

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis der CD14-Abhängigkeit des Phagozytosesystems

3.1.1 Charakterisierung des anti-CD14-Antikörpers RMO 52

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Regulation CD14-abhängiger Prozesse von humanen Monozyten. Darum war es wichtig, für die einzelnen Funktionen die CD14-Abhängigkeit nachzuweisen. Dies wurde durch die Wirkung des blockierenden monoklonalen murinen anti-CD14-Antikörpers RMO52 erreicht. Zur Deutung der Ergebnisse war es interessant, die Wirkung des Antikörpers RMO52 funktionell zu charakterisieren.

Eine wichtige Funktion von CD14 ist die Bindung von LPS. Diese Bindung ist für die Einleitung einer intensiven LPS-vermittelten Entzündungsreaktion, wie zum Beispiel der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, notwendig. [61] In einem ersten Experiment untersuchten wir den Einfluss einer 30-minütigen Vorinkubation mit dem anti-CD14-Antikörpers RMO52 auf die LPS-induzierte TNF- α -Produktion in der Vollblutkultur. Der Antikörper RMO52 kann die Wirkung des LPS auf die monozytäre TNF- α -Produktion fast vollständig verhindern (Tabelle 1). Diese Ergebnisse zeigen, dass dieser Antikörper mit der LPS-bindenden Region des CD14-Moleküls interferiert und deren Funktion blockiert.

Tabelle 1: Einfluss einer Vorinkubation mit dem anti-CD14-Antikörpers RMO52 auf die LPS-induzierte TNF- α -Sekretion der Monozyten in Vollblutkulturen

TNF- α	LPS	LPS + RMO52	LPS + Isotyp-mAk
Versuch 1	5900	87	9140
Versuch 2	4560	72	6200
Versuch 3	8390	147	10000 [in pg/ml]

Untersucht wurde der Einfluss einer Vorinkubation (30 min.) mit dem anti-CD14-Antikörper RMO52 (25 $\mu\text{g/ml}$) bzw. einem Isotypkontrollantikörper (Isotyp-mAK IgG2a, 25 $\mu\text{g/ml}$) auf die durch LPS (500 pg/ml) induzierte TNF- α -Produktion in humanen Vollblutkulturen (4 Stunden).

3.1.2 Überprüfung der CD14-Abhängigkeit

Um die Regulation und die Effektivität der monozytären CD14-abhängigen Phagozytose von Bakterien untersuchen zu können, muss ein Phagozytoseassay verwandt werden, bei dem das Vorhandensein von mCD14 auf den Monozyten der limitierende Faktor ist. In dem von Grunwald et al. [1001] erstmals beschriebenen System wird die Phagozytose von nicht-opsonierten *E. coli* untersucht. Durch die Zugabe von EDTA wurde das freie Kalzium gebunden; eine Opsonierung der Bakterien durch die Kalzium-abhängige Aktivierung der Komplementkaskade konnte so verhindert werden. Auch die von Kalzium abhängige durch Komplement und/oder Antikörper (IgG) vermittelte Aufnahme der Bakterien wurde verhindert. Die CD14-Abhängigkeit des so entstandenen Systems konnte durch Blockierung der Phagozytose durch einen Antikörper gegen die LPS-bindende Region des CD14-Moleküls nachgewiesen werden. Es bestand keine Kalzium-Abhängigkeit der CD14-vermittelten *E. coli*-Phagozytose. [44] [siehe auch eigene Ergebnisse Punkt 3.2, Abbildung 2]

In diesem Experiment untersuchten wir die CD14-Abhängigkeit des von uns verwendeten Versuchsaufbaus. Des weiteren wollten wir eine optimale Konzentration des blockierenden anti-CD14-Antikörpers RMO52 finden, um in späteren Versuchen jeweils die CD14-Abhängigkeit nachzuweisen.

Das von uns durchgeführte Experiment bestätigt, dass dieser Versuchsaufbau zu einer weitgehend CD14-abhängigen Phagozytose führt. Während der Isotypkontrollantikörper keinen Einfluss auf die Phagozytoseleistung hatte, konnte durch die Vorinkubation mit dem anti-CD14-Antikörper RMO52 die *E. coli*-Ingestion konzentrationsabhängig gehemmt werden (Abbildung 1). Da der Hemmeffekt bei einer Konzentration von 25 µg/ml am stärksten war, wurde in den folgenden Versuchen mit dieser Konzentration gearbeitet.

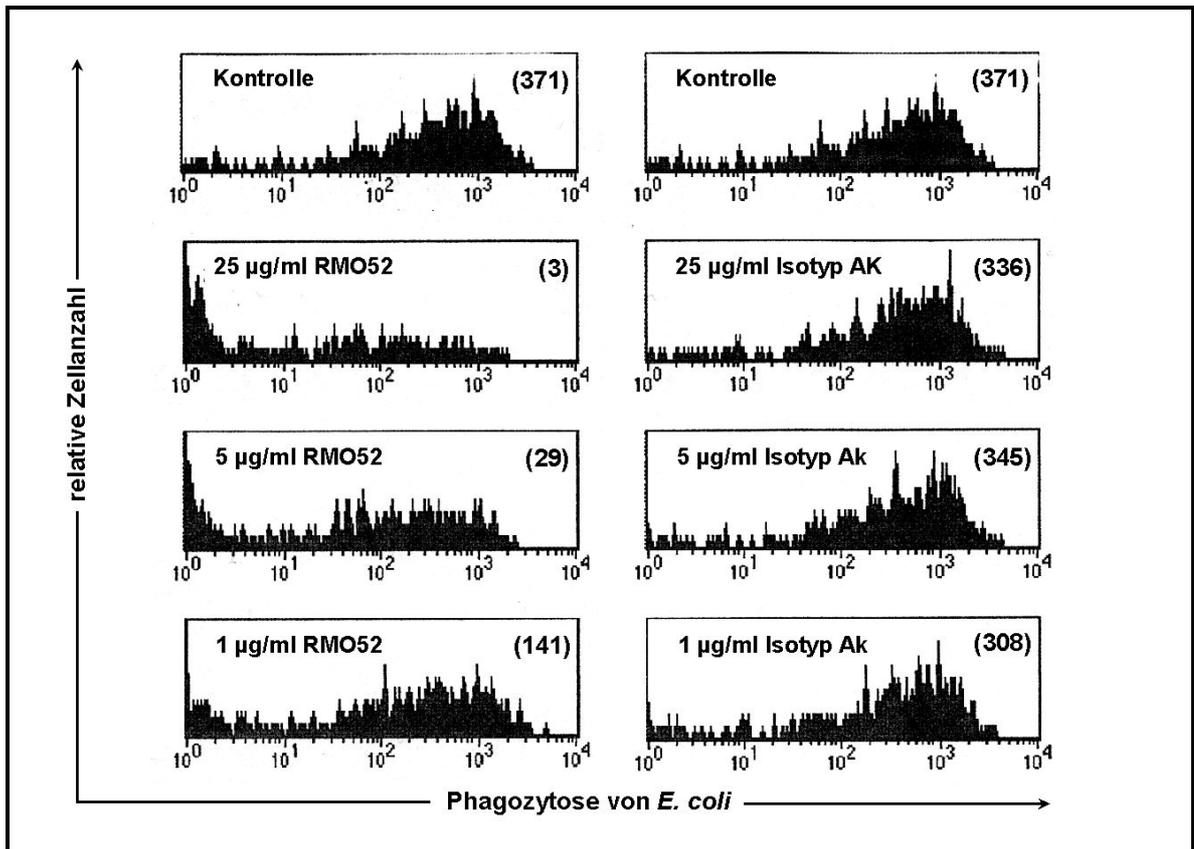


Abbildung 1: Nachweis der CD14-Abhängigkeit der Phagozytose von nicht-opsonierten *E. coli*-Bakterien im Kalzium-freien Milieu mittels des blockierenden anti-CD14-Antikörpers RMO52.

Vollblutkulturen wurden mit verschiedenen Konzentrationen des anti-CD14-Antikörpers RMO52 bzw. eines Isotypkontrollantikörpers (Isotyp-mAk) vorinkubiert. Nach der EDTA-Zugabe erfolgte die Inkubation (20 min.) mit den nicht-opsonierten *E. coli*-Bakterien und die durchflusszytometrische Analyse der Monozyten. Dargestellt sind die repräsentativen Fluoreszenzhistogramme der Monozyten entsprechend der aufgenommenen FITC-markierten *E. coli* aus einem von zwei unabhängigen Versuchen. Die linke Spalte zeigt die Wirkung von RMO52, die rechte Spalte die Wirkung des Isotypkontrollantikörpers im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die mittlere Fluoreszenzintensität [MFI] ist in der rechten oberen Ecke der Histogramme in Klammern angegeben.

3.2 Effektivität der CD14-abhängigen Phagozytose von Bakterien

Nachdem wir einen durch CD14 limitierten Phagozytoseassay für Monozyten etabliert hatten, fragten wir uns nach der möglichen biologischen Relevanz dieses Phagozytosemechanismus. Dazu untersuchten wir die Kapazität der CD14-abhängigen Phagozytose unopsonierter Bakterien im Vergleich zur in der Literatur gut charakterisierten Fc- und Komplementrezeptor-abhängigen Phagozytose von opsonierten *E. coli*. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 2 dargestellt.

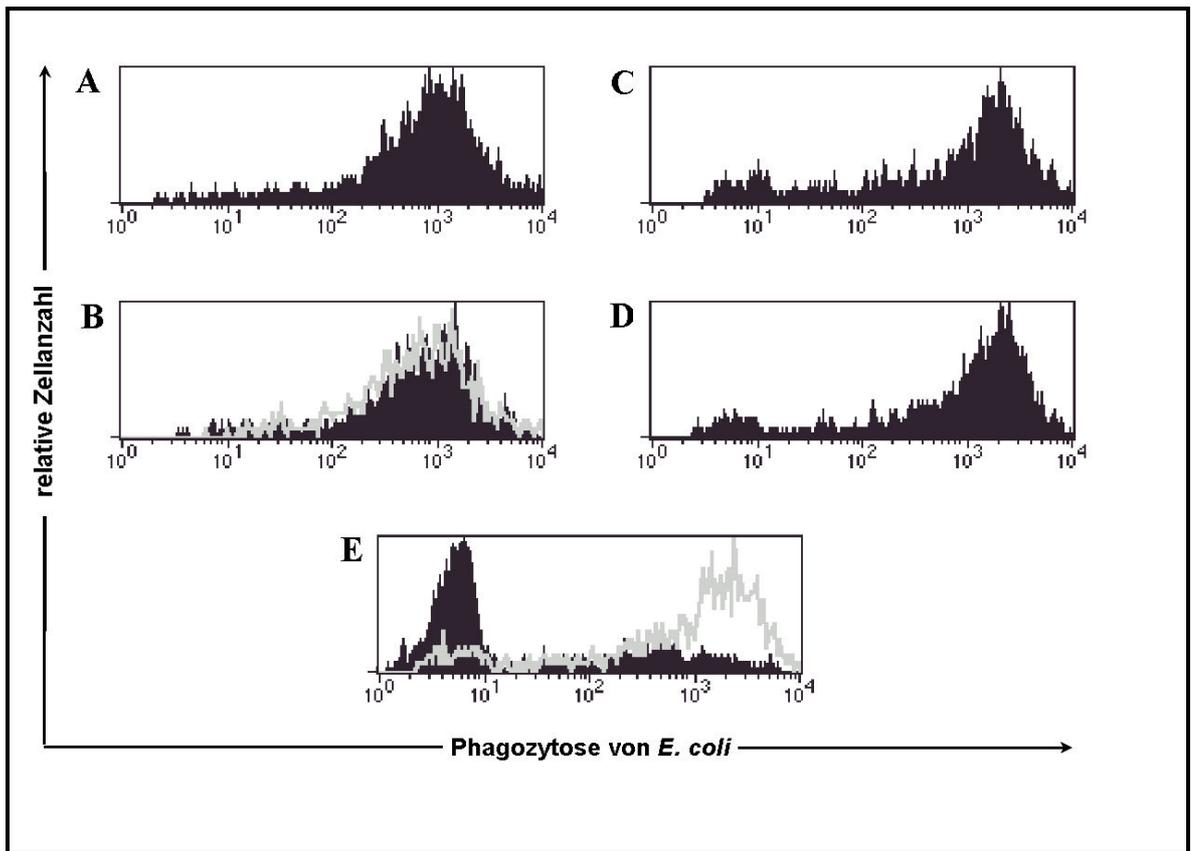


Abbildung 2: Vergleich der Effektivität der uneingeschränkten und CD14-abhängigen Phagozytose von *E. coli*-Bakterien im Vollblutansatz.

Die uneingeschränkte Phagozytose wurde in Kalzium-haltigem Vollblut untersucht. Dabei wurden opsonierte (A) und nicht-opsonierte *E. coli* (C) gegenübergestellt. Eine CD14-abhängige Komponente der Phagozytose von opsonierten *E. coli* wurde durch blockierende anti-CD14-Antikörper ausgeschlossen (B). Durch Kalzium-Depletion mit EDTA wurden sowohl eine mögliche Komplementopsonierung der nicht-opsonierten *E. coli* als auch eine Komplement- oder Antikörper-abhängige Phagozytose verhindert (D). Die Phagozytose von nicht-opsonierten *E. coli* im Ca²⁺-depletierten Vollblut konnte durch CD14-Blockade aufgehoben werden (E). Die Abbildung zeigt repräsentative Fluoreszenzhistogramme der Monozyten entsprechend der aufgenommenen FITC-markierten *E. coli*-Bakterien aus einem von drei unabhängigen Experimenten. Die grauen Linien repräsentieren die Phagozytose nach Zugabe des Isotypkontrollantikörpers (B und E).

- A: Opsonierte *E. coli* in heparinisiertem Vollblut
- B: Opsonierte *E. coli* in heparinisiertem Vollblut nach CD14-Blockade
- C: Nicht-opsonierte *E. coli* in heparinisiertem Vollblut
- D: Nicht-opsonierte *E. coli* in Kalzium-depletiertem (EDTA) Vollblut
- E: Nicht-opsonierte *E. coli* in Kalzium-depletiertem (EDTA) Vollblut nach CD14-Blockade

Als erstes stellten wir die uneingeschränkte Phagozytoseleistung von im Vorab opsonierten (A) und nicht-opsonierten (C) *E. coli*-Bakterien gegenüber. Diese Ergebnisse zeigen die mögliche Leistungsfähigkeit der monozytären *E. coli*-Phagozytose. Als nächstes untersuchten wir, ob auch die Phagozytose von opsonierten *E. coli* einen CD14-abhängigen Anteil enthält. Die Phagozytose von opsonierten Bakterien ließ sich jedoch nicht durch die Zugabe des blockierenden anti-CD14-Antikörpers einschränken (B). Während in (C) noch eine Opsonierung der Bakterien in den heparinisierten Vollblutkulturen durch Komplement möglich ist, wird dies in (D) durch die Zugabe von EDTA (Bindung der Kalziumionen; Verhinderung der Komplementaktivierung) blockiert. Überraschend fand sich auch unter diesen Bedingungen keine Einschränkung der *E. coli*-Phagozytose. Fügt man jedoch noch einen blockierenden anti-CD14 Antikörper (RMO52) hinzu, so wird die Fähigkeit der Monozyten, *E. coli*-Bakterien zu phagozytieren, vollständig aufgehoben (E).

Aus diesen Ergebnissen können mehrere Schlüsse gezogen werden. Zum einen unterscheidet sich in Vollblutkulturen die monozytäre Phagozytoseleistung von mit Antikörpern und Komplement opsonierten *E. coli* (A) nicht von der Leistung, nicht-opsonierte *E. coli* im Vollblut zu phagozytieren (C). Welche Rolle die Opsonierung mit Komplement bei der Phagozytose der nicht-opsonierten *E. coli* (C) spielt, kann nur vermutet werden. Dieser Prozess ist durchaus möglich. Es zeigte sich aber, dass durch die Blockierung der Komplementkaskade durch eine Kalziumdepletion die Phagozytose der nicht-opsonierten *E. coli* in keiner Weise behindert wird (D). Auf der anderen Seite wird die Phagozytose der opsonierten *E. coli*-Bakterien durch eine CD14-Blockade kaum gemindert (B). Werden jedoch beide Wege blockiert, die Opsonierung der nicht-opsonierten *E. coli* durch den Kalziumentzug auf der einen Seite und die Aufnahme der Bakterien über CD14 durch eine spezifische Antikörperblockade auf der anderen Seite, wird die Phagozytose von nicht opsonierten *E. coli* weitgehend aufgehoben (E).

Die Ergebnisse des Experimentes zeigen, dass die CD14-abhängige Phagozytose von *E. coli* durch Monozyten so effektiv ist wie die Phagozytose von opsonierten *E. coli*. Die Hemmung von nur einem Weg (Opsonierungs- bzw. CD14-vermittelte Phagozytose) kann vollständig ausgeglichen werden. Dies unterstreicht die Redundanz der Monozyten in dieser wichtigen Funktion. Die Aufgabe der Monozyten, Gram-negative Bakterien zu phagozytieren, kann somit durch unterschiedliche, aber gleichermaßen effektive Mechanismen abgedeckt werden.

3.3 Regulation der monozytären CD14-Expression und Freisetzung

Das Ziel unserer Arbeiten war es, die Regulation der CD14-abhängigen monozytären Phagozytose durch wichtige immunregulatorische Zytokine zu charakterisieren. Dabei wollten wir auch die Frage nach einer Korrelation zwischen der Regulation der CD14-Expression der Monozyten und der Leistung der CD14-abhängigen Phagozytose beantworten. In der Literatur wurden unterschiedliche, teilweise widersprüchliche Effekte der für uns interessanten Zytokine IL-10, TGF- β 1 und IFN- γ auf die Regulation der monozytären Expression von CD14 beschrieben. Um uns über die Wirkung dieser Zytokine auf das CD14-System einen Überblick zu verschaffen, untersuchten wir deshalb sowohl die Regulation der CD14-Membranexpression auf den Monozyten als auch die Freisetzung von löslichem CD14.

Als erstes überprüften wir den Einfluss von IL-10, TGF- β 1 und IFN- γ auf die CD14-Expression der Monozyten in 24-Stunden-Kulturen von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC). Die Konzentration des freigesetzten löslichen CD14 (sCD14) wurde in den Überständen dieser Kulturen bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Einfluss von IL-10, TGF- β 1 und IFN- γ auf die monozytäre CD14-Expression und die Freisetzung von löslichem CD14.

	mCD14 [MFI]	sCD14 [ng/ml]
Kontrolle	572 \pm 41	16,7 \pm 1,3
IL-10	992 \pm 70 #	32,5 \pm 4,2 #
TGF- β 1	355 \pm 33 #	16,5 \pm 1,4
IFN- γ	283 \pm 29 #	10,3 \pm 1,2 #

Humane PBMC wurden für 24 Stunden mit IL-10, TGF- β 1 oder IFN- γ in einer Konzentration von 10 ng/ml kultiviert. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der monozytären CD14-Expression (mCD14) wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse, die Konzentration des freigesetzten löslichen CD14 (sCD14) mittels ELISA bestimmt. Die Tabelle zeigt die Ergebnisse (Mittelwert \pm SEM) aus 6 unabhängigen Versuchen.

Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$; Wilcoxon Test) gegenüber der Kontrolle.

Während IL-10 auf beides, die Expression und die Freisetzung von CD14, einen stimulierenden Effekt hat, bewirkt IFN- γ jeweils eine Hemmung. TGF- β 1 hat keinen einheitlichen Effekt. Es hemmt die monozytäre CD14-Oberflächenexpression, hat auf die Freisetzung von löslichem CD14 aber keinen Einfluss.

Im nächsten Schritt wurde die Abhängigkeit der Effekte von der Zytokinkonzentration untersucht. Hierbei konnten wir zeigen, dass sowohl die Wirkung von IL-10, TGF- β 1 und IFN- γ auf die monozytäre CD14-Expression als auch der Einfluss von IL-10 auf die Freisetzung von löslichem CD14 in der PBMC-Kultur signifikant von der Konzentration der eingesetzten Zytokine abhängt. Für die Wirkung von IFN- γ auf die Freisetzung von löslichem CD14 zeigt sich keine signifikante Abhängigkeit der hier eingesetzten Konzentrationen. Es scheint vielmehr schon bei der kleinsten Konzentration der Maximaleffekt nahezu erreicht zu sein (Abbildung 3).

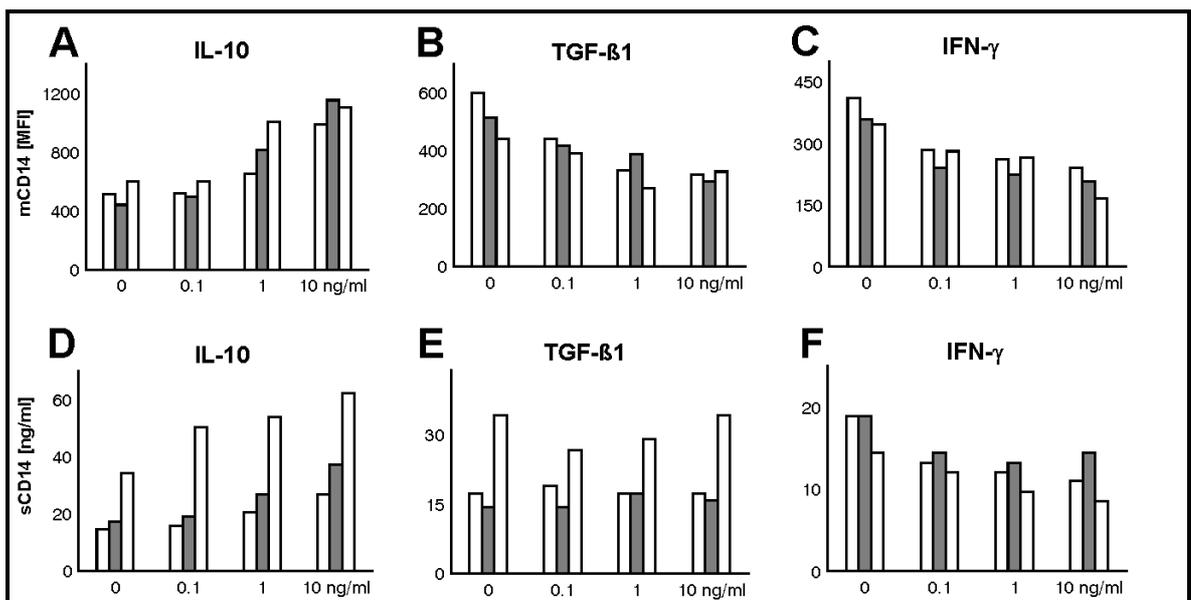


Abbildung 3: Konzentrationsabhängigkeit der Effekte von IL-10, TGF- β 1 und IFN- γ auf die monozytäre CD14-Expression und die Freisetzung von löslichem CD14.

Humane PBMC wurden für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von IL-10, TGF- β 1 oder IFN- γ inkubiert. Die obere Reihe (A, B, C) zeigt die durchflusszytometrisch bestimmte mittlere Fluoreszenzintensität der monozytären CD14-Expression (mCD14). In der unteren Reihe (D, E, F) ist die mittels ELISA aus den Kulturüberständen bestimmte Sekretion von löslichem CD14 (sCD14) dargestellt. Für jedes Zytokin werden die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten angegeben.

Für die Effekte A bis D wurde eine signifikante Abhängigkeit von der Zytokinkonzentration ($p < 0,05$; Friedman-Test) festgestellt.

Des weiteren untersuchten wir die Abhängigkeit der Zytokinwirkung von der Zeit. Auch in diesem Fall konnten wir einen signifikanten Einfluss der Zytokine nachweisen (Abbildung 4). Während IL-10 und IFN- γ auf die monozytäre CD14-Expression und die Freisetzung von löslichem CD14 eine einheitliche steigernde bzw. hemmende Wirkung haben, hatte TGF- β 1 wiederum nur auf die Regulation der CD14-Expression einen hemmenden Einfluss.

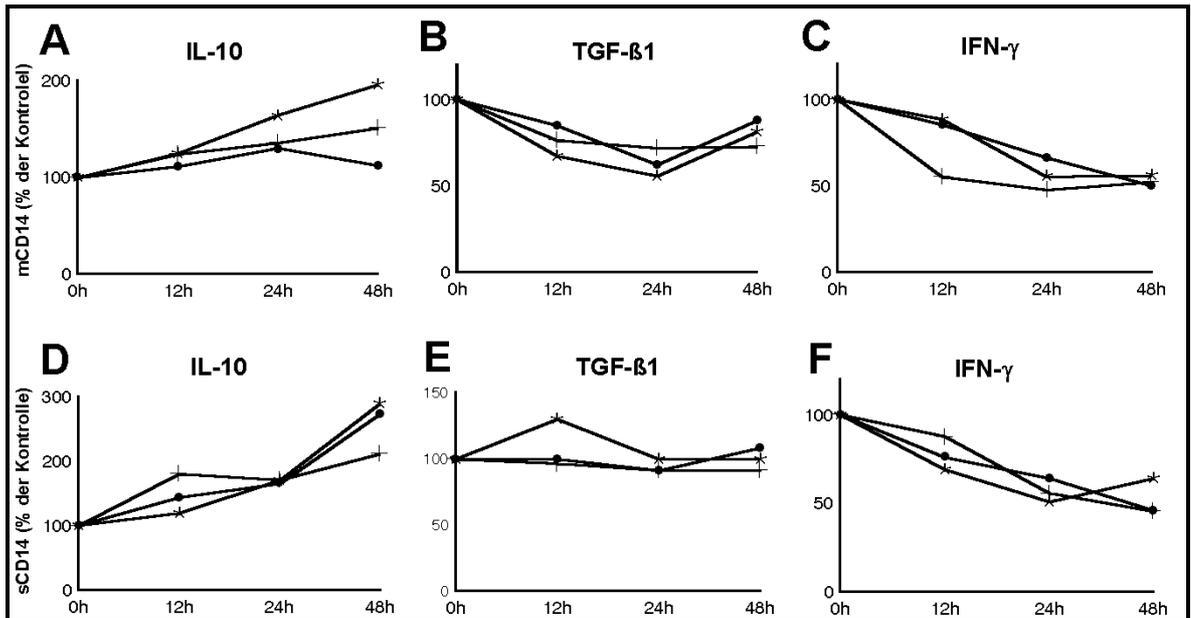


Abbildung 4: Kinetik der Effekte von IL-10, TGF- β 1 und IFN- γ auf die monozytäre CD14-Expression und die Freisetzung von löslichem CD14.

Humane PBMC wurden für unterschiedliche Zeiten mit IL-10, TGF- β 1 oder IFN- γ in einer Konzentration von 10 ng/ml inkubiert. Die obere Reihe (A, B, C) zeigt die durchflusszytometrisch bestimmte mittlere Fluoreszenzintensität der monozytären CD14-Expression (mCD14). In der unteren Reihe (D, E, F) ist die mittels ELISA aus den Kulturüberständen bestimmte Sekretion von löslichem CD14 (sCD14) dargestellt. Die Bestimmungen wurden jeweils nach 12, 24 und 48 Stunden durchgeführt. Für jedes Zytokin werden die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten als Prozentwert der Ergebnisse in der jeweiligen Kontrollkultur angegeben.

Für die Effekte A bis D und F wurde eine signifikante Abhängigkeit von der Inkubationszeit ($p < 0,05$; Friedman-Test) festgestellt.

3.4 Regulation der CD14-abhängigen Phagozytose von Bakterien

Nachdem wir die Regulation der CD14-Expression auf Monozyten untersucht hatten, wollten wir klären, ob es einen Zusammenhang zwischen den auf die CD14-Expression beobachteten Zytokineffekten und der Stärke der CD14-abhängigen Phagozytose gibt.

In einer Reihe von Vorversuchen wurde zuerst der bestmögliche Zeitpunkt für die Untersuchung der Wirkung der einzelnen Zytokine auf die CD14-abhängige Phagozytose in Vollblutkulturen bestimmt. Die Ergebnisse (nicht dargestellt) zeigten uns einen optimalen Effekt von IL-10 nach 24 Stunden und von TGF- β 1 und IFN- γ nach 48 Stunden. In der Folge arbeiteten wir mit diesen Inkubationszeiten.

3.4.1 Einfluss von IL-10

Nach einer 24-stündigen Vorinkubation der Kontroll- und IL-10-behandelten Vollblutkulturen bestimmten wir die monozytäre CD14-Expression und die CD14-abhängige Phagozytose von *E. coli* durch die Monozyten. Die monozytäre CD14-Expression wurde durch IL-10 um durchschnittlich 40% gesteigert (Tabelle 3). Auch die monozytäre Leistung der CD14-abhängigen Phagozytose wurde durch IL-10 um durchschnittlich 45% erhöht. Durch die Blockade von CD14 wurde die Phagozytose der Monozyten sowohl in den Kontrollkulturen als auch in den IL-10-behandelten Kulturen vollständig verhindert (Abbildung 5). Dies weist auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Steigerung der monozytären CD14-Oberflächenexpression und der CD14-abhängigen Phagozytose durch IL-10 hin.

Tabelle 3: Einfluss von IL-10 auf die monozytäre CD14-Expression

	Kontrolle	IL-10
mCD14 [MFI]	855 \pm 93	1198 \pm 148 #

Nach einer 24-stündigen Inkubation von Vollblutkulturen mit IL-10 (10 ng/ml) wurde durchflusszytometrisch die CD14-Expression (mCD14) auf den Monozyten bestimmt. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) von 6 unabhängigen Versuchen werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$, Wilcoxon Test) gegenüber der Kontrolle.

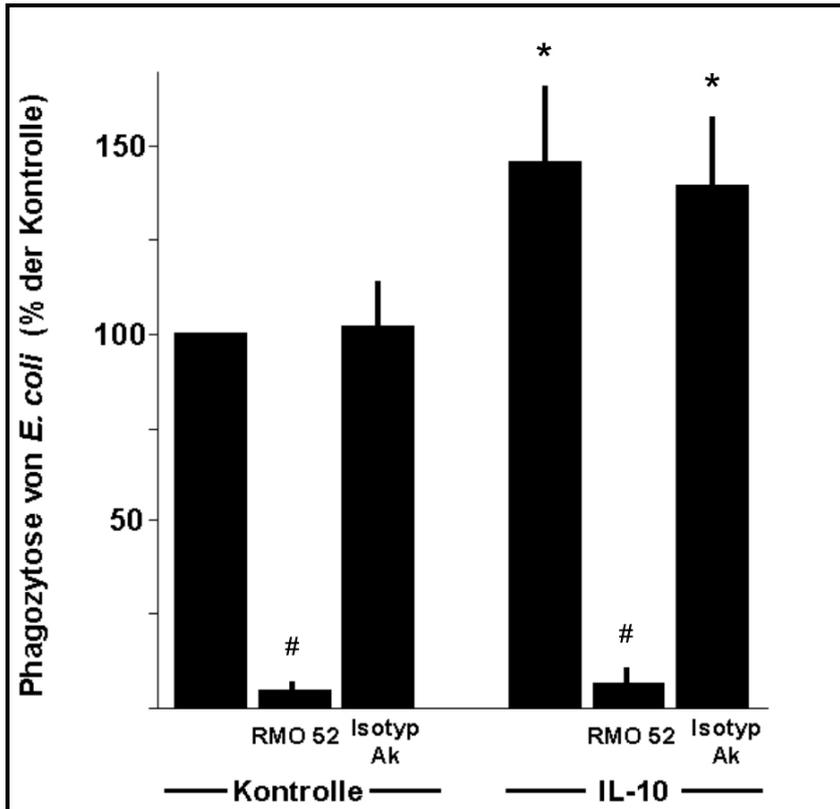


Abbildung 5: Einfluss von IL-10 auf die CD14-abhängige Phagozytose von *E. coli*.

In 6 unabhängigen Versuchen wurde heparinisiertes Vollblut für 24 Stunden mit/ohne IL-10 (10 ng/ml) vorinkubiert. Danach wurden die Kulturen mit EDTA versetzt und in jeweils drei Fraktionen aufgeteilt. Die erste Fraktion diente als unbehandelte Kontrolle. Der zweiten Fraktion wurde zum Nachweis der CD14-Abhängigkeit der blockierende anti-CD14-Antikörper RMO 52 und der dritten ein Isotypkontrollantikörper zugesetzt (jeweils 25 µg/ml). Nach einer 20-minütigen Inkubation mit den nicht-opsonierten FITC-markierten *E. coli* wurde die monozytäre Phagozytose durchflusszytometrisch bestimmt. Für die Kontrollkulturen (linke Balkengruppe) und die IL-10-behandelten Kulturen (rechte Balkengruppe) ist jeweils die Phagozytose der unbehandelten (ohne Antikörper), der mit anti-CD14-Antikörper (RMO 52) und der mit Isotypkontrollantikörpern behandelten Ansätze dargestellt. Die Balken geben den Prozentwert der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der phagozytierten *E. coli* bezogen auf die MFI der unbehandelten Ansätze der Kontrollkulturen an. Sie werden als Mittelwert ± SEM dargestellt.

* Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$; Wilcoxon Test) gegenüber dem gleichen Ansatz der Kontrollkultur.

Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$; Wilcoxon Test) gegenüber dem unbehandelten und dem Isotypantikörper-behandelten Ansatz der gleichen Vorinkubation.

3.4.2 Einfluss von TGF- β 1 und IFN- γ

Als nächstes untersuchten wir den Zusammenhang zwischen der Regulation der CD14-Expression und der CD14-abhängigen Phagozytose durch eine Vorbehandlung mit TGF- β 1 und IFN- γ .

Nach der 48-stündigen Vorkultur wurde die monozytäre CD14-Expression bestimmt. Hierbei zeigten sich für beide Zytokine hemmende Effekte. Die CD14-Expression verminderte sich durch TGF- β 1 um durchschnittlich 54% und durch IFN- γ um 32% im Vergleich zu den Kontrollkulturen (Tabelle 4).

Bei der Analyse der Phagozytoseleistung stellte sich ein in gleicher Weise hemmender Einfluss der beiden Zytokine heraus. TGF- β 1 wie auch IFN- γ verminderten die Phagozytose von nicht-opsonierten *E. coli*-Bakterien um durchschnittlich ca. 45% gegenüber den Kontrollkulturen. Die CD14-Abhängigkeit wiesen wir durch die Aufhebung der Phagozytose durch blockierende anti-CD14-Antikörper nach (Abbildung 6).

Auch diese Ergebnisse zeigen einen direkten Zusammenhang zwischen der Regulation der CD14-Expression und der CD14-abhängigen Phagozytose durch die untersuchten Zytokine.

Tabelle 4: Einfluss von TGF- β 1 und IFN- γ auf die monozytäre CD14-Expression.

	Kontrolle	TGF- β 1	IFN- γ
mCD14 [MFI]	1047 \pm 81	483 \pm 54 #	712 \pm 87 #

Nach einer 48-stündigen Inkubation von Vollblutkulturen mit TGF- β 1 oder IFN- γ (jeweils 10 ng/ml) wurde durchflusszytometrisch die CD14-Expression (mCD14) auf den Monozyten bestimmt. Die Tabelle zeigt die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) als Mittelwert \pm SEM aus 6 unabhängigen Versuchen.

Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$, Wilcoxon Test) gegenüber der Kontrolle.

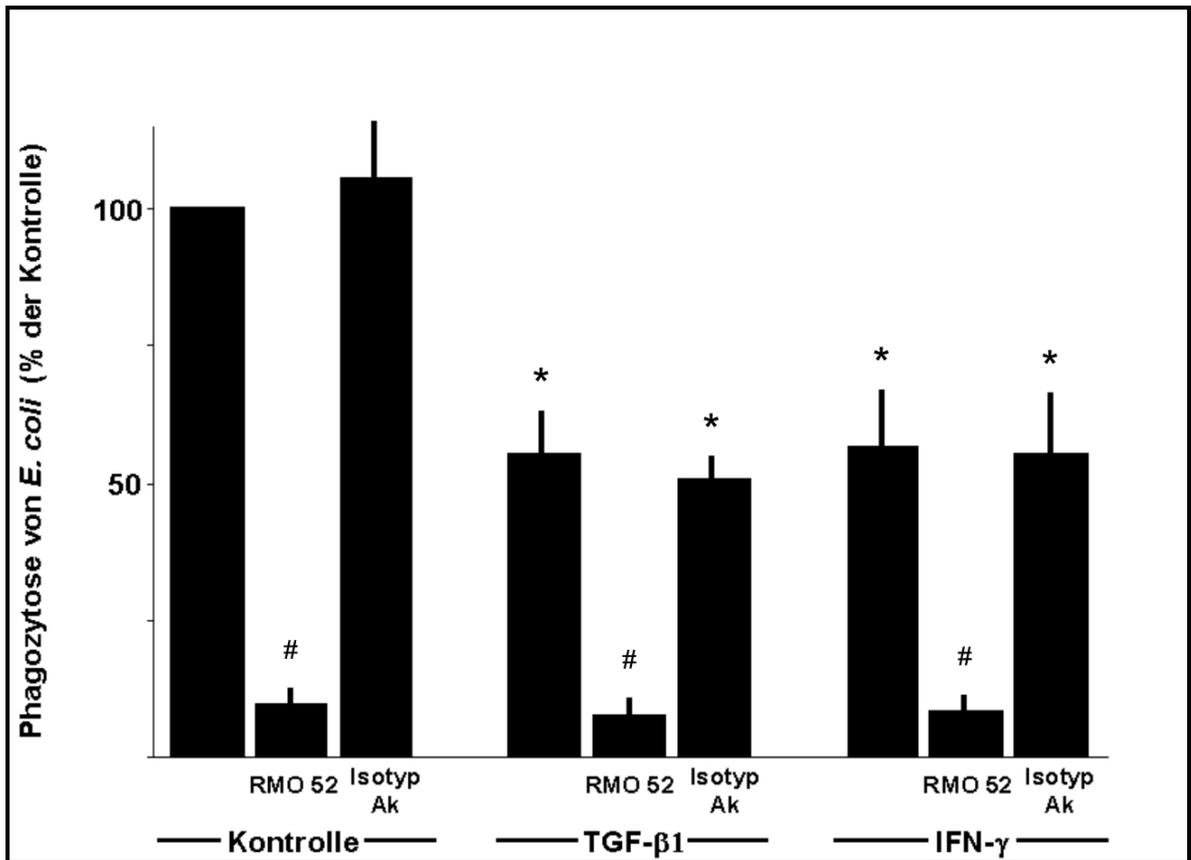


Abbildung 6: Einfluss von TGF-β1 und IFN-γ auf die CD14-abhängige Phagozytose von *E. coli*.

In 6 unabhängigen Versuchen wurde heparinisieretes Vollblut für 48 Stunden mit/ohne TGF-β1 oder IFN-γ (10 ng/ml) vorinkubiert. Danach wurden die Kulturen mit EDTA versetzt und in jeweils drei Fraktionen aufgeteilt. Die erste Fraktion diente als unbehandelte Kontrolle. Der zweiten Fraktion wurde zum Nachweis der CD14-Abhängigkeit der blockierende anti-CD14-Antikörper RMO 52 und der dritten ein Isotypkontrollantikörper zugesetzt (jeweils 25 µg/ml). Nach einer 20-minütigen Inkubation mit den nicht-opsonierten FITC-markierten *E. coli* wurde die monozytäre Phagozytose durchflusszytometrisch bestimmt. Für die Kontrollkulturen (linke Balkengruppe), die TGF-β1-behandelten Kulturen (mittlere Balkengruppe) und die IFN-γ-behandelten Kulturen (rechte Balkengruppe) ist jeweils die Phagozytose der unbehandelten (ohne Antikörper), der mit anti-CD14 Antikörper (RMO 52) und der mit Isotypkontrollantikörpern behandelten Ansätze dargestellt. Die Balken geben den Prozentwert der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der phagozytierten *E. coli* bezogen auf die MFI der unbehandelten Ansätze der Kontrollkulturen an. Sie werden als Mittelwert ± SEM dargestellt.

* Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$; Wilcoxon Test) gegenüber dem gleichen Ansatz der Kontrollkultur.

Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$; Wilcoxon Test) gegenüber dem unbehandelten und dem Isotypantikörper-behandelten Ansatz der gleichen Vorinkubation.

3.4.3 Untersuchung von Kurzeiteffekten der Zytokine

In den bisherigen Untersuchungen konnten wir einen gleichgerichteten Effekt der ausgewählten Zytokine auf die monozytäre CD14-Expression und die CD14-abhängige Phagozytose von Gram-negativen Bakterien durch die Monozyten demonstrieren. Die Ergebnisse legen nahe, dass diese Zytokine die CD14-abhängige Phagozytose über die Veränderung der CD14-Expression regulieren. Denkbar ist aber auch eine direkte Wirkung der Zytokine auf den Prozess der Phagozytose selbst, d.h., unabhängig von der CD14-Expression. In den von uns verwandten Langzeitansätzen (24 bzw. 48 Stunden) werden diese Effekte unter Umständen durch die CD14-Expressionsveränderungen verdeckt. Eine Kurzzeitvorbehandlung mit den Zytokinen sollte dagegen mögliche von den Veränderungen der CD14-Expression unabhängige Zytokinwirkungen zeigen.

Da es auch in der Literatur keinen Hinweis auf die Regulation der Kurzeiteffekte der nicht-CD14-abhängigen Phagozytose gibt, entschlossen wir uns in diesem Zusammenhang auch die uneingeschränkte Phagozytose zu untersuchen. Dieses uneingeschränkte System erreichten wir, indem wir auf die Zugabe von EDTA verzichteten. Dadurch konnten die nicht-opsonierten Bakterien durch alle im Vollblut verfügbaren Mechanismen markiert und phagozytiert werden. Auch die Opsonierung durch das Komplementsystem war in diesem System möglich. Wir untersuchten im Folgenden den Einfluss einer Kurzzeitinkubation mit IL-10, TGF- β 1 und IFN- γ auf die uneingeschränkte und die CD14-abhängige Phagozytose und auf die monozytäre CD14-Expression.

Nach einer 1-stündigen Vorinkubation zeigten sich keine nennenswerten Effekte der Zytokine auf die uneingeschränkte und die CD14-abhängige Phagozytose. Geringe Veränderungen nach einer 4-stündigen Zytokinvorinkubation deckten sich in ihrer Richtung mit den bekannten Ergebnissen in den Langzeitkulturen und waren von gleichlaufenden geringen Veränderungen der monozytären CD14-Expression begleitet (Abbildung 7).

Aus diesen Ergebnissen kann die Schlussfolgerung abgeleitet werden, dass es sich bei der Regulation der Phagozytose durch die untersuchten Zytokine, sowohl im uneingeschränkten als auch im CD14-abhängigen System, nicht um einen schnellen Zytokineffekt handelt. Des Weiteren konnten für diese frühen Zeitpunkte andersartige oder sogar gegenteilige Wirkungen der Zytokine auf die Fähigkeit der Monozyten, Bakterien (*E. coli*) aufzunehmen, ausgeschlossen werden.

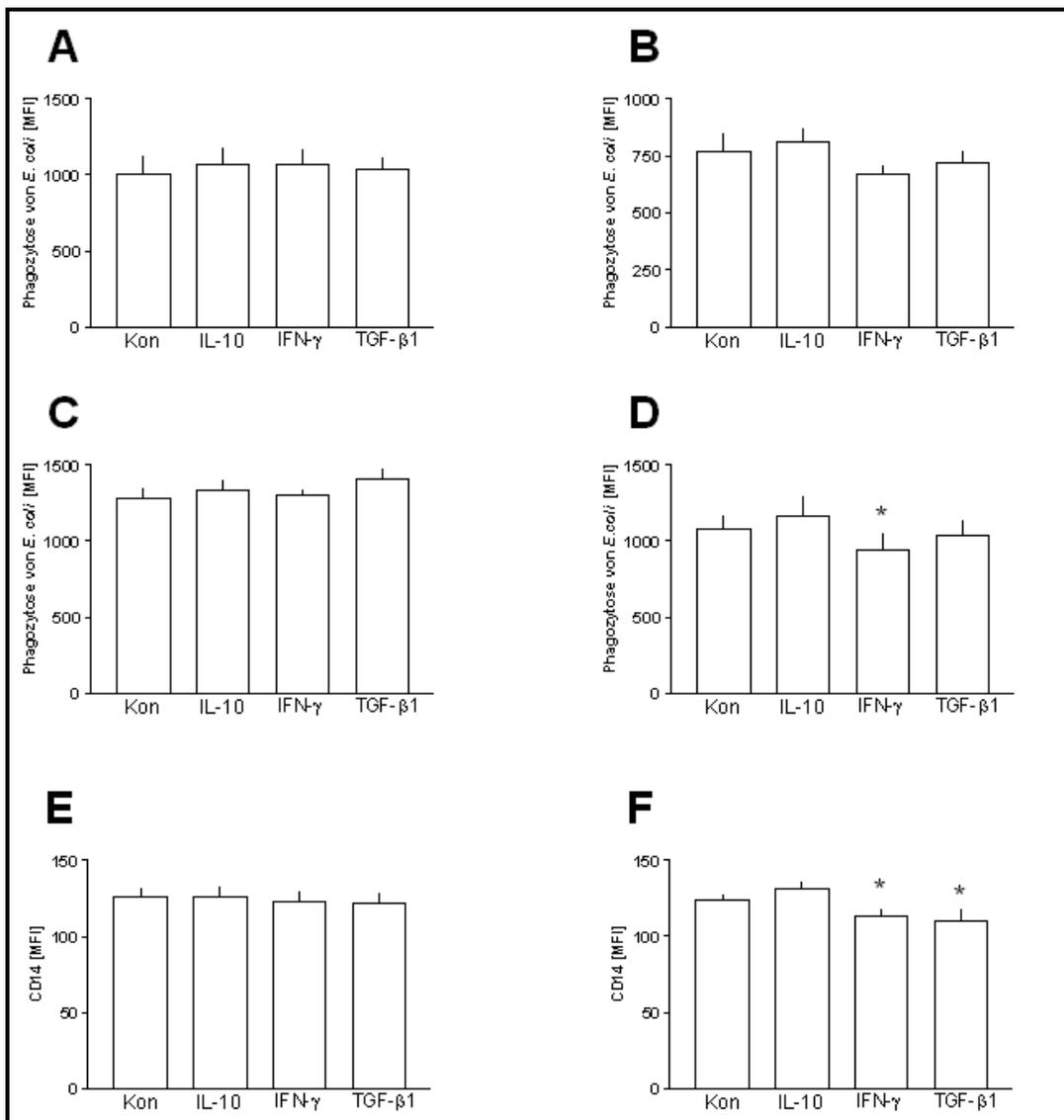


Abbildung 7: Untersuchung der Kurzzeiteffekte von IL-10, TGF-β1 und IFN-γ auf die monozytäre Phagozytose von *E. coli*.

Vollblut wurde mit/ohne IL-10, TGF-β1 oder IFN-γ (10 ng/ml) für 1 bzw. 4 Stunden vorinkubiert. Danach wurde die monozytäre CD14-Expression durchflusszytometrisch bestimmt. Die Kulturen wurden nachfolgend in zwei Fraktionen aufgeteilt. Die erste Fraktion diente der Analyse der Regulation der uneingeschränkten Phagozytose, die zweite Fraktion mit Zugabe von EDTA der Bestimmung der CD14-abhängigen Phagozytose. Nach einer 20-minütigen Inkubation mit den nicht-opsonierten Bakterien wurde die monozytäre Phagozytose der FITC-markierten *E. coli* durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Abbildung zeigt für die 1-Stunden- (linke Spalte, A, C, E) und die 4-Stunden-Vorinkubationen (rechte Spalte, B, D, F) die Mittelwerte \pm SEM der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) aus fünf unabhängigen Versuchen. In der oberen Reihe sind die Resultate der uneingeschränkten Phagozytose (A, B) und in der mittleren Reihe die Ergebnisse der CD14-abhängigen Phagozytose (C, D) dargestellt. Die untere Reihe zeigt den Einfluss der Zytokine auf die monozytäre CD14-Expression (E, F).

* Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$; Wilcoxon Test) gegenüber der Kontrollkultur (Kon).

3.5 Phagozytose von apoptotischen Zellen

Zu Beginn unserer Arbeiten war nur sehr wenig über CD14 als Phagozytoserezeptor bekannt; es lagen ausschließlich Ergebnisse zu Phagozytose von Gram-negativen Bakterien vor. Nach der Beendigung der Versuche zeigten neuere Veröffentlichungen, dass CD14 auch an der Phagozytose von apoptotischen Zellen, insbesondere von apoptotischen Lymphozyten, beteiligt ist. [58] Dies war der Grund, warum wir noch zusätzlich erste Untersuchungen zur Regulation der Phagozytose von apoptotischen Lymphozyten durchführten. Auch wenn es sich nur um die ersten Vorversuche zu diesem Komplex handelt, reichen die Ergebnisse aus, um sie im Rahmen dieser Arbeit vorzustellen und zu diskutieren.

3.5.1 Herstellung und Färbung der apoptotischen Zellen

Um die Ergebnisse besser reproduzierbar zu machen, arbeiteten wir mit einer T-Lymphozytenzelllinie, den Jurkat-Zellen. Den Prozess der Apoptose leiteten wir durch eine Bestrahlung mit Gamma-Strahlen ein. Zum Apoptosenachweis nutzten wir die durchflusszytometrische Analyse des Phosphatidylserin (PS) auf der Oberfläche der Jurkatzellen mittels Markierung mit FITC-gekoppeltem Annexin-V.

In einer Austestung definierten wir den Zeitpunkt, zu dem nach der Bestrahlung ein möglichst hoher Anteil der Jurkatzellen apoptotisch war. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 8 dargestellt. Während vor der Bestrahlung nur ca. 10% der Zellen apoptotisch waren, steigerte sich dieser Anteil kontinuierlich auf ca. 75% nach 18 Stunden. In den weiteren Versuch inkubierten wir die Jurkatzellen nach der Bestrahlung für jeweils 18 Stunden.

Um die Aufnahme der apoptotischen Zellen in die Monozyten nachweisen zu können, mussten die Jurkatzellen markiert werden. Dazu benutzten wir den Farbstoff PKH 67-GL, welcher sich in die Membran einlagert, ohne jedoch die Eigenschaften der Zellen weiter zu beeinflussen. Diese einfache Färbung führten wir nach der 18-stündigen Inkubation direkt vor dem Phagozytostest durch.

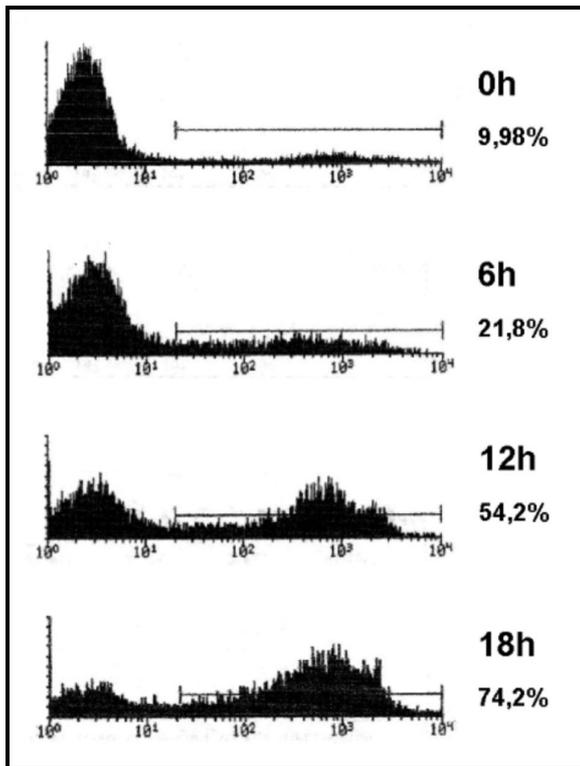


Abbildung 8: Untersuchung der Apoptoseinduktion in Abhängigkeit von der Zeit.

Jurkatzellen wurden mit 40 Gy bestrahlt und nachfolgend kultiviert. Vor der Kultur sowie nach 6, 12 und 18 Stunden wurden Zellaliquots mit Annexin V-FITC markiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt ist das Fluoreszenzspektrum (FL1) der Annexin V-FITC markierten Jurkatzellen. Die Zahlen auf der rechten Seite der Histogramme geben die Länge der Inkubation nach Bestrahlung in Stunden (h) und den prozentualen Anteil der Annexin V-positiven Jurkatzellen an. Der Histogramm-Marker zur Bestimmung des Anteils positiver Zellen wurde durch Kontrollinkubationen ohne Annexin V-FITC festgelegt. Die Abbildung zeigt die repräsentativen Ergebnisse eines von zwei unabhängigen Versuchen.

3.5.2 Einfluss von IL-10 auf die Phagozytose von apoptotischen Zellen

Als nächstes hatten wir zu entscheiden, unter welchen Bedingungen wir die Regulation der Phagozytose von apoptotischen Zellen prüfen wollten. Da im Gegensatz zur Bakterienphagozytose keine etablierten und gut beschriebenen Phagozytosewege bekannt waren und in der ersten Veröffentlichung von Devitt et al. [58] eine deutliche CD14-Abhängigkeit der Phagozytose von apoptotischen Lymphozyten durch Makrophagen beschrieben wurde, entschieden wir uns, die mögliche Beeinflussbarkeit der Phagozytose von apoptotischen Zellen in einem uneingeschränkten System zu untersuchen. Dies sollte es uns auch ermöglichen, Rückschlüsse auf die Bedeutung bzw. den Anteil der CD14-abhängigen Phagozytose in Bezug auf die Gesamtpotenz der Monozyten zur Aufnahme apoptotischer Lymphozyten zu ziehen.

Um die Regulation der CD14-abhängigen Phagozytose von apoptotischen Zellen zu zeigen, führten wir parallel zu der 18-stündigen Apoptoseinduktion eine Vollblutkultur durch. Wir entschieden uns für eine Vorinkubation des Vollblutes mit IL-10, da dieses Zytokin in diesem Zusammenhang besonders interessant schien.

Folgende Punkte sprachen für die Untersuchung insbesondere der IL-10-Wirkung:

- 1) IL-10 wird bei Zuständen mit vermehrten Zelluntergängen (z.B. Trauma) vermehrt systemisch freigesetzt. [62]
- 2) In der Literatur ist beschrieben, dass apoptotische Lymphozyten selbst IL-10 produzieren und freisetzen können. [51]
- 3) Eine Steigerung der Phagozytoseleistung durch IL-10 (in Analogie zur Bakterienphagozytose) könnte zur Abräumung von untergegangenen Gewebe beitragen.

Für den Nachweis der Phagozytose von apoptotischen Zellen benutzten wir einen ähnlichen Versuchsaufbau wie für die Bakterienphagozytose. Allerdings verzichteten wir, um ein uneingeschränktes System zu erreichen, auf die Zugabe von EDTA.

Um zu zeigen, dass diese Phagozytose wirklich abhängig ist vom Zustand der Apoptose der Jurkatzellen, führten wir zwei Versuche mit nicht-bestrahlten Jurkatzellen durch. Dabei betrug der Anteil an apoptotischen Zellen weniger als 10%. Die Phagozytose von nicht-bestrahlten Jurkatzellen durch Monozyten war um mehr als 90% gegenüber den Versuchen mit bestrahlten, apoptotischen Zellen eingeschränkt (Ergebnisse nicht dargestellt).

Nach der 18-stündigen Inkubation der bestrahlten Jurkatzellen betrug der Anteil an apoptotischen Zellen in allen Versuchen mindestens 70%. Die CD14-Expression in den Vollblutkulturen wurde durch IL-10 um durchschnittlich 37% gegenüber den Kontrollen gesteigert (mCD14 [MFI±SEM]: 529 ± 41 gegenüber 395 ± 57).

Wie in der Abbildung 9 dargestellt, wird die monozytäre Phagozytose von apoptotischen Jurkatzellen durch die Wirkung von IL-10 fast verdoppelt (A, D). Während der Isotypkontrollantikörper auf die Phagozytoseleistung der Monozyten keinen erkennbaren Einfluss hat (C, F), wird durch die Blockade von CD14 durch den spezifischen anti-CD14-Antikörper RMO52 die Phagozytose um ca. 60% deutlich eingeschränkt (B, E). Trotz der stark ausgeprägten CD14-Abhängigkeit wird interessanterweise auch die CD14-unabhängige Phagozytose durch IL-10 fast verdoppelt (B, E).

Diese Ergebnisse zeigen, dass apoptotische Lymphozyten durch einen zum großen Teil von CD14 abhängigen Weg phagozytiert werden und dass auch dieser Mechanismus durch eine IL-10-Exposition verstärkt wird.

Aus diesen ersten Ergebnissen ergeben sich viele interessante Ansätze für weitere Untersuchungen der Phagozytose von apoptotischen Zellen, zum einen die Analyse der CD14-unabhängigen Phagozytosemechanismen, zum anderen die Untersuchung der Regulation der einzelnen Mechanismen, aber auch der Gesamtphagozytose, durch andere Zytokine, wie zum Beispiel IFN- γ und TGF- β 1. Dieser gesamte Themenkomplex zur Regulation der Phagozytose von apoptotischen Zellen wurde bisher noch nicht näher untersucht.

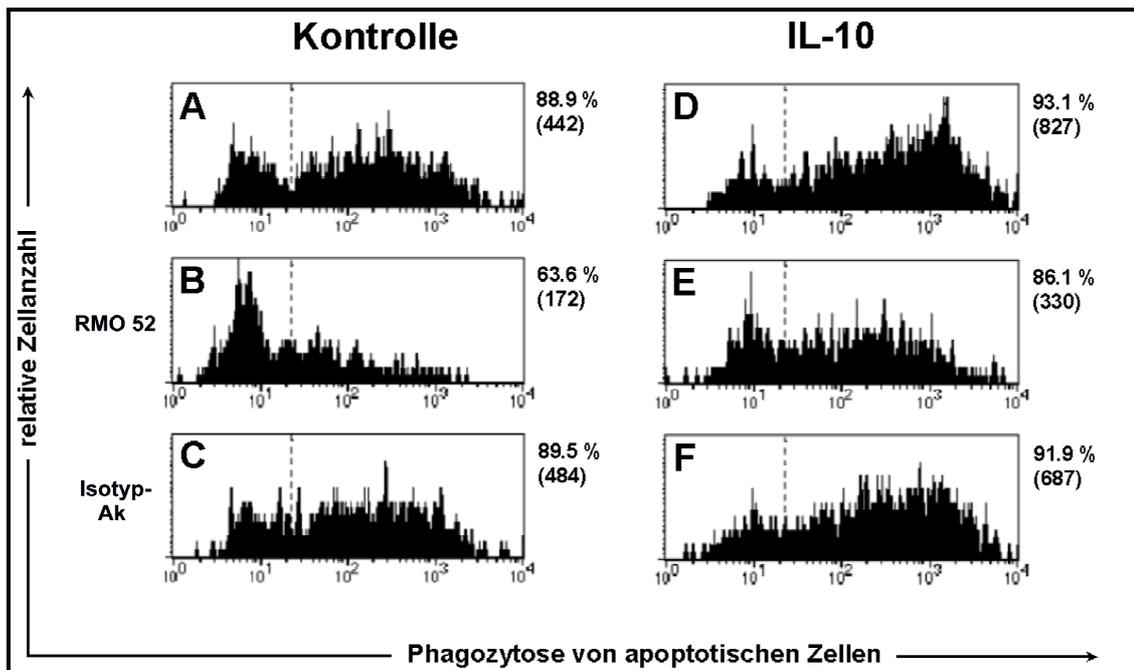


Abbildung 9: Einfluss von IL-10 auf die Phagozytose von apoptotischen Zellen.

Jurkatzellen wurden mit 40 Gy bestrahlt. Nach einer Inkubation von 18 Stunden wurden der Anteil der apoptotischen Zellen bestimmt (jeweils mind. 70%) und die Jurkatzellen mit dem Membranfarbstoff PKH 67-GL gefärbt.

Zeitgleich wurde Vollblut mit/ohne IL-10 (10 ng/ml) für 18 Stunden vorinkubiert. Die Kulturen wurden in drei Fraktionen aufgeteilt; 1) unbehandelte Kontrolle, 2) mit blockierendem anti-CD14-Antikörper RMO52, 3) mit Isotypkontrollantikörper (jeweils 25 µg/ml). Nach einer 90-minütigen Inkubation der Vollblutsuspension mit den Jurkatzellen wurde die monozytäre Phagozytose der PKH 67-GL-markierten apoptotischen Jurkatzellen durchflusszytometrisch bestimmt.

In der linken Spalte (A, B, C) sind die Ergebnisse für die Kontrollkulturen und in der rechten Spalte (D, E, F) für die mit IL-10 vorbehandelten Kulturen dargestellt. Die Histogramme in der ersten Zeile zeigen die uneingeschränkte Phagozytose (A, D), in der zweiten Zeile mit CD14-Blockade (B, E) und in der dritten Zeile mit Zugabe von Isotypkontrollantikörper (C, F). Die Prozentzahlen an der rechten Seite der Histogramme zeigen den Anteil der Phagozytose-positiven Monozyten, die Zahl in Klammern stellt die mittlere Fluoreszenzintensität [MFI] der von den Monozyten aufgenommenen mit PKH 67-GL markierten apoptotischen Jurkatzellen dar. Die Position des Histogramm-Markers zur Bestimmung der Phagozytose-positiven Zellen wurde durch Kontrollinkubationen ohne Jurkat-Zell-Zugabe zur Abgrenzung der Eigenfluoreszenz der Monozyten festgelegt.

Die Abbildung zeigt die repräsentativen Ergebnisse eines von drei unabhängigen Versuchen.

- A Kontrollvorkultur / uneingeschränkte Phagozytose
- B Kontrollvorkultur / CD14-Blockade
- C Kontrollvorkultur / Isotypantikörperzugabe
- D IL-10-Vorkultur / uneingeschränkte Phagozytose
- E IL-10-Vorkultur / CD14-Blockade
- F IL-10-Vorkultur / Isotypantikörperzugabe