 gesund, \pm SD,* = $p < 0,05$ bezogen auf none). 70

Abbildung 27: Dosis-Wirkungs-Beziehung der Expression von CYP1B1 in CD14⁺⁺ Monozyten gesunder Probanden nach 3h Stimulation mit P90 (n=5, \pm SD, * = $p < 0,05$ bezogen auf 0 μ g/ml)..... 71

Abbildung 28: CYP1B1 mRNA Expression nach 3h Stimulation mit einer Dosis von 320 μ g/ml P90 in MDM gesunder Spender (n=3, \pm SD, * = $p < 0,05$ bezogen auf none)..... 71

Abbildung 29: Zeit-Wirkungs-Beziehung der mRNA-Expression von CYP1B1 in CD14⁺⁺ Monozyten gesunder Probanden nach 3h Stimulation mit P90 (n=3, \pm SD, * = $p < 0,05$ bezogen auf 0h)..... 72

Abbildung 30: CYP1B1 mRNA Expression nach 3h LPS- und P90-Stimulation mit und ohne PMB in CD14⁺⁺-Monozyten gesunder Probanden (n=6, \pm SD, * = $p < 0,05$)..... 73

Abbildung 31: CYP1B1 mRNA Expression in Sputummakrophagen von COPD-Patienten (n=7), gesunden Rauchern (n=4) und gesunden Nichtrauchern (n=2) nach 3-stündiger Behandlung mit Partikel-Gemisch (P90 und fTiO₂ je 32 μ g/ml) \pm SD. 74

Abbildung 32: Effekt von P90 auf die CYP1B1 mRNA von in vitro generierten MDM und unreifen DC von gesunden Spendern (n=4, MW \pm SD, * = $p < 0,5$). 74

Abbildung 33: CYP1B1 mRNA Expression in den Zelllinien A549 (n=3) und Calu3 (n=4) nach 22h Stimulation, \pm SD, * = $p < 0,05$ bezogen auf none... 75

Abbildung 34: CYP1B1 mRNA Expression in Epithelzellen aus Bürstenbiopsien (n=7) nach 3h Stimulation mit P90 (32µg/ml), ± SD, * = p<0,05 bezogen auf none.	75
Abbildung 35: Zeit-Wirkungs-Beziehung für die CYP1B1 mRNA Expression in PBMC nach Behandlung mit 10 µM BaP (n=3 gesund, ±SD, * = p<0,05).....	76
Abbildung 36: Gegenseitige Beeinflussung der CYP1B1 mRNA Expression durch BaP und P90 in PBMC gesunder Probanden (n=4, ± SD, * = p<0,05 gegen none).....	77
Abbildung 37: Bestimmung der Halbwertszeit von CYP1B1 mRNA mit und ohne Partikel-Stimulation in PBMC gesunder Probanden (n=4, ± SD).	78
Abbildung 38: Beeinflussung der CYP1B1 mRNA Regulation durch Kultur in unterschiedlichen Gefäßen (PBMC gesunder Spender, n=3, MW ± SD)..	79
Abbildung 39: CYP1B1 mRNA Expression in PBMC nach 3h Inkubation mit verschiedenen Partikeln (PBMC gesunder Spender, n=5 (bei f TiO ₂ n=2), ± SD, * = p<0,05).....	80
Abbildung 40: links: Proteinbanden von CYP1B1 bei 57 kDa und Aktin bei 42 kDa derselben Probe im Western Blot, jeweils ohne und mit 32h 32 µg P90/ml Behandlung (ein repräsentatives Beispiel von drei Experimenten, bei CYP1B1: 3 036 276 units für unbehandelte Zellen, 373 799 units für mit P90 behandelte Zellen); rechts: CYP1B1 mRNA Expression in Calu-3 nach 32h (MW n=3, ± SD, * = p<0,05).	81

H Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien	19
Tabelle 2: Verwendete Lösungen und Medien	24
Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	25
Tabelle 4: Verwendete Antikörper und Isotyp-Kontrollen	26
Tabelle 5: Verwendete Partikel	26
Tabelle 6: Verwendete Primerpaare.....	28
Tabelle 7: Verwendete Geräte	29
Tabelle 8: RT-Transkriptions-Mix	41
Tabelle 9: Reaktionsansatz für die LightCycler-PCR	43
Tabelle 10: Amplifikationsprogramm.....	43
Tabelle 11: Expression der mRNA verschiedener Zytokine nach 3h ± 1 µg LPS/ml	55
Tabelle 12: Konstitutive mRNA Expressionen der untersuchten Cytokine, dargestellt relativ zu α-Enolase ± SD.	56
Tabelle 13: Konstitutive mRNA Expressionen der untersuchten Chemokinrezeptoren, dargestellt relativ zu α-Enolase ± SD.....	57
Tabelle 14: Untersuchte Gene, die im Array verändertes Expressionsmuster aufwiesen.....	66

I Danksagung

Am Zustandekommen einer Doktorarbeit sind immer viele Personen beteiligt. Deshalb möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mich während meiner Arbeit betreut und unterstützt haben.

Zunächst danke ich Herrn. Prof. Dr. Löms Ziegler-Heitbrock für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die engagierte und umfassende Betreuung.

Bei Herrn PD Dr. Michael Pfaffl und Herrn Prof. Dr. Heinrich Meyer möchte ich mich bedanken, dass sie sich als Gutachter zur Verfügung gestellt haben.

Ganz besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Marion Frankenberger, die mir mit großer fachlicher Kompetenz und viel Geduld in jeglicher Fragestellung zur Seite stand.

Dr. Thomas Hofer danke ich ebenfalls sehr für seine hilfsbereite, kompetente und ausdauernde Betreuung. Nicht nur im Laboralltag, auch bei Computerproblemen war er mir zu jeder Zeit behilflich.

Dem Team der Station 2.2 der Asklepios Fachklinik Gauting, vor allem Herrn OA Dr. Weber, möchte ich für die große Hilfs- und Kooperationsbereitschaft danken.

Allen anderen Kollegen der KKG möchte sehr für das angenehme Arbeitsklima danken: vor allem ganz herzlich meinen Zimmerkolleginnen, Irene Heimbeck und Claudia Unterberger, und Gudrun Kaßner, die mittlerweile alle zu Freunden geworden sind. Sie bauten mich immer wieder auf und ohne sie hätte alles viel weniger Spaß gemacht. Danke auch an Dr. Winfried Möller für die Unterstützung u.a. bei PC-Problemen und Dr. Valerie Albrecht, für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, was mir den Start sehr erleichterte.

Bei meinen Eltern, meinem Freund und allen meinen Freunden möchte ich mich ganz besonders bedanken. Sie haben mich von Anfang bis Ende der Arbeit, jeder auf seine eigene, jeweils für mich sehr wichtige und unersetzliche Art und Weise unterstützt.