

Seite 1

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Interleukin-10 vermittelter Schutz vor Komplementlyse
in Monozyten und Makrophagen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nadine Koch

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. H.-D. Volk
 2. Prof. Dr. med. K. Asadullah
 3. Prof. Dr. rer. nat. G. Tiegs

Datum der Promotion: 19.11.2010

1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis.....	3
2 Abkürzungsverzeichnis	5
3 Einleitung	8
3.1 Anforderungen an das Immunsystem	8
3.2 Das Komplementsystem	9
3.2.1 Funktionen des Komplementsystems	9
3.2.2 Aktivierung des Komplementsystems	12
3.2.3 Regulationsproteine des Komplementsystems	14
3.3 Monozyten und Makrophagen.....	17
3.4 Interleukin-10 und seine Wirkung auf Monozyten/Makrophagen.....	19
3.5 Hämoxygenase-1	22
3.5.1 Funktionen der HO-1-Abbauprodukte.....	22
3.5.2 Die physiologische Rolle von HO-1	23
4 Zielsetzung.....	25
5 Material und Methoden.....	27
5.1 Materialien.....	27
5.1.1 Chemikalien.....	27
5.1.2 Puffer und Lösungen	28
5.1.3 Biochemikalien und Kits	28
5.1.4 Stimulanzen/Induktoren/Inhibitoren	28
5.1.5 Antikörper.....	29
5.1.6 Verbrauchsmaterialien.....	29
5.1.7 Geräte	29
5.2 Zellbiologische Methoden.....	30
5.2.1 Präparation von PBMCs aus frischem Vollblut.....	30
5.2.2 Zellzahlbestimmung	31
5.2.3 Gewinnung von Monozyten mittels magnetischer Zelltrennung (MACS).....	31
5.2.4 Kultivierung und Stimulation von Monozyten/Makrophagen	32
5.2.5 Generieren von Makrophagen	32
5.2.6 Detektion der Zelllyse mittels Calcein.....	33
5.2.8 Komplementlyse-Test.....	34
5.2.8 Durchflusszytometrie (FACS).....	36
5.3 Protein-biochemische Methoden	39
5.3.1 Western Blot Analyse.....	39
5.4 Molekularbiologische Methoden	42
5.4.1 Nukleofektion mit siRNA.....	42
5.5 Statistische Auswertungen	43
6 Ergebnisse.....	44
6.1 Regulation der Komplementlyse durch IL-10.....	44
6.1.1 IL-10 schützt Monozyten vor Komplementlyse	44
6.1.2 Interleukin-10 schützt auch Makrophagen, nicht aber Lymphozyten vor Komplementlyse	47
6.2 Welches ist der zugrunde liegende Mechanismus für den Schutz vor Komplementlyse durch IL-10?	49
6.2.1 IL-10 steigert die CD59-Expression von Monozyten	49
6.2.2 CD59 vermittelt nicht den IL-10 induzierten Schutz vor Komplementlyse	50
6.2.3 Endozytose-Inhibitoren können den IL-10-Effekt nicht aufheben	51
6.2.4 HO-1 Induktion durch IL-10 in Monozyten	52
6.2.5 SnPP, ein HO-1-Inhibitor, scheint den IL-10-Effekt aufzuheben.....	53
6.2.6 HO-1-Suppression durch siRNA kann den IL-10-Effekt nicht aufheben.....	55
6.2.7 Regulation von HO-1 durch IL-10 und IL-6	57
7 Diskussion.....	61
7.1 Regulation des Komplementschutzes durch Zytokine.....	61
7.2 Regulation von CD59 durch IL-10	64
7.3 Diskussion der Ergebnisse zur Hämoxygenase-1	65

7.4 Weitere Mechanismen des Komplementlyseschutzes	69
7.4.1 Endo- und Exozytose.....	69
7.4.2 Lösliche Regulatoren der Komplementlyse.....	70
7.4.3 Apoptose.....	70
7.4.4 Andere, mögliche Ursachen für den IL-10 Effekt	71
7.4.5 Resümee	72
7.5 Pathophysiologische und medizinische Relevanz des IL-10-Schutzes vor Komplementlyse ...	73
8 Zusammenfassung.....	77
9 Literaturverzeichnis.....	78
10 Danksagung.....	88
11 Lebenslauf	89
12 Publikationsliste	90
13 Eidesstattliche Erklärung.....	91

2 Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität
aHUS	atypisches Hämolytisches Urämisches Syndrom
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
aqua dest.	aqua destillata
BSA	Bovines Serum Albumin
C1-C9	Komplementfaktoren 1-9
C4BP	C4 binding protein
Calcein-AM	Calcein-bis-Acetoxy-methylester
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	cluster of differentiation
CFHR1	Komplement Faktor H Related Protein
cGMP	zytosolische Guanylat-Zyklase
CO	Kohlenmonoxid
CR	Komplementrezeptor
CRIT	C2-receptor-inhibitor-trispanning
CRP	C-reaktives Protein
CRPs	Komplement-Regulations-Proteine
CSF-1	colony stimulating factor 1 oder M-CSF
CXCL8	CXC-Motiv-Chemokin 8
DAF	decay-accelerating factor
DC	Dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Autoimmun-Encephalomyelitis
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extrazelluläre Signale aktivierende Kinase
FACS	fluorescence activated cell sorting
Fc γ R	Fc- γ -Rezeptor
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward scatter
GPI	Glykosylphosphatidylinositol-Rest
HER2	human epidermal growth factor receptor type 2
HO-1	Hämoxygenase-1
HRP	horseradish peroxidase
Hsp	Hitzeschockprotein
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IL-R	Interleukin-Rezeptor
IL-1RA	IL-1-Rezeptorantagonist

Abkürzungsverzeichnis

INH	Inhibitor
iNOS	induzierbare Stickoxid-Synthase
I/R	Ischämie/Reperfusion
JAK	Janus Kinase
kD	Kilo Dalton
LBP	LPS-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
MAC	membrane-attack complex
MACS	Magnetic Cell Sorting
MAPK	mitogen-activated protein kinase kinase
MASP	MBL-assoziierte Serin-Protease
MBL	Mannose bindendes Protein
MCP	membrane cofactor protein
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
mCRP	membranständige Komplement-Regulations-Proteine
M-CSF	Makrophagen Koloniestimulierender Faktor
MHC-I/MHC-II	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I oder Klasse II
mRNA	messenger RNA
MVB	Multivesikuläre Bodies
NK-Zellen	Natürliche-Killer-Zellen
NO	Stickstoffmonoxid
P	Phosphat
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate-buffered saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PI	Propidium Iodid
PKC	Proteinkinase C
PMT	Photomultiplier
PNH	Paroxysmale Nächtliche Hämoglobinurie
PRR	pattern recognition receptors
RA	Rheumatoide Arthritis
RISC	RNA-induzierter Silencing-Komplex
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklasen
ROS	reactive oxygene species
rpm	Umdrehungen pro Minute
SAP	Serum Amyloid Protein
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
shRNA	small hairpin Ribonukleinsäure
siRNA	small interfering Ribonukleinsäure
SCID	severe combined immunodeficiency
SnPP	Zinn-Proto-Porphyrin
SOCS-1	suppressor of cytokine signalling 1
SSC	siteward scatter

Abkürzungsverzeichnis

STAT	signal transducers and activators of transcription
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TBST	Tris buffed saline with Tween [®] 20
TEMED	N,N,N,N-Tetramethyldiamin
TGF- β	transforming growth factor- β
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TYK	Tyrosinkinase
U	Units
UV	ultraviolett

3 Einleitung

3.1 Anforderungen an das Immunsystem

Das Immunsystem wird in die angeborene und erworbene Immunantwort eingeteilt, die jedoch vielfältig miteinander interagieren. Während die angeborene Immunantwort über Strukturen zur Bekämpfung bzw. Prävention von Krankheiten verfügt, die teilweise über Generationen erhalten sind, zeichnet sich die erworbene Immunantwort durch die Fähigkeit aus, flexibel, hoch-spezifisch und an Umwelteinflüsse angepasst unter Erwerb eines immunologischen Gedächtnisses zu reagieren. Ein Beispiel der angeborenen Immunantwort ist das Komplementsystem. Dieses löst charakteristischerweise eine schnelle, jedoch relativ unspezifische Reaktion aus, die genau deshalb einer guten Kontrolle und Regulation bedarf. Sonst könnte es durch Fehlaktivierungen aufgrund der relativ hohen Unspezifität der Komplementaktivierung zu erheblichen Schädigungen eigenen Gewebes kommen. Analog muss auch die später einsetzende, erworbene Immunantwort reguliert werden, da sie theoretisch auf jedes erdenkliche Antigen reagieren kann. Entscheidend ist also, dass Schädlinge und bedrohliche Zellen oder Substanzen als solche erkannt werden und harmlose Mikroorganismen bzw. Partikel und eigene, gesunde Zellen toleriert werden.

Zur Prävention von Krankheiten ist weiterhin die Erhaltung der Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Signalen wichtig. Eine Entzündung wird initiiert, um Erreger oder sonstige schädliche Materialien, darunter auch eigene apoptotische, nekrotische oder Tumorzellen, oder durch Stressoren wie UV-Licht oder Hitze geschädigte Zellen zu beseitigen. Im Gegenzug verursacht diese Entzündungsreaktion aber auch Schädigungen eigener, gesunder Zellen und Strukturen. So führt eine maximale Bekämpfung von Schädlingen nicht zwangsläufig zu einer minimalen Ausprägung der Erkrankung, die häufig durch das Ausmaß der Entzündung bestimmt wird. Die Beendigung einer Entzündungsreaktion erfolgt u. a. durch Ausschüttung anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 oder TGF- β sowie durch Abräumen des Entzündungsherdens von phagozytierenden Zellen wie Makrophagen.

In der Pathogenese vieler Erkrankungen, wie z. B. Allergien, Autoimmunkrankheiten oder Tumoren, spielen Fehlregulationen dieser beiden Gleichgewichte eine Rolle, so dass die Kenntnis der Regulatoren von großem Interesse ist. Mit dieser Arbeit habe ich einen kleinen Teil

des komplexen Zusammenspiels zwischen Zellen, Zytokinen und Umgebung am Beispiel des Komplementsystems untersucht.

3.2 Das Komplementsystem

3.2.1 Funktionen des Komplementsystems

Eine wesentliche Komponente der angeborenen Immunantwort, die auch erheblich die erworbene Immunantwort beeinflusst bzw. mit ihr interagiert, ist das Komplementsystem, welches in hohem Maße zur Eliminierung von Pathogenen und zur Reparatur von geschädigtem Gewebe beiträgt. Die Bedeutung des Komplementsystems zeigt sich in verschiedenen Krankheitsbildern. Zum einen kann eine überschießende Komplementaktivierung zu entzündungsvermittelten Gewebsschäden führen, wie beispielsweise bei Ischämie/Reperfusionsschäden, zum anderen führen angeborene oder erworbene Defizite von Komponenten des Komplementsystems zu einem deutlich erhöhten Infektionsrisiko. Beispielsweise verursachen Defizite in der Aktivierung des Alternativen Weges ein gehäuftes Auftreten von Neisseriainfektionen und führen zu einem fulminanteren Verlauf [1]. Ferner steigt auch das Risiko für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen bei Komplementdefiziten. In der Tat ist das homozygote Fehlen von Komponenten des Klassischen Komplementaktivierungsweges eines der stärksten identifizierten Risikofaktoren für die Entwicklung eines Systemischen Lupus Erythematosus [2].

Das Komplementsystem besteht aus Proteinen (C1-C9 genannt) die nach ihrer jeweiligen Aktivierung kaskadenartig weitere Proteine durch Proteolyse spalten und gleichzeitig zur Amplifikation der Kaskade beitragen. Die terminalen Proteine dieser Kette haben das Ziel, sich zu sogenannten MACs (membrane-attack complexes) auf der Zelloberfläche der Zielzellen zu formatieren. Die MACs bilden Poren, die nicht-selektiven Ionenkanälen entsprechen und zur Zerstörung der Zellmembran und folglich auch zur Lyse der betroffenen Zellen führen. Unter den über 30 verschiedenen Serum- und Membran-Proteinen des Komplementsystems, gibt es außerdem noch zahlreiche die Komplementlyse regulierende Proteine.

Einen zentralen Punkt der Lyse durch das Komplementsystem bildet die C3-Konvertase, die C3 in C3a und C3b spaltet. C3b ordnet sich wiederum mit den vorherigen Spaltprodukten C4b2a und C3bBb (siehe Kapitel 3.2.2) zur C5-Konvertase an und spaltet analog C5 in C5a und C5b. Die terminalen Komponenten C5b, C6, C7 und C8 bilden einen Anker in der Zellmembran,

an dem sich ringförmig mehrere C9-Moleküle anordnen und dadurch den MAC formen [3]. Es können jedoch noch zwei weitere, bedeutende Funktionskomplexe dem Komplementsystem zugeordnet werden, die in der Abbildung 3.1 aufgeführt sind.

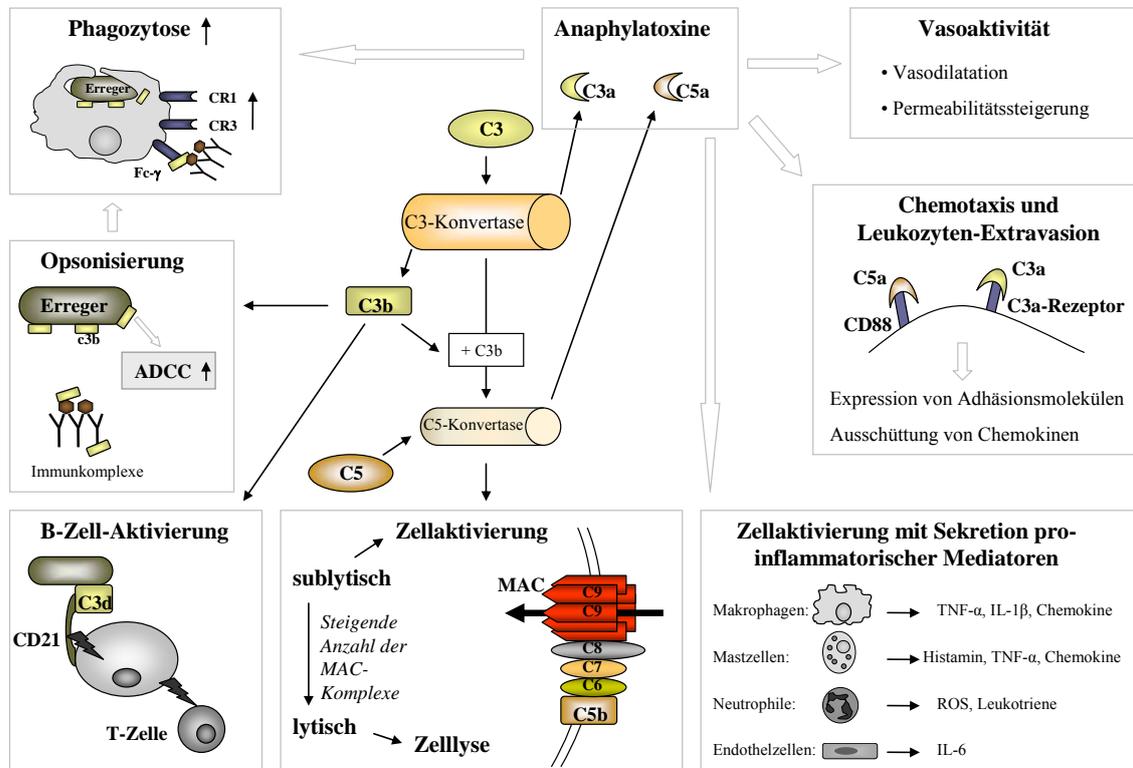


Abb. 3.1 Funktionen des Komplementsystems

1. Steigerung der Phagozytose

Ein wesentlicher Schritt zur Vorbereitung und Auslösung der Phagozytose ist die Opsonisierung. Dabei werden Oberflächen von Erregern oder potentiell gefährlichen Partikeln, wie z. B. Immunkomplexen, mit Molekülen markiert, sodass die zu beseitigenden Substrate für Phagozyten erkenntlich werden. Die Opsonisierung kann mit Antikörpern, mit bestimmten Akute-Phase-Proteinen, wie beispielsweise CRP (C-reaktives Protein), Serum Amyloid P oder Mannose bindendes Lektin (MBL) und auch mit Komplementkomponenten erfolgen [4]. Neben C4b sind hauptsächlich C3b oder seine Spaltprodukte iC3b, C3c und C3dg für die Opsonisierung durch Komplement verantwortlich. Durch Bindung an Komplementrezeptoren (CR1-CR4, CR1g) stimulieren sie phagozytierende Zellen und ermöglichen somit Säuberung und Aufräumen der Entzündungsstelle. Die Opsonisierung von Immunkomplexen erhält die Löslichkeit und Größe der Komplexe [5], so dass eine Verhinderung der Phagozytose aufgrund zu großer Komplexe und nachfolgende Ablagerungen im Gewebe vermieden werden.

Weitere Komplementkomponenten wie C3a, C4a und C5a stimulieren die Phagozytose direkt über entsprechende Rezeptoren oder indirekt durch Hochregulation von CR1, CR3 und Fc γ -Rezeptoren (Fc γ R), welche die Antikörperinduzierte Phagozytose vermitteln (siehe Kapitel 3.3.1) [6].

2. Regulierung von entzündlichen Prozessen

Die Spaltprodukte C3a, C4a und C5a sind Anaphylatoxine, die entscheidend zur Regulation des Entzündungsprozesses beitragen und die Aktivierung der angeborenen Immunantwort durch Rekrutierung und Stimulation von B- und T-Zellen fördern. C5a und C3a steigern direkt die Gefäßpermeabilität und verursachen eine Vasodilatation. Im Zusammenspiel mit ihrer starken chemotaktischen Wirkung fördern sie somit die Extravasation von Immunzellen und Entzündungsflüssigkeit (Exsudat), die u. a. Antikörper und weitere Komplementkomponenten enthält, zum Ort der Komplementaktivierung. Dies geschieht, nach Bindung an ihren jeweiligen Rezeptor, C5a-Rezeptor (CD88) bzw. C3a-Rezeptor, durch Induktion der Expression von Adhäsionsmolekülen sowohl auf Endothelzellen, als auch auf vielen peripheren mononukleären Blut-Zellen (PBMCs), wie Monozyten/Makrophagen, Neutrophilen oder Mastzellen [6]. Außerdem tragen Chemokine, die durch Anaphylatoxine von Makrophagen und Mastzellen ausgeschüttet werden, wie beispielsweise CXCL8 (IL-8) zur Rekrutierung von Leukozyten bei [7].

Ferner haben Anaphylatoxine stimulierende Wirkungen auf viele Immunzellen. So wird durch C5a in Endothelzellen die IL-6-Gen-Expression hochreguliert [8] und in Neutrophilen die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) und von Chemokinen forciert [6]. Mastzellen schütten vermehrt TNF- α und Histamin aus, wobei Histamin die Vasodilatation und Gefäßpermeabilität weiter verstärkt [9]. Aber auch Makrophagen werden durch C5a und C3a zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α und IL-1- β , und zur Phagozytose angeregt [10, 11]. Interessanterweise kann C3a in Kombination mit LPS auch anti-inflammatorische Eigenschaften aufweisen, indem es die TNF- α -, IL-6- und IL-1 β -Sekretion von PBMCs hemmt und somit stark protektiv vor einem Endotoxin-Schock wirkt [12].

Neben den Anaphylatoxinen wirken sogar die gebildeten MACs selbst in sublytischer Dosis entzündungsregulierend. Kilgore *et al.* zeigten, dass humane Endothelzellen nach sublytischer Komplementaktivierung an ihrer Zelloberfläche vermehrt IL-8 und MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) sezernierten und somit die Migration von Neutrophilen und Monozyten steigerten [13].

Die Spaltprodukte von auf Zellen abgelagerten C3b-Molekülen (iC3b, C3d) erhöhen durch Interaktion mit dem Komplement-Rezeptor 3 (CR3) auf NK-Zellen die Antikörper-abhängige, zelluläre Zytotoxizität (ADCC) [14]. Des Weiteren ist C3d als Ligand für den Rezeptor CD21 mit an der Aktivierung und Proliferation von B-Zellen beteiligt [15].

Die Proteine des Komplementsystems werden größtenteils in der Leber produziert und in das Blut abgegeben, wo sie in inaktiver Form zirkulieren. Sie sind somit ubiquitär vorhanden und können teilweise auch lokal von Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen, APCs oder T-Zellen sezerniert werden [16-18]. Während einer Entzündung wird zudem die systemische Produktion von Komplementfaktoren oder Komplement-induzierenden Proteinen gesteigert, indem proinflammatorische Zytokine (z. B. IL-6) die Ausschüttung von Akute-Phase-Proteinen, zu denen auch viele Komplementfaktoren gehören, in der Leber induzieren.

3.2.2 Aktivierung des Komplementsystems

Das Komplementsystem kann durch verschiedene, unabhängige Mechanismen initiiert werden. Das kann sowohl exogen durch Erreger, als auch endogen durch Ischämie oder Autoimmunprozesse geschehen. Primär werden drei verschiedene Aktivierungswege unterschieden: der Klassische Weg, der Alternative Weg und der Mannose-Binding-Lektin-Weg (MBL-Weg). Da auch eine Aktivierung durch endogene Substanzen, wie z. B. Thrombin oder Kallikrein unabhängig dieser drei Wege möglich ist, wurden diese Aktivierungsmöglichkeiten kürzlich unter der Kategorie Extrinsischer-Proteasen-Weg zusammengefasst [6, 19, 20].

Abbildung 3.2 stellt die möglichen Aktivierungswege dar, die unter Bildung einer C3- oder C5-Konvertase alle in den terminalen Komplementweg mit Entstehung von MACs münden. Ich gehe ausführlicher auf den Klassischen und den Alternativen Weg ein, da in meinen Experimenten diese beiden angewandt wurden.

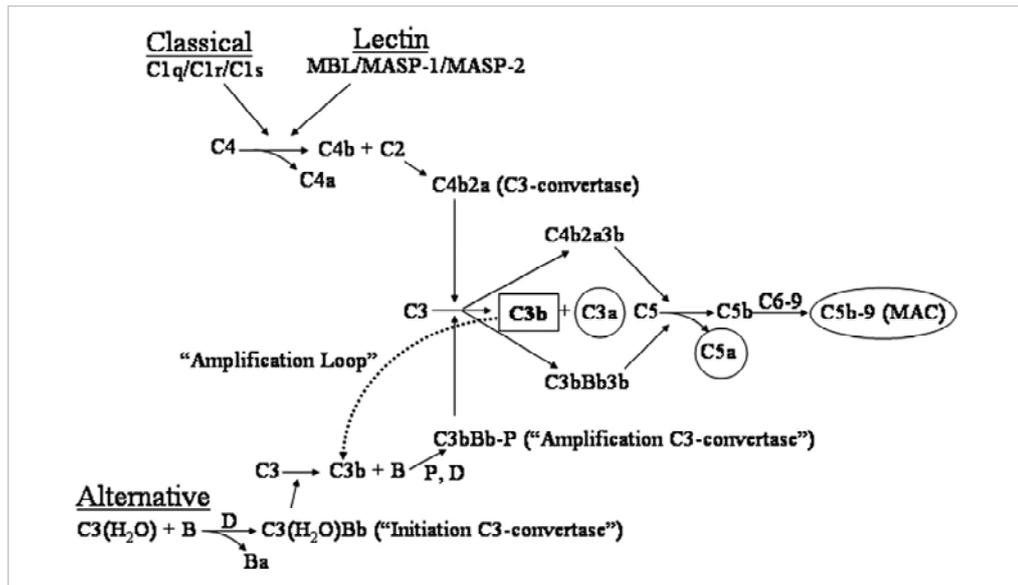


Abb. 3.2 Aktivierung des Komplementsystems [21]

Der Klassische Weg

Wichtigster Bestandteil dieses Weges ist der C1-Komplex, der aus C1q, C1r und C1s besteht. C1q hat sechs ringförmig angeordnete globuläre Domänen, die jeweils an das Fc-Ende von Antikörpern oder direkt an Oberflächenstrukturen von bestimmten Pathogenen oder mit Hilfe von CRP oder Serum Amyloid Protein (SAP) an Bakterien binden können. Die Antikörper, die natürlich vorkommen oder infolge der erworbenen Immunantwort von B-Zellen produziert werden, können dabei sowohl an Erreger, als auch an eigene, z. B. apoptotische, Zellen gebunden sein oder als Antikörperkomplexe vorliegen. Im Menschen besitzen besonders gebundenes IgM und IgG3 eine hohe Komplement-aktivierende Potenz. Aber auch IgG1 und in geringem Maße IgG2 und IgA können die Komplementkaskade auslösen. Kommt es zur Besetzung von mehr als zwei der sechs Domänen des C1q-Proteins, erfolgt eine Aktivierung des C1-Komplexes, wobei letztendlich nach mehreren Proteolysen an der Erreger-Oberfläche gebundenes C4b2a entsteht, welches die C3-Konvertase des Klassischen Weges ist [22].

Ähnlich dem Klassischen Weg, funktioniert der MBL-Weg. Kollektine, wie Mannose-Binding-Lektin (MBL) oder Ficolline können, analog dem C1q, an Polysaccharide oder N-Acetylglukosamine binden, die auf Pathogenoberflächen und auch auf apoptotischen Zellen vorkommen. Diese sogenannten PAMPs (pathogen associated molecular patterns) müssen für eine Bindung durch MBL und Komplementaktivierung allerdings auch charakteristisch angeordnet sein, was bei Erregern häufig der Fall ist. Mit Hilfe der Proteasen MASP-1 und MASP-2 (MBL-associated serine protease) wird dann C4b2a generiert [6].

Der Alternative Weg

Ein entscheidender Unterschied zum Klassischen und MBL Weg ist, dass die Aktivierung des Alternativen Weges fortwährend spontan geschieht, und dass er die anderen Wege enorm verstärken kann. Circa 1 % aller C3-Moleküle hydrolysieren spontan pro Stunde ($C3(H_2O)$) und erlauben über Konformationsänderungen die Bindung von Faktor B, einer weiteren Komplementkomponente, an $C3(H_2O)$. Durch Faktor D kann das $C3(H_2O)B$ -Molekül in Ba und $C3(H_2O)Bb$ gespalten werden, wobei letzteres eine lösliche, nicht Membran gebundene C3-Konvertase ist, die mit hohen Umsatzraten C3 in $C3a$ und $C3b$ spalten kann. Ein Großteil der $C3b$ -Moleküle wird durch Hydrolyse inaktiviert; die anderen binden an Erreger-Oberflächen und können mit Faktor B und Faktor D den Enzymkomplex $C3bBb$ bilden. $C3bBb$ wird durch Properdin (Faktor P) stabilisiert und stellt die Membran-gebundene C3-Konvertase des Alternativen Weges dar, die wiederum viele weitere $C3b$ -Moleküle durch Spaltung von C3 erzeugen kann. Diese positive Rückkopplung wird auch „amplification loop“ genannt und stellt einen potenten Verstärkermechanismus dar. Natürlich kann auch Membran gebundenes $C3b$, welches im Rahmen anderer Aktivierungsmöglichkeiten gebildet wurde, zusammen mit den Faktoren B und D neue C3-Konvertasen bilden, so dass der Alternative Weg auch zur Verstärkung der anderen Wege führt [21].

3.2.3 Regulationsproteine des Komplementsystems

Da das Komplementsystem den Entzündungsprozess forciert und somit auch zur eigenen Gewebsschädigung beiträgt, muss es äußerst genau reguliert werden. Ferner erfolgt die Aktivierung sehr schnell und unspezifisch, und sogar regelmäßig spontan durch den Alternativen Weg, der zusätzlich ein hohes Amplifikationspotenzial besitzt. Beispielsweise binden $C3b$ und $C4b$ kovalent an Membran-assoziierte Hydroxyl- oder Aminogruppen, die jedoch sowohl auf Erregern als auch auf eigenen Zellen vorkommen [22]. Somit kann es leicht zur Ausbildung von MACs auf eigenen, gesunden Zellen kommen, so dass eine unmittelbare Gefahr für Wirtszellen besteht, selbst vom Komplementsystem attackiert und zerstört zu werden. Aus diesem Grund sind eine strenge Regulation der Komplementlyse und der individuelle Schutz vor Komplementlyse von Seiten der Wirtszellen notwendig. Dabei wird besonders der Alternative Weg kontrolliert, um eine inadäquate und unkontrollierte Komplementaktivierung zu verhindern. Kommt es durch Mutationen oder Autoantikörper zu Alterationen der Kontrolle des Alternativen

Weges, so können sich Krankheiten manifestieren, wie beispielsweise das atypische Hämolytische Urämische Syndrom (aHUS). Auch bei der Rheumatoiden Arthritis (RA), der Lupus-Nephritis und beim intestinalen oder renalen Ischämie/Reperfusionssyndrom (I/R) wurde im Mausmodell gezeigt, dass mit Hemmung des Alternativen Weges sich die Manifestationen stark reduzierten bzw. gar nicht auftraten. Interessanterweise war dagegen bei der RA und beim renalen Ischämie/Reperfusionssyndrom nach Hemmung des Klassischen Weges keine Krankheitsverbesserung nachweisbar [21].

Ein entscheidender Schritt in der Hemmung der Komplementlyse von Wirtszellen ist die Spaltung von Membran-gebundenem C3b in inaktives iC3b, welches weiter in C3dg gespalten wird sowie die Entschärfung von Membran-gebundenem C4b durch Spaltung in C4c und C4d. Für diesen Vorgang ist das Plasmaprotein Faktor I verantwortlich, welches jedoch auf die Hilfe von Co-Faktoren angewiesen ist. Zu den Co-Faktoren gehören sowohl CD35 (CR1: Komplement Rezeptor 1), CD55 (DAF: decay-accelerating factor) und Faktor H, die alle den Abbau der C3-Konvertase C3bBb fördern, als auch CD46 (MCP: membrane cofactor protein) und C4BP (C4b binding protein), die zusätzlich auch C4b inaktivieren [23, 24]. Die Relevanz von Faktor I zeigt sich bei Personen mit genetisch bedingtem Faktor-I-Defizit. Sie leiden unter wiederholten bakteriellen Infektionen, da fortwährend Komplementfaktoren durch fehlende Hemmung der Spontanaktivierung verbraucht werden und somit für eine gezielte Erregerabwehr nicht mehr zur Verfügung stehen [25]. Eine gezielte Komplementaktivierung ist auch dadurch gegeben, dass CR1, DAF und MCP in der Membran von humanen Zellen verankerte Proteine sind, die jedoch nicht von Erregern exprimiert werden. Faktor H ist ein Plasmaprotein, welches ungebundenes C3b sofort bindet und inaktiviert. Spezifisch wirkt Faktor H gegenüber gebundenem C3b, da er eine erhöhte Affinität zu Polyanionen wie beispielsweise N-Acetylneuraminsäureresten oder Glukosaminoglykanen besitzt, welche Proteine humaner Zellmembranen sind [26]. Bei bestimmten Mutationen im Faktor H Gen konnten signifikant erhöhte Assoziationen mit renalen und okulären Krankheitsbildern festgestellt werden. Dazu gehören das atypische Hämolytisch-Urämische Syndrom (HUS), die altersassoziierte Makuladegeneration und die Membran Proliferative Glomerulonephritis Typ II [27]. Beim atypischen HUS können neben der Mutation des Faktors H auch Mutationen des Faktors I, von MCP, von C3, des Faktors B oder von CFHR-1/CFHR-3 vorliegen; oder es kann durch Bildung von Autoantikörpern gegen Faktor H dieser inaktiviert sein [28].

Ein erst kürzlich entdecktes Protein namens CRIT (C2-receptor-inhibitor-trispanning) reguliert den Alternativen Weg über Bindung von Faktor B und den Klassischen Weg über Bindung von C2. In beiden Fällen kommt es dadurch zur Verhinderung der Entstehung der

jeweiligen C3-Konvertase [29, 30]. Der Klassische Weg wird ferner durch den C1-Inhibitor (C1-INH oder Serpin) reguliert, der die Dissoziation von C1r und C1s von C1q auslöst und somit den C1-Komplex inaktiviert. Außerdem wirkt er regulierend auf den Hageman-Faktor (Faktor XII) des Gerinnungssystems und auf Kallikrein, welches ebenfalls das Komplementsystem aktivieren kann [31]. Sein Einfluss wird durch das hereditäre Angioneurotische Ödem deutlich, eine Erkrankung, die durch unkontrollierte C2a-Entstehung aufgrund von C1-INH-Mangel zu rekurrenten, spontanen Ödemen führt. Bei Einbeziehung der Trachea kann die Erkrankung durch okkludierende Schwellungen auch tödlich verlaufen. Interessanterweise sistieren die Symptome unter Gabe von C1-INH [32]. Pentraxin 3, ein Akute-Phase-Protein, besitzt duale Eigenschaften. Es fungiert einerseits als Pattern-Recognition-Receptor und kann nach Erkennung von Antigenen die Komplementlyse induzieren. Andererseits kann es besonders in gelöster Form C1q-Moleküle binden, und damit die Bindung von C1q an Immunglobuline verhindern und so den Klassischen Weg hemmen [33].

Auch der terminale Teil der Komplementlyse wird reguliert. Die wichtigste Rolle spielt hier das Protein CD59, welches auch Protektin genannt wird. Protektin ist, genauso wie CD55, über einen Glykosylphosphatidylinositol-Rest (GPI) in der Zellmembran von Wirtszellen verankert. Es hemmt sowohl die Bindung von C9-Molekülen an den C5b-8-Anker, als auch die Passage von Ionen oder anderen, kleinen Molekülen durch MACs in Form von C5b-8- oder C5b-9-Komplexen [34]. Bei Patienten mit Paroxysmaler Nächtlicher Hämoglobinurie (PNH) besteht ein hämatopoetischer Klon mit GPI-Anker-Defekt, der vor allem zur klinisch relevanten, intravasalen Lyse von Erythrozyten führt [35]. Interessanterweise haben Untersuchungen von Patienten mit hereditärem, komplettem CD59-Defizit und mit komplettem CD55-Defizit gezeigt, dass für die Hämolyse besonders der Ausfall der Protektin-Funktion, nicht aber der der DAF-Funktion, verantwortlich ist [36]. Ein weiterer Inhibitor der MAC-Bildung ist Clusterin, welches durch Bindung des C5b-C7-Komplexes die Lyse der Zellmembran verhindert [37]. Und auch CFHR1 (Komplement Faktor H Related Protein 1) hemmt die Komplementlyse zusätzlich durch Hemmung der C5-Konvertase und Interferenz mit der Anlagerung von C5b an die Zellmembran [38].

Die Komplement-Regulationsproteine (CRP) liegen entweder in membrangebundener oder in löslicher Form vor. Durch Alternatives Splicing oder enzymatische Spaltung von der Zellmembran werden die sonst membrangebundenen Faktoren CD35, CD46, CD55 und CD59 als lösliche Form gebildet [39]. Faktor H, Faktor I, C4BP, CFHR-1, Clusterin, C1-Inhibitor und Pentraxin 3 liegen in gelöster Form vor.

Beachtlich ist, dass die Komplementlyse auch durch die Bildung von MACs (membrane-attack complexes) selbst reguliert wird. Binden nur einige MACs in sublytischer Konzentration auf der Zelloberfläche einer Zelle, so wird die Komplementresistenz dieser Zelle gesteigert [40]. Ferner wird eine überschießende Komplementaktivierung dadurch verhindert, dass aktivierte Faktoren schnell durch Hydrolyse inaktiviert werden, wenn keine kovalente Bindung an andere Faktoren oder Membranen erfolgt.

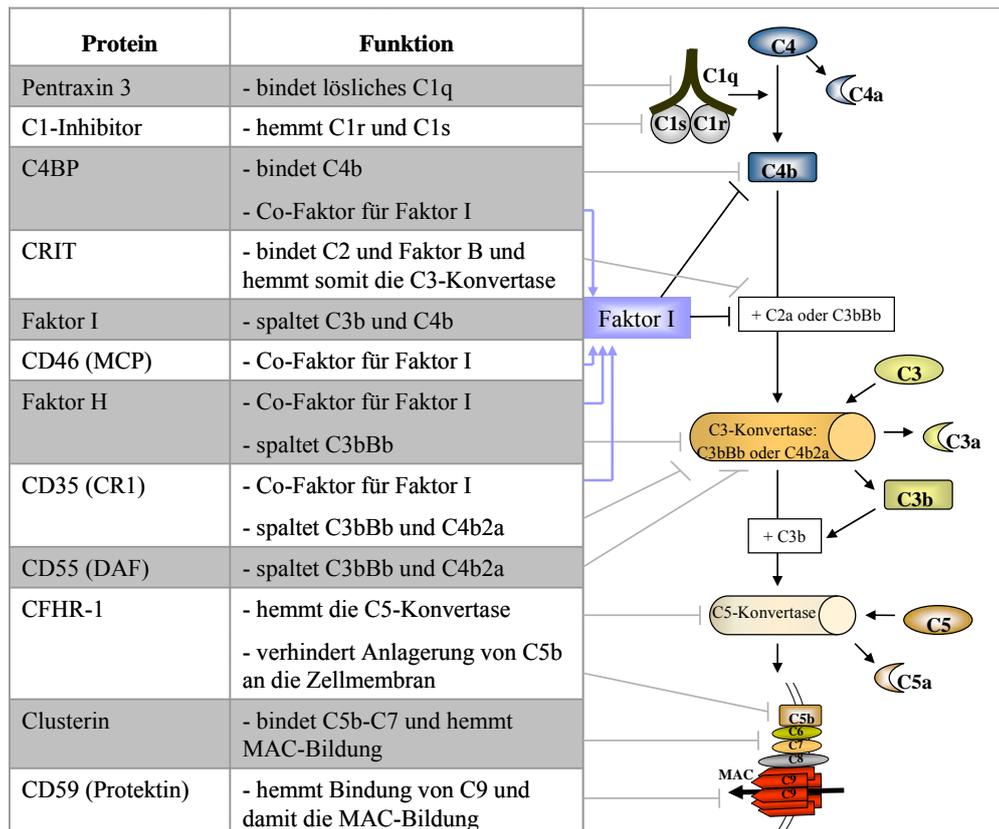


Abb. 3.3 Auflistung und Funktionsweise der Regulationsproteine des Komplementsystems

3.3 Monozyten und Makrophagen

Im Knochenmark werden Monozyten aus myeloischen Vorläuferzellen gebildet, gelangen ins Blut und zirkulieren einige Tage, wobei sie ca. 5-10 % aller PBMCs ausmachen. Ein Charakteristikum von Monozyten ist CD14, ein Phagozytose-Rezeptor und ein Co-Rezeptor für an LPS-binding-Protein (LBP) gebundenes LPS (Lipopolysaccharid), welches ein Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien ist. Monozyten werden in verschiedene Subpopulationen eingeteilt. Es werden klassische $CD14^{++}CD16^{-}$ -Monozyten (90%) und nicht-klassische $CD14^{+}CD16^{+}$ -Monozyten unterschieden, deren Funktionen jedoch noch nicht

vollständig geklärt sind [41, 42]. Alle anderen Monozyten-Subpopulationen werden zunächst dem intermediären Subtyp zugeordnet. Weiterhin entdeckten Geissmann *et al.*, dass klassische Monozyten $CX3CR1^+$, $CCR2^+$, $CD62L^+$ exprimieren und nicht-klassische Monozyten $CX3CR1^{++}$, $CCR2^-$, $CD62L^-$ aufweisen, wobei die erste Population eher in entzündetes Gewebe einwandert, während die letztere normales Gewebe besiedelt [43]. Monozyten wandern also, angezogen durch Chemokine wie z. B. CCL2 welches an CCR2 bindet, aus dem Blut ins Gewebe (Extravasation) und differenzieren dort je nach Gewebsart und nach Vorhandensein unterschiedlicher stimulatorischer Faktoren in verschiedene Makrophagen-Subtypen oder in Dendritische Zellen.

Makrophagen differenzieren unter Stimulation mit LPS und $IFN-\gamma$ in Typ-1-Makrophagen, welche verstärkt pro-inflammatorische Zytokine wie $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-12$, $IL-15$ und $IL-18$ ausschütten. Sie weisen eine erhöhte Phagozytose-Aktivität und eine gesteigerte Antigenpräsentation auf und produzieren vermehrt bakterizide Metabolite. Durch Ausschüttung zahlreicher Chemokine rekrutieren sie Neutrophile Granulozyten und weitere Leukozyten zum Ort der Entzündung. Demgegenüber werden 2a-Makrophagen, die eher reparierende und die Proliferation stimulierende Funktionen, aber auch chemotaktische Funktionen, ausüben, durch die TH_2 -Zytokine $IL-4$ und $IL-13$ gebildet. 2b-Makrophagen differenzieren nach $IL-1\beta$ -, LPS oder Immunkomplex-Bindung und sind durch eine hohe $IL-10$ -Ausschüttung charakterisiert. In der 2c-Gruppe sind alle Makrophagentypen zusammengefasst, die, durch $IL-10$, $TGF-\beta$ oder Glukokortikoide stimuliert, zur verminderten Expression pro-inflammatorischer Zytokine, zur vermehrten Beseitigung von Zellabfall und Fremdmaterial und zur Förderung reparierender Prozesse führen. $IL-10$ verringert auch die Expression von MHC-II-Oberflächenmolekülen, sodass die Antigenpräsentation reduziert wird [44].

Neben der Antigenpräsentation und der Regulation der Immunantwort durch Zytokinausschüttung stellt die Phagozytose eine wichtige Funktion von Makrophagen dar. Dazu exprimieren sie auf ihrer Oberfläche verschiedenste Rezeptoren zur Erkennung von Erregern oder apoptotischen Zellen. Man kann in die Opsonin-vermittelte Phagozytose und in die direkte, nicht-Opsonin-vermittelte Phagozytose unterteilen, wobei die Opsonisierung durch das Komplementsystem eine wesentliche Rolle spielt. Opsonisierte Partikel können durch die Komplementrezeptoren CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), CR4 (CD11c/CD18) und CR1g (Rezeptor auf Gewebemakrophagen [45]) von Makrophagen erkannt und gebunden werden. Während durch die Bindung an CR1 allein noch keine Phagozytose ausgelöst wird, sondern

gleichzeitig eine Aktivierung der Makrophagen erfolgen muss (z. B. durch Bindung von C5a-Molekülen), werden an CR3 gebundene Partikel sofort von Makrophagen internalisiert [22]. Wurden Partikel mit Antikörpern opsonisiert, so erfolgt die Erkennung durch verschiedene Fc-Rezeptoren, die nicht nur unterschiedliche Affinitäten zu verschiedenen Immunglobulin-Klassen haben, sondern auch aktivierende, d. h. die Phagozytose steigernde, oder inhibierende Signale auf Makrophagen transduzieren können [46]. Zusätzlich können Monozyten/Makrophagen bestimmte konservierte Pathogenstrukturen (PAMPs) direkt, ohne Opsonisierung über verschiedene Rezeptoren, so genannte Pattern Recognition Receptors (PPRs), erkennen, binden und phagozytieren. Zu diesen Rezeptoren gehören u. a. Scavenger Rezeptoren, der Mannose-Rezeptor, CD163, CD14 und Dectin-1. Beispielsweise erkennt Dectin-1 mit Hilfe von TLR2 und TLR6 Zymosan, ein Bestandteil der Zellwand von Hefen [47].

Zusammenfassend gesehen, spielen Monozyten/Makrophagen sowohl bei pro-entzündlichen Immunprozessen inklusive Elimination von Antigenen oder Pathogenen als auch bei anti-entzündlichen Prozessen wie Wundheilung und Restitution von durch Entzündungsprozesse geschädigtem Gewebe eine entscheidende Rolle. Je nach Typ verändern Makrophagen das Gleichgewicht zwischen Antigenelimination und Schutz bzw. Reparatur des eigenen Gewebes in die eine oder die andere Richtung und tragen somit zur Gewebshomöostase bei. Dies geschieht durch Freisetzung unterschiedlich wirkender Zytokine, Chemokine, welche die Leukozyteninfiltration koordinieren oder reaktiver Metabolite (z. B. ROS) sowie durch Detektion von Fremdmaterial oder geschädigten Zellen mit anschließender Phagozytose und Antigenpräsentation.

3.4 Interleukin-10 und seine Wirkung auf Monozyten/Makrophagen

Interleukin-10 ist ein wichtiger, zu den anti-inflammatorischen Zytokinen zählender, Botenstoff des Immunsystems mit stark immunregulatorischen, pleiotropen Funktionen. Es wird hauptsächlich von T-Zellen und Monozyten/Makrophagen produziert; aber auch Dendritische Zellen (DCs), Epithelzellen, B-Zellen und Mastzellen können IL-10 sezernieren. Genauso zahlreich sind die verschiedenen Zelltypen, die über den IL-10-R1-Rezeptor verfügen und so durch IL-10-Bindung beeinflusst werden können. Dazu zählen, neben anderen, die meisten hämatopoetischen Zellen. So führt IL-10 z. B. zur Bildung regulatorischer T-Zellen und Dendritischer Zellen, steigert Proliferation und Überleben von B-Zellen und induziert in

B-Zellen einen Antikörper-Switch zur Produktion von IgG1 und IgG3 [48, 49]. Neben aktivierenden Effekten auf zytotoxische T-Zellen hemmt es die IFN- γ - und IL-12-Ausschüttung von Th1-Zellen und die Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren von Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten, wie beispielsweise TNF- α , IL-1 β , IL-8 und NO. Die IL-10-Freisetzung wird wiederum stark durch pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF- α ausgelöst, so dass IL-10 als Teil einer negativen Feedback-Schleife auf Entzündungsreize reagiert. Das konnte durch IL-10^{-/-}-Knock Out Mäuse *in vivo* bestätigt werden. Diese entwickeln chronisch entzündliche Darmerkrankungen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen und weisen eine stark reduzierte Toleranz gegenüber LPS auf [50, 51].

Monozyten und Makrophagen sind die prototypischen Zielzellen von IL-10 und zeigen nach Stimulation mit IL-10 stark anti-inflammatorische Effekte. Dies geschieht durch Hemmung der Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, TNF), Chemokine, PAF (Plättchen-Aktivierenden-Faktor), induzierbare Stickoxid-Synthasen (iNOS) [49]. und durch Sekretion von Antagonisten pro-inflammatorischer Zytokine wie dem IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1RA), oder den beiden löslichen TNF-Rezeptoren p55 und p75 [52]. Bedeutsam ist auch die Reduzierung der Antigenpräsentation durch IL-10, die durch eine abnehmende Expression von MHC-II-Molekülen auf der Makrophagenoberfläche zur verminderten Aktivierung von T-Zellen führt [53]. Gleichzeitig steigert IL-10 die Phagozytoseaktivität in Monozyten/Makrophagen durch Hochregulation von Phagozytose-Rezeptoren [54-56]. Eine Auswahl an Phagozytose-Rezeptoren, die durch IL-10 induziert werden zeigt Tab. 3.1.

Rezeptor	Liganden	Regulation durch IL-10
Opsonin-abhängige Bindung		
Fc γ -RI (CD64) (aktivierend)	IgG	Geninduktion, Oberflächenexpression [57, 58]
Fc γ -RIII (CD16) (aktivierend)	IgG	Geninduktion, Oberflächenexpression [58, 59]
Opsonin-unabhängige Bindung		
MARCO	Oxidiertes LDL, LPS, Bakterien,	Geninduktion [58]
CD14	LPS, Peptidoglykan, Mykobaktierum Lipoprotein, Apoptotische Zellen	Oberflächenexpression, gesteigerte Phagozytose [54]
CD163	Hb (gebunden an Haptoglobin)	Geninduktion, [58, 60]

Tabelle 3.1 Auswahl von Phagozytose-Rezeptoren auf Monozyten/Makrophagen, die durch IL-10 hochreguliert werden

Monozyten reifen folglich durch IL-10 zu einer entzündungslimitierenden Makrophagen-Population mit verminderter Antigenexpression und gesteigerter Phagozytoseaktivität heran, um Erreger und geschädigte Zellen zu eliminieren und die Entzündungsreaktion zu dämpfen.

Für die IL-10-Wirkung wird *de novo* Proteinsynthese benötigt, was mehrere Gruppen nachgewiesen haben [61]. Vereinfacht dargestellt bindet IL-10 an die R-I-Untereinheiten des IL-10-Rezeptorkomplexes und bewirkt dadurch mit Hilfe der R-II-Untereinheiten die Phosphorylierung der Rezeptor-assoziierten Kinasen JAK1 (Janus-Kinase 1) und TYK2 (Tyrosin-Kinase 2). JAK1 und TYK2 phosphorylieren STAT3 (signal transducer and activator of transcription-3), welches als Heterodimer in den Zellkern diffundiert und dort die Genexpression reguliert (siehe Abb. 3.4) [49]. Dementsprechend zeigen STAT3^{-/-}-Mäuse und IL-10^{-/-}-Mäuse den gleichen Phänotyp [62]. Auch IL-6 kann STAT3 aktivieren. Allerdings wird durch STAT3 auch das SOCS3-Gen (Suppressor of cytokine signalling-3) induziert, welches durch Bindung von SOCS3 an den IL-6-Rezeptorkomplex die IL-6-Signalübertragung wieder hemmt. Am IL-10-Rezeptor gibt es keine Bindungsstellen für SOCS3, weshalb durch IL-10 induziertes STAT3 trotz entsprechender SOCS3-Bildung persistiert. Interessanterweise zeigen SOCS3-negative Makrophagen nach IL-6-Stimulation gleiche anti-inflammatorische Effekte wie Wildtyp-Makrophagen nach IL-10-Stimulation [63, 64].

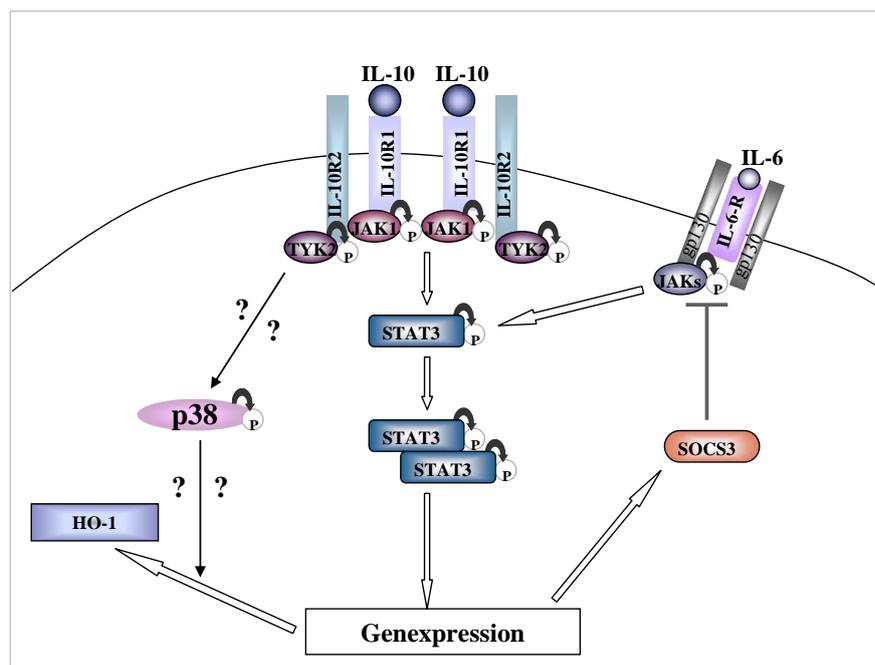


Abb. 3.4 Vereinfachte Darstellung der IL-10-Signaltransduktion in Monozyten/Makrophagen

Genexpressionsanalysen konnten zeigen, dass nicht nur die direkte Geninduktion, sondern auch die Hemmung der Expression LPS-, IFN- γ - und IL-4-induzierter Gene für die IL-10-Wirkung von Bedeutung scheint [65]. Ferner scheinen auch post-transkriptionale Mechanismen wie mRNA-Destabilisierung eine entscheidende Rolle zu spielen [61]. Zu den durch IL-10 induzierten Genen gehören die schon in Tab.3.1 erwähnten Gene zur Steigerung der

Phagozytoseaktivität, IL-10 selbst, STAT3, SOCS3, IL-1RA und Monozyten-anlockende Chemokine (MCP-1) sowie deren Rezeptor CCR5. Auch die Gene der Komplement-Regulation wie CR1/CD35, DAF/CD55 und Protektin/CD59 werden vermehrt exprimiert. Dagegen wird CD46 erstaunlicherweise leicht herunter reguliert [66]. Weiterhin wird durch IL-10 die Expression des Hitzeschockproteins Hämoxxygenase-1 (HO-1) induziert (siehe auch Kapitel 3.5), wodurch zellprotektive und anti-inflammatorische Effekte ausgeübt werden sollen. So soll IL-10 über Aktivierung der Mitogen aktivierten Protein-Kinase p38 (MAPK) die Transkription von HO-1 steigern [67]. Dem entgegengesetzt, zeigen die Ergebnisse von Kontoyiannis *et al.* nach Stimulation mit LPS eher eine Hemmung der Phosphorylierung von p38 durch IL-10 [68].

3.5 Hämoxxygenase-1

Hämoxxygenase-1 (HO-1) zählt zu den Hitzeschockproteinen, deshalb auch Hsp 32 genannt, und ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym im Abbau von Hämoglobin. Es katalysiert mit Hilfe von NADPH und Sauerstoff den Abbau von Häm zu Biliverdin unter Freisetzung des zweiwertigen Eisenions und Kohlenmonoxids. Abgesehen von diesen metabolischen Funktionen im Hämabbau und Eisen-Recycling, weisen HO-1 bzw. seine Abbauprodukte auch zellprotektive, anti-inflammatorische und anti-apoptotische Eigenschaften auf. Es ist eine weitere Isoform von HO-1 bekannt: HO-2, welche konstitutiv in verschiedenen Geweben exprimiert wird [69]. HO-1 dagegen, kann in vielen verschiedenen Zelltypen induziert werden. Dazu zählen Endothelzellen, Epithelzellen, Zellen der glatten Muskulatur, Hepatozyten und auch Monozyten/Makrophagen. Induktoren von HO-1 in Monozyten/Makrophagen sind u. a.: das Hämoglobin selbst, NO, Fieber, Endotoxine, UV-Licht, Hypoxie, ROS (reactive oxygene species), Alkohol und die Zytokine IL-6 und IL-10 (siehe Kapitel 3.4) [70, 71]. In vielen Fällen konnte gezeigt werden, dass die zytoprotektive Wirkung von HO-1 durch seine Abbauprodukte hervorgerufen wird.

3.5.1 Funktionen der HO-1-Abbauprodukte

CO: Kohlenmonoxid hemmt die Plättchenaggregation durch Aktivierung der zytosolischen, löslichen Guanylat-Zyklase, welche die Bildung von cGMP bewirkt [72]. Über

Interferenz mit den MAPK-Wegen hemmt CO die LPS-induzierte Ausschüttung der entzündungsfördernden Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6, induziert jedoch gleichzeitig IL-10 [73, 74]. Somit wirkt CO stark anti-inflammatorisch, zellprotektiv und antikoagulatorisch, was durch Verminderung von Ischämie/Reperfusionsschäden und verringerte Transplantatabstoßungen an verschiedensten Allo- und Xeno-Transplantat-Modellen bestätigt werden konnte [75]. Beispielsweise verlängert die Induktion von HO-1 in Nieren-Transplantaten von Ratten das Überleben und die Funktionsfähigkeit der Transplantate in den Empfänger-Ratten nach erhöhten Ischämiezeiten während der Transplantation [76]. Ferner weist CO auch anti-proliferative und anti-apoptotische Eigenschaften auf [75].

Eisen: Obwohl Eisenionen stark oxidierend wirken und somit sehr schädlich für Zellen sind, führt durch HO-1 ausgelöste Eisenfreisetzung nicht zur Zellschädigung. Grund dafür ist zum einen die durch HO-1 gesteigerte Expression der Fe-ATPase, ein den Fe-Efflux steigerndes Transportprotein [77], und zum anderen die Induktion des Eisenspeicher-Proteins Ferritin, welches auch selbst zellprotektive Eigenschaften haben soll [78].

Biliverdin: Biliverdin wird durch die Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin abgebaut. Beide haben anti-oxidative Eigenschaften und können somit schädliche ROS abfangen [79]. Es wird vermutet, dass Biliverdin dadurch zellprotektiv und anti-apoptotisch wirkt. Neben verlängertem Überleben von Transplantaten und verbesserter post-ischämischer Herzfunktion [80], konnte für Biliverdin auch ein Schutz vor Komplementlyse nachgewiesen werden [81, 82].

3.5.2 Die physiologische Rolle von HO-1

Die einschneidende Rolle von HO-1 zeigt der sehr beeindruckende Fall eines japanischen Jungen mit Mutationen in beiden HO-1-Allelen und folglichem HO-1-Defizit. Er war wachstumsretardiert, hatte keine Milz und litt an einer hämolytischen Anämie, Fieber, Eisenablagerungen, Arthralgien, Hyperlipidämie und dissimulierter intravaskulärer Gerinnung. Schließlich verstarb er im Alter von 6 Jahren an Hypertension und subduralen Hämorrhagien [83]. Ähnliche Symptome zeigen HO-1 Knock-out-Mäuse, die neben starken Eisenablagerungen in Leber und Niere, auch vermehrte Anfälligkeiten gegenüber oxidativem Stress oder LPS zeigten [84]. Neben den schon oben erwähnten, stark protektiven Eigenschaften in Ischämie/Reperfusionss- und Transplantationsmodellen konnte auch in akuten und chronischen Entzündungsprozessen ein Schutz vor Organschäden durch HO-1-Hochregulation beobachtet werden [85]. Eine in Mäusen durch Gabe von LPS und D-Galaktosamin ausgelöste, akute

Hepatitis konnte durch vorherige Steigerung der HO-1-Expression reduziert werden und führte zum verlängerten Überleben der Tiere [86].

Initial wurden HO-1 vor allem anti-inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben, jedoch scheinen eher zytoprotektive Funktionen von HO-1 sekundär durch Prävention von Nekrosen oder Gewebsschädigungen eine Entzündungsreaktion zu vermeiden bzw. einzudämmen. Beispielsweise wirkt freies Häm chemotaktisch und aktivierend auf neutrophile Granulozyten und aktiviert auch T_H und T_C-Zellen [87]. Da HO-1 durch Abbau von freiem Häm dessen Verfügbarkeit stark einschränkt, lassen sich dadurch die ubiquitäre Infiltration durch neutrophile Granulozyten und die durch oxidativen Stress ausgelösten Gewebsschädigungen bei HO-1-Defizienz erklären [84, 88]. Weiterhin zeigen peritoneale Maus-Makrophagen von HO-1^{-/-}- und HO-1^{+/+}- Mäusen *in vitro* die gleiche Immunantwort nach Stimulation mit LPS [84].

4 Zielsetzung

Das Komplementsystem als wesentlicher Bestandteil der angeborenen Immunantwort wird durch vielfältige Mechanismen sowie auch regelmäßig spontan aktiviert. Auch wenn die Komplementaktivierung größtenteils auf Oberflächen von Erregern oder als gefährlich markierten Zellen erfolgt, können MACs auch an eigene, gesunde Zellen binden oder von angrenzenden Membranen dorthin diffundieren [22]. Für solche Fälle gibt es Regulationsproteine, die eigene Zellen vor Komplementaktivierung schützen, wie beispielsweise Protektin (CD59) oder DAF (CD55).

Während einer Entzündung kommt es im Rahmen der Erreger-Abwehr zu vermehrter Aktivierung und Produktion von Komplementproteinen. Das erfolgt sowohl systemisch durch gesteigerte Bildung von Akute-Phase-Proteinen in der Leber als auch lokal durch APCs, wie Makrophagen, oder T-Zellen [89]. Demnach ist die Konzentration von aktivierten Komplementproteinen am Entzündungsherd besonders hoch. So stellt sich nun die Frage, ob am Ort einer Entzündung an der Abwehr beteiligte Immunzellen ausreichend vor Komplementlyse geschützt sind? Reicht, trotz erheblicher Mehrbelastung durch aktiviertes Komplement, der basale Schutz aus oder müssen weitere Schutzmechanismen aktiviert werden? Makrophagen könnten davon besonders betroffen sein, da während der Phagozytose von Erregern oder apoptotischen Zellen eine unmittelbare Nähe von Zelloberfläche, an der die Komplementaktivierung erfolgt, und Makrophagenoberfläche besteht.

Mechthild Jung beobachtete in ihrer Doktorarbeit in Gen-Expressionsanalysen, dass das Zytokin Interleukin-10 vor Komplement schützende Proteine wie CR1, CD35 und CD59 auf mRNA-Ebene in Monozyten hochreguliert. Dies suggeriert eine mögliche Beeinflussung der Komplementlyse durch IL-10. In einem Komplementlyse-Assay konnte sie zeigen, dass IL-10 Monozyten vor Komplementlyse schützt. Dies erscheint vor dem Hintergrund der Steigerung der Phagozytoseaktivität von Monozyten/Makrophagen durch IL-10, physiologisch sinnvoll [54]. So könnte der vermehrte Kontakt von Makrophagen mit MAC-beladenen und Komplementaktivierenden Zellmembranen die Gefahr steigern, selbst mit MACs beladen und lysiert zu werden, und einen vermehrten Komplementschutz notwendig machen. Ferner führt IL-10 in B-Zellen mittels Isotypen-Switch zur Produktion von IgG1- und IgG3-Antikörpern [48], wobei besonders IgG3-, aber auch IgG1-Antikörper das Komplementsystem vermehrt aktivieren.

Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es den Komplementlyse-Assay zu optimieren und zu untersuchen, ob der IL-10-induzierte Schutz auch bei Komplementaktivierung durch

Phagozytose von Zymosan (Hefepartikel) besteht, eine Konstellation, die eher den physiologischen Bedingungen entspricht. Von Interesse war auch, ob ebenso Makrophagen oder Lymphozyten durch IL-10 vermehrt vor Komplementlyse geschützt werden.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Frage nach dem zu Grunde liegenden Mechanismus des IL-10 induzierten Komplementschutzes. Neben den klassischen Komplementregulierenden Proteinen (CRP) kommt besonders die Hämoxygenase-1 als Kandidat in Frage, da sie in Monozyten/Makrophagen durch IL-10 induziert wird und für sie bereits stark zytoprotektive und vor Komplement schützende Eigenschaften beschrieben wurden [81].

5 Material und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid Lösung 30%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Serva, Heidelberg, Deutschland
BD OptEIA™ Substrat Reagent A + B	BD Biosciences, San Diego, USA
β-Mercaptoethanol	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, Deutschland
Calcein-AM	MoBiTec GmbH, Göttingen, Deutschland
Cellfix Solution for FACS	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Difco™ Skim Milk (Magermilchpulver)	Becton Dickinson, Cockeyville, USA
ECL Western Blot Detektionssystem (1 & 2)	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Ethanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethylendiamintetraessigsäure-Na-Salz (EDTA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
FACS Clean	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS Flow Puffer	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Ficoll-Paque Plus	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Glycerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Lysispuffer	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natrium-Desoxycholat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Natriumpyrophosphat (Na ₄ P ₂ O ₇)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumfluorid (NaF)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phosphate-Buffered Saline (PBS)	PAA, Pasching, Österreich
Ponceau S Lösung	Sigma, Steinheim, Deutschland
RPMI 1640 Medium	PAA, Pasching, Österreich
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Substrate Reagent Set for Western Blot	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Tris-Base	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypan-Blau	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypsin/EDTA	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Tween(R)20	Merck, Darmstadt, Deutschland

5.1.2 Puffer und Lösungen

Western Blot:

Extraktpuffer	Probenpuffer	Transferpuffer
1 mM Tris (pH 7,4) 100 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM NaF 20 mM Na ₄ P ₂ O ₇ 1 % Triton 10 % Glycerol 0,5 % Natrium-Desoxycholat	2 ml (0,625 M) Tris-HCl (pH 6,8) 0,2 g SDS 5 ml Glycerin 0,5 ml β-Mercaptoethanol 0,1 ml Bromphenolblau (1% in Ethanol) 2,4 ml destilliertes Wasser	25 mM Tris-Base (pH 8,3) 150 mM Glycin 10 % Methanol Laufpuffer 25 mM Tris-Base (pH 8,3) 192 mM Glycin 0,1 % SDS

Waschpuffer	PBS + 0,05 % Tween
Benzonasepuffer	100 mM Tris pH 8.0 + 5 mM MgCl ₂
Blocking Puffer	LI-COR Biotechnology, Bad Homburg, Deutschland

MACS und FACS:

MACS-Puffer	50 ml PBS + 1 ml FCS + 200 µl EDTA
FACS-Puffer	50 ml PBS + 250 mg BSA

5.1.3 Biochemikalien und Kits

Benzonase (Reinheit >90%)	Novagen, Darmstadt, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
HO-1 siRNA	Ambion Inc., Austin, TX, USA
Human Monocyte Nucleofector Kit	Amaxa AG, Köln, Deutschland
Kaninchenserum	Merck, Beeston/Nottingham, UK
Negativ-Kontrolle-siRNA	Ambion Inc., Austin, TX, USA
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Gibco, New York, USA
Proteaseinhibitor	Sigma, Steinheim, Deutschland
Protein-Standard-Marker für WB	Biorad, München, Deutschland
Zymosan	Sigma, Steinheim, Deutschland

5.1.4 Stimulanzen/Induktoren/Inhibitoren

IL-6	R&D Systems, Minneapolis, USA
IL-10	R&D Systems, Minneapolis, USA
Latrunculin B	Merck Biosciences, Beeston/Nottingham, UK
M-CSF	CellSystems [®] , Katharinen, Deutschland
P38-Inhibitor (SB220025)	Axxora, Lärach, Deutschland
SnPP	Frontier Scientific, Carnforth, UK
Stat3-Inhibitor (JSI-124)	Merck, Darmstadt, Deutschland

5.1.5 Antikörper

Anti-β-Aktin	Cell Signaling, Frankfurt am Main, Deutschland
Anti-CD14-APC	Becton Dickinson, San Jose, USA
Anti-CD14-Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-CD16-FITC	Immunotec, Marseille, Frankreich
Anti-CD59-FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Anti-CD59 (blockierend, Klon YTH53.1)	Serotec, Düsseldorf, Deutschland
Anti-HO-1 (Kaninchen, polyklonal)	Stressgen, Ann Arbor, MI, USA
Anti-HO-1 (Maus, monoklonal)	Stressgen, Ann Arbor, MI, USA
Anti-IgG	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Anti-Kaninchen-IgG (HRP-konjugiert)	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Anti-Kaninchen-IgG (IRDye-konjugiert)	Li Cor, Lincoln, NE, USA
Anti-Maus-IgG (HRP-konjugiert)	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Anti-Maus-IgG (IRDye-konjugiert)	Li Cor, Lincoln, NE, USA
Anti-MHC-I-FITC	MoBiTec, Göttingen, Deutschland
Anti-MHC (Klon W6/32)	Serotec, Düsseldorf, Deutschland

5.1.6 Verbrauchsmaterialien

Butterfly + Adapter	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Einwegpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Falcon, Franklin Lake, USA
ELISA-Platte	Greiner Bio-One, Essen, Deutschland
Eppendorf-Tubes (für 2 ml, 1,5ml, 0,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Le Pont De Claix, Frankreich
Falcon-Tubes (15, 50ml)	Becton Dickinson, Le Pont De Claix, Frankreich
Filterpapier Gel-Blotting-Papiere	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
MACS-Säulen LD oder LS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Nitrocellulose Membran Hybond™-ECL™	Amersham Bioscience, Little Chalton, UK
Pipettenspitzen (10, 100,1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transfer-Pipette	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Tubes für Ficoll	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serumröhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturplatten; 96 bzw. 24 Vertiefungen	Falcon, Franklin Lake, USA
Zitratröhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

5.1.7 Geräte

Absaugvorrichtung	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Abzugshaube	Erlab, Köln, Deutschland
Blockthermostat	Kleinfeld Labortechnik, Deutschland
Blotvorrichtung	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Brutschrank	Jouan, Karlsruhe, Deutschland
Bürker-Zählkammer	Bürker Fein-Optik, Bad Blankenburg, DDR
Durchflußzytometer FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Gelelektrophorese Spannungsgerät	Bio-Rad, Hempstead, UK
Gelelektrophoresekammer-system	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland

Heizblock	Lab4You, Berlin, Deutschland
Kammersystem	Bio-Rad, Hercules, USA
Kühlschrank	Liebherr, Biberach a.d. Riss, Deutschland
Mikroskop	Carl-Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop	Olympus, Hamburg, Deutschland
Nukleofektionsgerät	Lonza Verviers, Verviers, Belgien
pH-Meter	Mettler Toledo, Giessen, Deutschland
Pipetboy	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Quadro-MACS-Magnet	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Schüttler	IKA, Staufen i. Br., Deutschland
Sterilbox	Anthos, Köln, Deutschland
Tecan Fluorescence Reader	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Tiefkühlschrank (-20°C)	Liebherr, Biberach a.d. Riss, Deutschland
Tiefkühlschrank (-70°C)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Tischzentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland
Vortexer	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Waage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland

5.2 Zellbiologische Methoden

5.2.1 Präparation von PBMCs aus frischem Vollblut

PBMCs (periphere mononukleäre Blut-Zellen) wurden aus frischem Vollblut gesunder Spender sowie aus buffy coats (Leukozyten/Thrombozyten-Fraktion nach Zentrifugieren einer antikoagulierten Vollblutspende) mittels der Ficoll-Methode isoliert. Zu den PBMCs werden B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen und auch Monozyten, die ca. 3-12 % aller PBMCs ausmachen, gezählt.

Nach 1:2 Verdünnung des frisch abgenommenen Blutes bzw. des buffy coats mit PBS, wurden jeweils 15 ml Ficoll mit 35 ml verdünntem Blut in einem Falcon-Tube überschichtet. Die Überschichtung erfolgte vorsichtig und langsam, so dass eine Durchmischung des Vollblutes mit dem Ficoll möglichst vermieden wurde. Erst das anschließende, 20-minütige Zentrifugieren der Röhrchen bei 1000 g und Raumtemperatur trennte die PBMCs von Erythrozyten und Granulozyten. Dabei ermöglicht das Ficoll, ein synthetisches Polysaccharid, durch seine spezifische Dichte die Trennung von Erythrozyten/Granulozyten und PBMCs. Es bildeten sich dabei vier charakteristische Phasen. Am Grund des Falcon-Tubes befanden sich die Erythrozyten, die mit einer zarten Schicht von Granulozyten überzogen waren; darüber lag das Ficoll, über dem die PBMCs als trüber Ring abzugrenzen waren. Das Plasma bildete die oberste Phase. Mit

einer sterilen Pasteurpipette wurden die PBMC-Ringe aller Röhrchen entnommen und in ein neues Falcon-Tube überführt. Die Zellen wurden in PBS gewaschen, zentrifugiert (300 g, 10 min) und das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl, erfolgte ein weiteres Waschen der PBMCs mit PBS (200 g, 10 min) und Aufnahme der Zellen in RPMI Medium oder MACS-Puffer, je nach weiterem Versuchsverlauf.

5.2.2 Zellzahlbestimmung

10 µl der Zellsuspension wurden 1:10 mit einer Trypan-Blaulösung verdünnt und mit Hilfe einer Bürker-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop gezählt. Aufgrund erhöhter Zellmembrandurchlässigkeit toter Zellen können diese den Farbstoff Trypan-Blau leicht aufnehmen, so dass von blau-gefärbten toten Zellen lebende Zellen als gut erkennbare, ungefärbte, leuchtende Punkte unterscheidbar sind. Es wurden vier Großquadrate ausgezählt und die Anzahl der Zellen mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{4} \cdot 10^4 \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{ml der Zellsuspension}$$

5.2.3 Gewinnung von Monozyten mittels magnetischer Zelltrennung (MACS)

Eine zuverlässige Methode zur Separation von Monozyten aus PBMCs ist die magnetische Zelltrennung (MACS). Dazu werden Zellen mit sogenannten Microbeads markiert. Das sind Antikörper gegen zellspezifische Oberflächenproteine, an die kleine (< 50 nm) Eisenoxidpartikel gebunden sind, die superparamagnetische Eigenschaften aufweisen. Werden nun diese Zellen durch eine von einem starken Magnetfeld umgebene Säule geschickt, bleiben die markierten Zellen haften, während nicht-magnetische Zellen durchlaufen. Durch Entfernen des Magnetfeldes können die an der Säule haften gebliebenen, Antikörper-markierten Zellen abgespült und separat aufgefangen werden.

Von positiver Separation spricht man, wenn diejenigen Zellen mit Antikörpern markiert wurden, die im Versuch auch weiterverwendet werden. Dementsprechend ist eine negative Separation, wenn alle nicht erwünschten Zellen mit magnetischen Antikörpern markiert und

somit in der Säule zurückgehalten werden, die nicht Antikörper-geladenen Zielzellen dann einfach nach Durchlaufen der Säule aufgefangen und weiter verwendet werden.

Monozyten kann man mit Microbeads, die gegen das Oberflächenprotein CD14 gerichtet sind, aus PBMCs leicht positiv selektieren. CD14 ist ein Oberflächenprotein, welches von myelomonozytären Zellen, d. h. von Monozyten und Granulozyten exprimiert wird. Die Durchführung der magnetischen Zelltrennung erfolgte entsprechend des Protokolls des Herstellers. Die Reinheit der selektierten Population wurde aufgrund konstanter Ergebnisse von über 90 % CD14-positiver Zellen nur bei den ersten Versuchen mit Hilfe der Durchflusszytometrie kontrolliert (siehe Abb. 5.3).

5.2.4 Kultivierung und Stimulation von Monozyten/Makrophagen

Monozyten, Makrophagen und RAW264.7-Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit folgenden Zusätzen kultiviert: 10 % fetales Kälberserum (FCS), 2 mM Penicillin/Streptomycin und 2 mM Glutamin. Entsprechend der jeweiligen Versuche wurden Monozyten oder Makrophagen für die Stimulation mit nachfolgend aufgeführten Substanzen und Konzentrationen behandelt:

Substanz	Inkubation	Konzentration
IL-10	über Nacht im Brutschrank (37°C)	10 ng/ml
IL-6	über Nacht im Brutschrank (37°C)	10 ng/ml
SnPP	über Nacht im Brutschrank (37°C)	20 µM
LatrunculinB	30 min bei 4°C mit α-MHC-I	50 µM
JSI-124	über Nacht im Brutschrank (37°C)	2,5 µM
SB220025	über Nacht im Brutschrank (37°C)	5 µM

Tabelle 5.1

5.2.5 Generieren von Makrophagen

Monozyten können mit Hilfe von Zytokinen wie M-CSF (Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) *in vitro* zu Makrophagen differenzieren (siehe Abb. 5.4). Dafür wurden in einer 96-well Platte 5×10^6 CD14-positiv-selektierte Zellen pro ml RPMI Medium mit einem Zusatz von 10 ng/ml M-CSF für 6 Tage inkubiert. Nach 3 und nach 6 Tagen musste das Medium komplett gewechselt werden, wobei am 3. Tag frisches M-CSF in gleicher Konzentration hinzu gegeben wurde. Die ausgesäten Makrophagen wurden direkt für die Versuche weiterverwendet,

da sie stark an den Plattenboden adhären und demzufolge schwer abzulösen sind. So erfolgte am 6. Tag die Stimulation der Hälfte der Makrophagen mit IL-10 (10 ng/ml) über Nacht und am folgenden Tag der Komplementlyse-Test. Die hohe Ausgangszellkonzentration von 5×10^6 Zellen/ml war nötig, weil erfahrungsgemäß während der 6-tägigen Inkubation ca. 85 % der Monozyten sterben.

5.2.6 Detektion der Zellyse mittels Calcein

Calcein-AM (Calcein-bis-Acetoxy-methylester) ist ein pH-stabiler, nicht toxisch wirkender Ester eines Fluoreszenzfarbstoffes, der aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften leicht durch Zellmembranen passieren kann. Intrazellulär wird er durch zytoplasmatische Esterasen gespalten und kann mit Hilfe von Calcium-Ionen grün fluoreszierende Chelatkomplexe bilden. Das entstehende Fluorescein-Derivat, auch Calcein genannt, hat nun hydrophile Eigenschaften und ist damit nicht mehr membranpermeabel, so dass es sich intrazellulär anreichert (siehe Abb. 5.1). Es werden nur lebende Zellen mit Calcein markiert, da tote Zellen keine Esterasenaktivität aufweisen. Eine häufige Anwendung findet Calcein-AM im Zytotoxizitäts-Test [90].

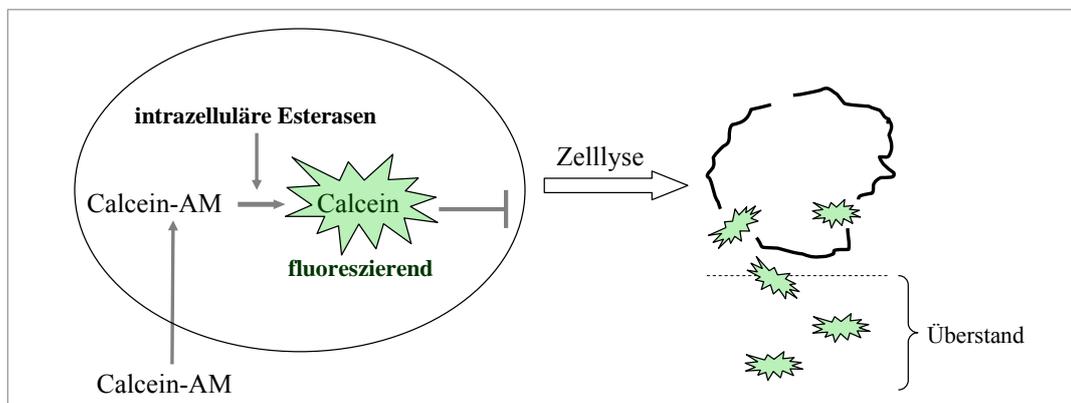


Abb. 5.1 Calcein-Assay

Calcein-AM diffundiert durch die Zellmembran und wird durch intrazelluläre Esterasen in fluoreszierendes Calcein gespalten. Dieses ist nicht mehr membran-permeabel und kann nur durch Lyse der Zellen freigesetzt werden. Dementsprechend korrespondiert die Menge von der im Überstand gemessenen Calceinfluoreszenz mit der Anzahl der lysierten Zellen.

In allen Versuchen wurden die Zellen im Brutschrank mit einer Calcein-AM-Konzentration von $1 \mu\text{g/ml}$ in RPMI Medium 30 min lang inkubiert. Um die Waschschrte und damit den unkontrollierten Verlust von Zellen möglichst gering zu halten, wurde das nicht

aufgenommene Calcein-AM erst nach einer weiteren halben Stunde Inkubation im Kühlschrank (zur Antikörperbindung für die Komplementlyse) entfernt.

Durch die Komplement-induzierte Zellyse wird fluoreszierendes Calcein von lysierten Zellen in den Überstand freigesetzt. Die Fluoreszenz konnte nach Überführung des Überstandes auf eine ELISA-Platte mit Hilfe eines Spektrometers bei 490 nm Excitationswellenlänge und 515 nm Emissionswellenlänge bestimmt werden. Je mehr Zellen lysierten, desto höher war das gemessene Fluoreszenzsignal, da umso mehr Calcein aus den lysierten Zellen in den Überstand abgegeben wurde.

5.2.7 Gewinnung von humanem Serum

Von einem Standard-Donor wurde Vollblut in Serum-Röhrchen abgenommen, für eine vollständige Koagulation geschwenkt und dann mit 3000 Umdrehungen pro min 5 min lang zentrifugiert. Alle Zellen und das Koagulat setzen sich dadurch am Boden ab, so dass das Serum im Überstand abpipettiert werden konnte. Zur Aufbewahrung wurde das Serum bei -80°C eingefroren.

5.2.8 Komplementlyse-Test

Um die Regulation der Komplementlyse differenzierter zu untersuchen, wurde das Komplementsystem durch zwei verschiedene Auslöser aktiviert. Zunächst wurden zur Aktivierung des Klassischen Weges MHC-I-Antikörper eingesetzt, da MHC-I-Moleküle an der Oberfläche von allen Zellen in hoher Zahl exprimiert werden. Später konnte auch durch Inkubation mit opsonisiertem Zymosan (Hefepartikel) anstelle von MHC-I-Antikörpern das Komplementsystem aktiviert werden, sodass die Zellen teilweise lysierten. Es wurde entweder humanes Serum oder Kaninchenserum mit aktivierbaren oder inaktivierten Komplementfaktoren verwendet.

Eine Zusammenfassung des Versuchsaufbaus der am häufigsten durchgeführten Experimente zeigt Abbildung 5.2:

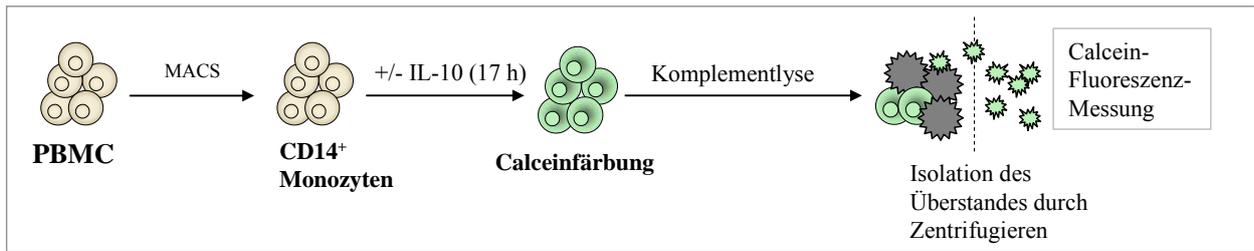


Abb. 5.2 Allgemeine Versuchsanordnung

CD14-positive Monozyten wurden mittels MACS aus PBMCs isoliert und 17 h mit IL-10 inkubiert. Nach Färbung der Zellen mit Calcein wurde die Komplementlyse induziert. Dabei wird aus lysierten Zellen fluoreszierendes Calcein in den Überstand freigesetzt, wobei dessen Fluoreszenz im Überstand proportional zur Anzahl lysierter Zellen ist.

Komplementaktivierung mittels MHC-I-Antikörper

CD14-positiv-selektierte Monozyten wurden in einer 96-well Platte mit einer Konzentration von $1,5-2 \times 10^5$ Zellen pro well ausgesät und über Nacht für ca. 17 Stunden mit verschiedenen Stimulantien inkubiert (siehe Tab. 5.2.1). Am nächsten Tag wurden alle Zellen mit $1 \mu\text{g/ml}$ Calcein-AM (30 min, 37°C) markiert. Gleich darauf wurden den Zellen der spezifischen und unspezifischen Lyse zur Antikörperbindung $2 \mu\text{g/ml}$ MHC-I-Antikörper zugegeben und die Platte für 30 min bei 4°C aufbewahrt. Die Platte wurde dann zentrifugiert (300 g, 5 min) und die Überstände wurden abgesaugt, so dass sowohl das nicht aufgenommene Calcein-AM als auch die nicht gebundenen Antikörper entfernt wurden. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit Serum für 90 min im Brutschrank bei 37°C , so dass die Zellen durch das Komplementsystem lysiert werden konnten. Die Platte wurde danach erneut zentrifugiert und der Überstand auf eine ELISA-Platte übertragen, um anschließend die Fluoreszenz zu messen.

Komplementaktivierung mittels Zymosan

Zymosan ist ein natürlicher Bestandteil der Zellwand von Hefen. In den Versuchen wurde opsonisiertes Zymosan zur Verbesserung der Aufnahme mittels Phagozytose durch Monozyten verwendet. Dazu wurden 10 mg des nach Herstellerangaben vorbereiteten, in PBS gelösten Zymosans bei 3000 rpm 5 min zentrifugiert und der Überstand danach verworfen. Das Pellet wurde durch Schütteln in 4 ml einer 3:4 Mischung von frischem Humanserum und PBS gelöst und bei 37°C eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Um die Zymosanpartikel möglichst vollständig mit C3b zu beschichten, wurde die Lösung von Zeit zu Zeit während der Inkubation geschüttelt. Nach Auswaschen des restlichen Serums mit PBS wurde das Zymosan entsprechend einer Konzentration von 10 mg/ml in PBS aufgenommen. Sollten die Zellen durch Zymosan anstelle von MHC-I-Antikörpern lysieren, wurde die Platte nach der Calceinfärbung für 30 min bei 4°C gekühlt. Die Inkubationszeit mit Zymosan betrug dann nur 15 min. Somit sollte eine zu schnelle Phagozytose verhindert und der Moment abgepasst werden, wo sich das Zymosan noch

an der Monozytenoberfläche befindet. Zur Berechnung eines Komplementlysewertes sind vier verschiedene *wells* nötig, die mit jeweils 100 µl nach folgendem Schema pipettiert wurden:

<i>well 1: X_a</i>	<i>well 2: X_i</i>	<i>well 3: MAX</i>	<i>well 4: MIN</i>
spezifische Lyse	unspezifische Lyse	Totallyse	Minimallyse
50 % RPMI	50 % RPMI	RPMI ohne FCS	RPMI ohne FCS
50 % aktivierbares Serum	50 % inaktiviertes Serum	+ 1,8 % Triton	

Tabelle 5.2

Well 1 entspricht dabei der Lyse durch aktivierbares Serum, *well 2* der Lyse trotz Verwendung von inaktiviertem Serum (z. B. durch Stress durch das Experiment an sich), *well 3* der Lyse aller Zellen durch den Zusatz von Triton und *well 4* dem Hintergrundwert ohne MHC-I oder Zymosaninkubation und ohne Serumzusatz. Für *well 1* und *2* wurde RPMI ohne FCS verwendet, da das im FCS und Serum enthaltene Albumin eine Eigenfluoreszenz aufweist. In Vorversuchen wurde gezeigt, dass die Zugabe von aktiviertem Serum allein ohne MHC-I-Antikörper nur zu einer sehr geringen, unspezifischen Lyse führte. Die Inaktivierung von Serum erfolgte für 45 min bei 56°C im Heizblock.

Die Komplementlyse L_{compl} (in % der Totallyse) berechnet sich aus den Fluoreszenz-Messwerten X_a (spezifische Lyse), X_i (unspezifische Lyse), MIN und MAX entsprechend folgender Formel:

$$L_{\text{compl}} = \frac{(X_a - X_i)}{(MAX - MIN)} \cdot 100 \%$$

Somit kann verhindert werden, dass unspezifisches Sterben oder Lysieren von Zellen die Ergebnisse beeinflusst. Durch die Eigenfluoreszenzunterschiede zwischen FCS, Kaninchenserum und humanem Serum sind jedoch auch negative Werte oder Werte über 100% aufgetreten. In den statistischen Auswertungen wurden zu hohe Werte 100% gleichgesetzt und negative Werte 0% gleichgesetzt. Von allen *wells* wurden zur Verbesserung der Genauigkeit Triplicate pipettiert und gemessen.

5.2.8 Durchflusszytometrie (FACS)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS: Fluorescence Activated Cell Sorter) können Zellen einzeln charakterisiert und quantifiziert werden. Dies geschieht durch die Messung unterschiedlicher Streuung eines Laserstrahls, der auf eine einzelne Zelle trifft. Durch vorherige

Markierung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen, können zusätzlich mehrere Fluoreszenzsignale verschiedener Wellenlängen gemessen werden.

Prinzip der Messung

Die Zellsuspension wird mit einer Kapillare aufgesogen und so stark verdünnt, dass die Zellen einzeln den Analysepunkt passieren, an dem sie mit Laserlicht bestrahlt werden. Die variable Größe und Granularität von verschiedenen Zellpopulationen führt zu einer jeweils unterschiedlichen Lichtstreuung, die mit Hilfe von Filtern und Photomultipliern (PMTs) gemessen und digital verarbeitet wird. Man unterscheidet die Vorwärtsstreuung (FSC: forward scatter; Lichtbeugung), die in Abhängigkeit der Zellgröße variiert, sowie die Seitwärtsstreuung (SSC: siteward scatter; Lichtbrechung), welche die intrazelluläre Granularität einer Zelle widerspiegelt.

Bei der Messung Fluoreszenz markierter Zellen werden Elektronen der Farbstoffe durch den Laserstrahl auf ein höher energetisches Niveau angeregt. Diese fallen nach kurzer Zeit unter Emission von Photonen mit spezifischen Wellenlängenmaxima in einen Grundzustand zurück. Dieses farbstoffspezifische, emittierte Licht wird jeweils gefiltert und durch zusätzliche PMTs detektiert.

Im FACS-Calibur können bis zu vier verschiedene Fluoreszenzen gleichzeitig erfasst werden, die durch ein entsprechendes PMT, im jeweiligen Fluoreszenzkanal (FL1–FL4) gemessen werden. Dabei verhält sich die gemessene Signalintensität proportional zur Menge der gebundenen Farbstoffe pro Zelle, so dass z. B. quantitative Aussagen über Rezeptoren möglich sind. Die verwendeten Fluoreszenzen sind in Tabelle 5.3 aufgeführt:

Farbstoff	Kanal	Anregungswellenlänge	Emissionsmaximum
FITC (Fluoreszeinisothiozyanat)	FL1	488 nm	530 nm
PE (Phycoerythrin)	FL2	488 nm	580 nm
APC (Allophycocyanin)	FL3	633 nm	660 nm
PerCP (Peridinin-Chlorophyll-Protein)	FL4	488 nm	670 nm

Tab. 5.3 In der Durchflusszytometrie eingesetzte Fluoreszenzen

Anfärbung und Fixierung der Zellen

Die bereits kultivierten und stimulierten Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt und mit FACS-Puffer gewaschen. Um ein unspezifisches Binden der Fluoreszenz-Antikörper mit ihrem Fc-Teil an von Monozyten und Makrophagen exprimierten Fc-Rezeptoren zu verhindern, erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit IgG-Molekülen zur Blockierung dieser Fc-Rezeptoren. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen 30-45 min im

Dunkeln bei 4°C mit den entsprechenden Fluoreszenz-Antikörpern inkubiert. Die verwendeten Mengen der Antikörper sind in Tab. 5.4 aufgeführt.

Antikörper	Konzentration
CD14-APC	2 µl
CD16-FITC	10 µl
CD59-FITC	10 µl
MHC-I-FITC	3 µl

Tab. 5.4 Im FACS verwendete Antikörper

Erneutes Waschen mit FACS-Puffer sowie Inkubation für 20 min mit Solution A im Dunkeln bei Raumtemperatur fixierte die Zellen. Somit konnte die FACS-Messung auch noch ein paar Tage später erfolgen. Für die Messung wurden die Zellen in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und bei 4°C im Dunkeln bis zum Messzeitpunkt konserviert. Die Auswertung und graphische Darstellung der Versuche erfolgte mit der Cell Quest Software Version 3.3.

Zellanalyse nach Monozytenseparation und Makrophagengenerierung

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie lässt sich die Reinheit der CD14-positiv-selektierten Monozytenpopulation (siehe 5.2.3) leicht überprüfen. Dazu wurden nicht-selektierte PBMCs mit selektierten Monozyten nach Anfärbung mit CD14-APC-Antikörpern verglichen. Die Abbildung 5.3 zeigt eine deutliche Anreicherung der Monozyten von 14 auf 97 %.

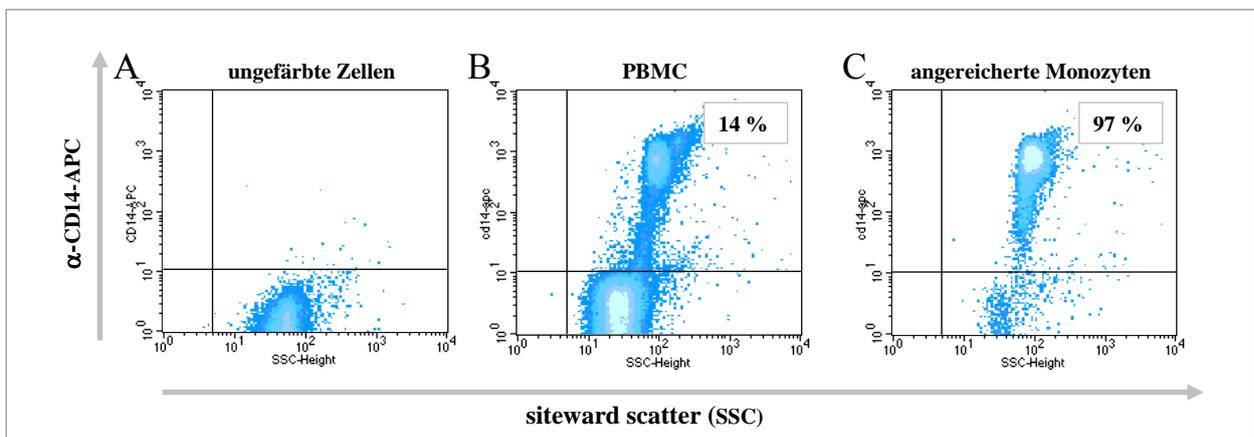


Abb. 5.3 Anreicherung von Monozyten mittels Magnetischer Zelltrennung (MACS)

Frische PBMCs wurden direkt (B) oder nach CD14-positiver Selektion mittels MACS (C) mit CD14-APC-Antikörpern gefärbt bzw. nicht gefärbt. Danach wurde die CD14-Oberflächen-Expression im Durchflusszytometer bestimmt und als *density-plot* dargestellt. Im rechten, oberen Quadranten befinden sich jeweils die CD14-exprimierenden Zellen (Monozyten).

Zur Überprüfung der unter Punkt 5.2.5 beschriebenen Makrophagengenerierung erfolgte die Identifizierung der Makrophagen mit einem Antikörper gegen CD16 (Fcγ-RIII). Nach 6-tägiger Inkubation mit M-CSF (10 ng/ml) sieht man deutlich eine Steigerung der CD16-Oberflächenexpression, dargestellt in Abb. 5.4 C als Histogramm-Plot nach FACS-Analyse.

Dabei zeigt die gestrichelte Linie die Färbung mittels Isoantikörper (in diesem Falle FITC-Antikörper) als Negativkontrolle, um ein unspezifisches Binden der CD16-Antikörper über den FITC-Teil auszuschließen. Des Weiteren zeigen die in Abb. 5.4 A und 5.4 B dargestellten *density-plots* eine starke Zunahme der Größe (FSC) und der Granularität (SSC) der Zellen als Hinweis auf die Differenzierung in Makrophagen, die bekanntermaßen im Vergleich zu Monozyten größer sind und mehr Granula enthalten.

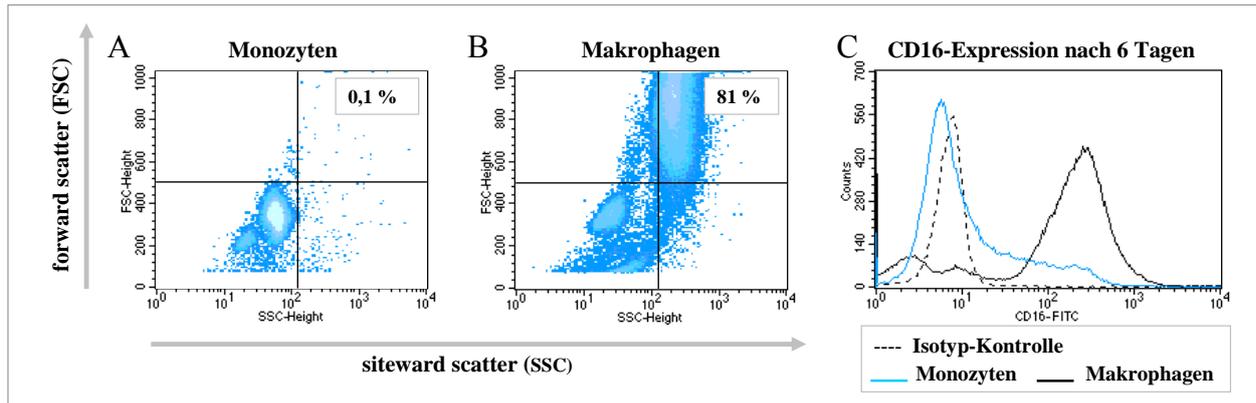


Abb. 5.4 Generierung von Makrophagen

Frische, CD14-positiv-selektierte Zellen wurden direkt (A, blaue Linie von C) oder nach 6-tägiger Inkubation mit M-CSF (B, schwarze Linie von C) mit CD16-FITC-Antikörpern gefärbt. (A,B) Darstellung der Größe und Granularität mittels *density-plot* von Monozyten und Makrophagen. (C) CD16-Oberflächenexpression von Monozyten und Makrophagen als Überlagerungshistogramm dargestellt.

5.3 Protein-biochemische Methoden

5.3.1 Western Blot Analyse

Das Charakteristikum der Western Blot Analyse ist die qualitative und semi-quantitative Darstellung von spezifischen Proteinen einer Zelllösung. Dafür wurden in dieser Arbeit die denaturierten Proteine mit SDS (Natriumdodecylsulfat) beladen, auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Es folgten der Transfer auf eine Trägermembran mittels Blotting und der immunologische Nachweis der Proteine durch Antikörperkomplexe.

Präparation der Proteine

Die auf einer 6-well-Platte kultivierten Zellen wurden mit kaltem PBS oder Trypsin abgelöst und mit PBS gewaschen, damit die Proteine des im Medium enthaltenen FCS' die Analyse nicht beeinträchtigen. Für einen quantitativen Proteinexpressionsvergleich wurden alle Zellpopulationen direkt vor der Proteinpräparation nochmals gezählt und jeweils die gleiche

Zellzahl zu vergleichender Proben (zwischen $1-2 \times 10^6$ Zellen) in Eppendorff-Tubes überführt. Die Zellen wurden zur Lyse in 30 μ l Extraktpuffer aufgenommen, der auch 2 % Protease-Inhibitor enthielt, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Proteinabbau zu verhindern. Zusätzlich wurde auf Eis gearbeitet. Nach Zugabe von 5 μ l 6-fach-SDS-Probenpuffer, erfolgte die Proteindenaturierung für 5 min bei 95°C im Heizblock. Die Proben wurden sogleich auf Eis abgekühlt und mit 9 μ l von einem 1:8 Benzonase-Benzonasepuffer-Gemisch für 45 min bei 37°C inkubiert. Sie konnten dann bei -20°C zur Aufbewahrung eingefroren werden.

(1) Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Werden Proteingemische auf eine porenhaltige Matrix in einem elektrischen Feld aufgetragen, so wandern sie entsprechend ihrer Größe, ihrer positiven und negativen Ladungen und der Porenweite mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten, so dass eine Auftrennung in spezifische Proteinbanden möglich wird.

Vorbereitend wurden Sammelgel und Trenngel entsprechend Tabelle 5.5 hergestellt:

	Trenngel (12,5 %)	Sammelgel (5 %)
30% Acrylamid/Bisacrylamid	2,5 ml	0,33 ml
Trenngelpuffer: 1,88 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,2 ml	-
Sammelgelpuffer: 0,625 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	0,4 ml
0,5% SDS	1,2 ml	0,4 ml
destilliertes Wasser	1,1 ml	0,87 ml
TEMED	5 μ l	2 μ l
10 % APS	30 μ l	10 μ l

Tabelle 5.5

Nach Polymerisation des gegossenen Trenngels, erfolgten das Auftragen des Sammelgels sowie das Einbringen eines Kamms zur Taschenbildung. 15 min später wurde das System in eine Elektrophorese-Kammer gespannt, diese mit Laufpuffer aufgefüllt und der Kamm vorsichtig entfernt. In die erste Tasche wurden 5 μ l des Protein-Standard-Markers, in alle weiteren Taschen die Proben pipettiert und eine Spannung von 80 V angelegt. Zunächst erfolgt die Konzentrierung der Proteinklassen im Sammelgel mit dem von U.K. Lämmli eingeführten Tris-Glycin/Tris-HCl-Puffersystems. Durch die Nähe des Sammelgel-pH-Wertes (pH = 6,8) mit dem isoelektrischen Punkt des Glycins, haben die Glycinionen im Sammelgel eine sehr niedrige elektrophoretische Mobilität. Dahingegen wandern die Chloridionen sehr schnell, so dass zwischen beiden Ionen ein Feldstärkegradient entsteht, in dem die Proteine entsprechend ihres isoelektrischen Punktes vorsortiert werden. Trifft diese Fraktion nun auf das Trenngel, werden die Proteine durch den kleineren Porendurchmesser abgebremst. Die Geschwindigkeit der Glycinionen steigt jedoch, da

der pH-Wert des Trenngels höher ist (pH = 8,8), so dass sie die Proteine überholen und somit den Feldstärkegradienten auflösen.

Die eigentliche Auftrennung der Proteine erfolgt nun nach ihrem Molekulargewicht (bei 130 V und mit Kühlwasser). Vorbereitend wurden die Proteine mit SDS (anionisches Detergens) beladen, welches ihnen eine einheitliche negative Ladung mit einem konstanten Masse-Ladungs-Verhältnis (1,4 g SDS pro 1 g Protein) verleiht und sie in Richtung Anode wandern lässt. Aufgrund des umgekehrt proportionalen Verhältnisses der Wanderungsgeschwindigkeit zur Proteingröße, wandern kleinere Proteine im gleichen Zeitraum weiter als größere und bilden auf dem Gel ein charakteristisches Bandenmuster.

(2) Blotting

Entsprechend der Anordnung in Abbildung 5.5 wird das Proteinmuster des Gels elektrophoretisch mit dem *semi-dry*-Blot-System auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurden die Membran und das mit Proteinen beladene Gel luftblasenfrei zwischen je drei, in Transferpuffer getränkte Filterpapierschichten in einer Blotkammer eingespannt. Durch Anlage von ca. 200 mA für 45 min, bewegen sich die Proteine vom Gel in Richtung Anode auf die Membran und werden dort durch hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen fixiert. Durch das gleichzeitige Auswaschen des SDS' renaturieren die Proteine größtenteils. Zur Überprüfung des Verfahrens konnten alle Proteine auf der Membran kurzfristig mit Ponceau-Lösung dargestellt und eingescannt werden. Die rote Färbung ließ sich unkompliziert mit destilliertem Wasser wieder abwaschen.

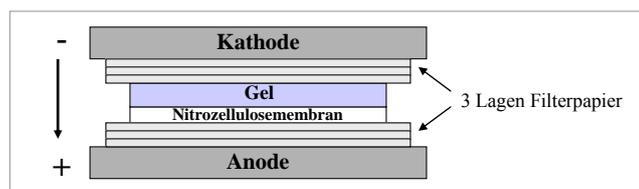


Abb. 5.5 Versuchsaufbau des *semi-dry*-Blot-Systems

(3) Immunologischer Proteinnachweis

Die freien Bindungsstellen der Membran werden durch 45-minütige Inkubation in Blockingpuffer geblockt. Danach erfolgte die Markierung von HO-1 und β -Aktin durch Inkubation mit den entsprechenden Primärantikörpern (jeweils 1:1000 verdünnt) über Nacht bei 4°C unter kontinuierlichem Schütteln. Nach gründlichem Waschen der Membran in Waschpuffer wurde sie in einem zweiten Schritt mit den Sekundärantikörpern (1:10 000 verdünnt) gegen Maus- bzw. Kaninchen-Fc-Region unter Lichtabschluss 45 min lang inkubiert. Die

Sekundärantikörper waren mit einem Infrarot-Farbstoff konjugiert. Die Messung und Auswertung der Dichte der einzelnen Banden erfolgt am Li-Cor Infrarot Imager mit der Odyssey Application Software.

Für die ersten Versuche wurden jedoch mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierte Sekundärantikörper verwendet. HRP katalysiert die Oxidierung von mehreren Luminolmolekülen, die daraufhin, mit einem Film detektierbare, Lumineszenzen emittieren (ECL = Enhanced Chemilumineszenz). In einer Hyperkassette erfolgte die Schwärzung des Films, der dann in der Dunkelkammer entwickelt wurde.

5.4 Molekularbiologische Methoden

5.4.1 Nukleofektion mit siRNA

Small interfering RNAs (siRNAs) gehören zur Gruppe kleiner (20-25 Nukleotide) RNAs, die durch Dicer (Ribonukleasen) im Zytoplasma aus doppelsträngigen mRNAs herausgeschnitten werden und wichtige, regulatorische Funktionen ausüben (z. B. Apoptose, Zellteilung). Sie können aber auch, wie in unserem Fall, synthetisch hergestellt und in die Zielzellen zur Blockierung der Translation einzelner Proteine transferiert werden.

Die siRNA bildet mit mehreren Proteinen einen RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC). Dieser bindet die komplementäre Ziel-mRNA, kann dadurch mit seinen RNA-Helikase-Nuklease-Fähigkeiten die Ziel-mRNA entfalten und für intrazelluläre Nukleasen zugänglich machen. Somit wird die einzelne mRNA abgebaut, wodurch die Translation und Expression des korrespondierenden Proteins verringert oder verhindert wird (siehe Abb. 5.6).

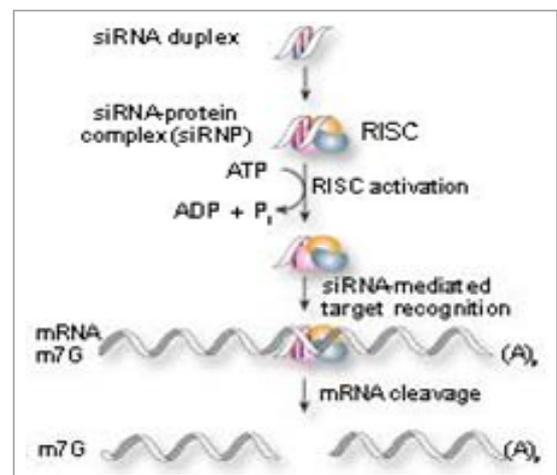


Abb. 5.6 Wirkung von siRNAs [91]

Prinzip der Nukleofektion

Die Nukleofektion zählt zu den physikalischen Gentransfermethoden, mit Hilfe derer es gelingt, kleine Substrate wie z. B. DNA oder RNA in Zellen einzuschleusen. Durch einen kurzen

elektrischen Impuls wird eine kurzfristige Depolarisierung der Zellmembran hervorgerufen, was zur Bildung kleiner Poren in der Membran führt. Die Substrate gelangen dadurch sowohl ins Zytoplasma als auch in den Zellkern. Im Gegensatz zur Elektroporation spielen bei der Nukleofektion spezielle, Zelltyp abhängige Puffersysteme eine entscheidende Rolle, die das Einschleusen der Substrate in die Zelle und schließlich auch in den Zellkern bewirken. Ein Problem dieser für die Zellen stark invasiven Methode ist, dass es nach der Nukleofektion zu geringerem Überleben der Monozyten kommt, weshalb ein spezielles, vom Hersteller empfohlenes Nukleofektions-Medium zur Inkubation nach der Transfektion verwendet wurde.

Die Versuche wurden mit dem Human Monocyte Nucleofector[®] Kit entsprechend des Protokolls von Amaxa-Biosystems unter Verwendung des Y-001-Programms durchgeführt. Dabei wurden jeweils 1×10^7 CD14-positiv-selektierte Monozyten mit synthetischer siRNA zur Unterdrückung der Hämoxygenase-1, mit einer wirkungslosen Kontroll-siRNA oder ohne RNA transfiziert. Die Erfolgskontrolle des HO-1-Knock-down erfolgte mittels Western Blot (siehe Kapitel 6.2.7). Die Zellen wurden nach der Nukleofektion direkt mit einer Konzentration von 4×10^5 Monozyten pro *well* auf eine 96-*well*-Platte pipettiert. Die Inkubation mit IL-10 erfolgte erst am nächsten Tag, um den Zellen eine Erholungsphase zu ermöglichen. Da erfahrungsgemäß nicht alle Zellen nach der Nukleofektion überleben und auch durch die einen Tag längere Inkubation höhere Zellmortalitätsraten auftreten, wurde eine höhere Zellkonzentration für den Komplementlyse-Test gewählt. Entsprechend wurden für die Proben mit der Positivkontrolle für den IL-10-Effekt nur 3×10^5 nicht-transfizierte Zellen pro *well* aufgetragen.

5.5 Statistische Auswertungen

Für alle Calcein-Assay-Experimente wurden von jeder Probe Triplets pipettiert und jeweils der Mittelwert des Triplets als Ergebnis für ein Experiment verwendet, um die Varianz innerhalb des Versuches zu senken. Es wurden für jeden Versuchsansatz mehrere Experimente (Anzahl = n) durchgeführt, wobei die Ergebnisse von n Versuchen als Mittelwert und als jeweiliger Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt sind. Die statistische Auswertung erfolgte für alle Versuche mit einem Stichprobenumfang von mindestens $n = 5$ mit dem zweiseitigen Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben. Da mit $n = 5$ oftmals eine Gaußsche Normalverteilung nicht nachweisbar war, wurde nicht der häufig benutzte *student-t-test* verwendet, für den die Gaußsche Verteilung Voraussetzung ist. Bei einem $p < 0,05$ wurden die Ergebnisse als statistisch signifikant betrachtet.

6 Ergebnisse

6.1 Regulation der Komplementlyse durch IL-10

6.1.1 IL-10 schützt Monozyten vor Komplementlyse

In einer entzündlichen Umgebung sind Makrophagen vermehrt Komplementfaktoren ausgesetzt. Da diese nicht nur auf fremde Erreger lytisch wirken, liegt die Vermutung nahe, dass Makrophagen durch Regulation eigener Proteine im Verlauf einer Entzündung zusätzliche Resistenzmechanismen gegen Komplementlyse entwickeln. Ein im Entzündungsprozess besonders auf Monozyten/Makrophagen wirkendes Zytokin ist Interleukin-10, das zur Auflösung der Entzündung beiträgt. Aus Genprofiling-Analysen, die in Kooperation mit Bayer Schering Pharma durchgeführt wurden, ist bekannt, dass einige Komplement-regulierende Faktoren durch IL-10 in der Expression beeinflusst werden, so z. B. CD59. Dies suggeriert eine mögliche Beeinflussung der Komplementlyse durch IL-10.

In der Tat konnte mit Hilfe eines Life/Dead-Stainings im FACS und des Calcein-Tests gezeigt werden, dass Monozyten durch IL-10 vermehrt vor Komplementlyse geschützt sind [66]. Zur Sicherung und Bestätigung der Hypothese, wurde der bereits vorbereitete Komplementlyse-Assay teilweise übernommen und weiter optimiert. Zunächst wurde die Komplementlyse mit einem MHC-I-Antikörper über den Klassischen Weg aktiviert. MHC-I-Moleküle befinden sich in hoher Dichte auf Monozyten/Makrophagen, so dass die für die Komplementaktivierung erforderliche Vernetzung von zwei gebundenen MHC-I-Antikörpern durch ein C1q-Protein zustande kam.

CD14-positive Zellen (Monozyten) wurden mittels MACS aus PBMCs isoliert und über Nacht mit oder ohne IL-10 inkubiert. Nach Markierung mit Calcein erfolgte die Beladung der Zellen mit MHC-I-Antikörpern. Nicht aufgenommenes Calcein und nicht gebundene Antikörper wurden ausgewaschen, um möglichst effizient durch Zugabe von 50 % Kaninchenserum für 90 min die Komplementlyse zu induzieren. Als Negativkontrolle diente inaktiviertes Serum (auch 50 %). Das in den Überstand freigesetzte, fluoreszierende Calcein wurde im Spektrometer gemessen und korreliert mit der Anzahl lysierter Zellen. Alle Werte sind prozentual auf die Totallyse mit Triton bezogen. Die spezifische Komplementlyse berechnet sich aus der Differenz der Fluoreszenzwerte des Überstandes von Zellen, die mit aktivierbarem Serum inkubiert wurden und Zellen, die mit inaktiviertem Serum inkubiert wurden. Somit wird eine Verfälschung der

Ergebnisse durch unspezifisches Sterben oder Lysieren der Zellen vermindert. Dieser Versuchsaufbau und die Komplementlyse-Berechnung wurden grundlegend für alle Versuche beibehalten und nur durch Verwendung zusätzlicher Substanzen, anderer Zellen oder Austausch von Lyse-induzierenden Substanzen modifiziert (siehe auch Abb. 5.2).

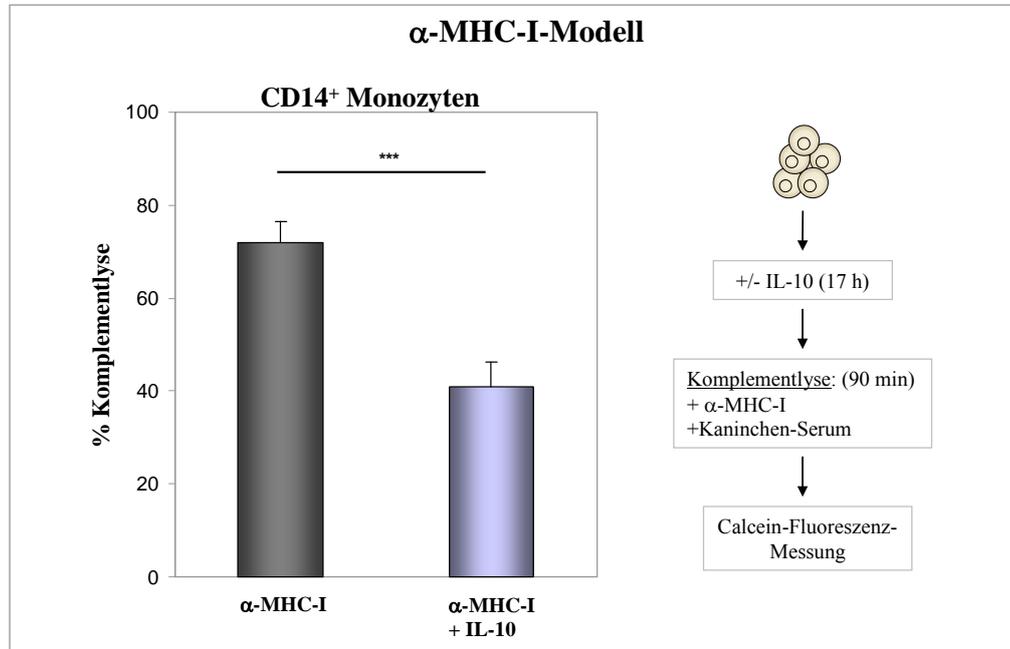


Abb. 6.1 IL-10 schützt Monozyten vor Komplementlyse

Frisch isolierte und CD14-positiv-selektierte Monozyten wurden mit oder ohne IL-10 (10 ng/ml) für 17 h inkubiert. Danach folgten der Komplementlyseassay mit 2 μ g/ml MHC-I-Antikörpern und Kaninchenserum sowie die Detektion der Zelllyse mittels Calceinfluoreszenzmessung. Die Messwerte wurden prozentual zur Totallyse mit Triton ins Verhältnis gesetzt. Die Komplementlyse ergibt sich nun aus der Differenz der Lyse von aktivem Komplement enthaltenem Serum und inaktiviertem Serum. Dargestellt sind die Ergebnisse von 18 unabhängigen Blutspendern als Mittelwert, wobei die Standardfehler der Mittelwerte als Fehlerbalken angezeigt sind. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem zweiseitigen Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben und ist als Sternchen angegeben (***) $p < 0,001$.

In der Abbildung 6.1 ist deutlich erkennbar, dass Zellen nach IL-10-Inkubation eine signifikant ($p < 0,001$) geringere Zelllyse aufweisen als Zellen ohne weitere Stimulation. Die Komplementlyse von unbehandelten Monozyten der 18 Probanden schwankt zwischen 43 % und 100 %. Durch Inkubation mit IL-10 wird im Durchschnitt eine ca. 45 %ige Reduktion der über den klassischen Weg aktivierten Zelllyse erreicht.

In Vorversuchen wurde gezeigt, dass bei Zugabe von Isotyp-Kontroll-Antikörpern und aktivierbarem Serum, nur eine geringe Zelllyse auftrat. Des Weiteren war mit steigender MHC-I-Antikörperkonzentration auch eine Steigerung der Zelllyse zu beobachten, die bei 1 μ g/ml eine Sättigung erreichte [66].

Ich habe den IL-10-Schutz vor Komplementlyse mit einer zweiten Methode überprüft. So ließ sich auch mit einer Propidium-Iodid-Färbung in der Durchflusszytometrie eine Reduzierung

durch Komplement-lysierter Zellen nach IL-10-Inkubation feststellen (Daten nicht gezeigt). Jedoch ist bei dieser Methode zu befürchten, dass einige, lysierte Zellen schon so stark fragmentiert und zerstört sind, dass sie vom FACS-Gerät nicht mehr als Zelle identifiziert werden können und somit das Ergebnis verzerren würden. Deshalb wurden alle weiterführenden Versuche mit der Calcein-Methode fortgesetzt.

Der IL-10-Effekt wäre theoretisch auch über eine verminderte Expression von MHC-I-Proteinen durch IL-10 zu erklären, da die Bindung einiger weniger MACs auf der Zellmembran einer kernhaltigen Zelle nicht notwendigerweise die Lyse der betroffenen Zelle zur Folge haben muss [40, 92]. In der Literatur gibt es dazu sich widersprechende Angaben. Für U937-Zellen, eine monozytäre Zelllinie, und über Adhärenz selektierte humane Monozyten wurde gezeigt, dass IL-10 die Oberflächenexpression von MHC-I geringfügig vermindert [93, 94]. Allerdings zeigten Spittler *et al.* eine klare Steigerung der MHC-I-Expression auf Monozyten [95]. Auch in dieser Arbeit wurde mittels FACS-Analyse die MHC-I-Oberflächenexpression an Monozyten mit bzw. ohne 17-stündiger IL-10-Inkubation untersucht. Dabei zeigten sich nur marginale Veränderungen der MHC-I-Expression in beide Richtungen (Daten nicht gezeigt). Dass dadurch jedoch der sehr deutliche und ausgeprägte IL-10-Effekt erklärbar ist, erscheint unwahrscheinlich. Jedenfalls habe ich versucht den IL-10-Effekt durch ein anderes, MHC-I unabhängiges System nachzuweisen.

Die Induktion der Komplementlyse sollte nun durch opsonisiertes Zymosan, ein Bestandteil der Zellwand von Hefen, erfolgen. Ein weiterer Grund für die Verwendung von Zymosan war, dass die Auslösung der Komplementlyse durch Phagozytose des Zymosans während einer Infektion mehr den physiologischen Abläufen *in vivo* entspricht. Im Gegensatz dazu sind Autoantikörper (hier MHC-I) eher nur in speziellen klinischen Situationen von Bedeutung. Unserer Meinung nach, müsste während der Phagozytose von Zymosan ein erhöhtes Risiko für die Bildung von MACs (membrane-attack complexes) an der Zellmembran von Monozyten bestehen. Denn mit der Bindung des opsonierten Zymosans, an dem die Komplementaktivierung erfolgt, besteht eine unmittelbare Nähe zur Zelloberfläche der phagozytierenden Zellen. Deshalb wurden Monozyten anstelle von MHC-I-Antikörpern opsoniertem Zymosan ausgesetzt und dann mit Kaninchenserum inkubiert.

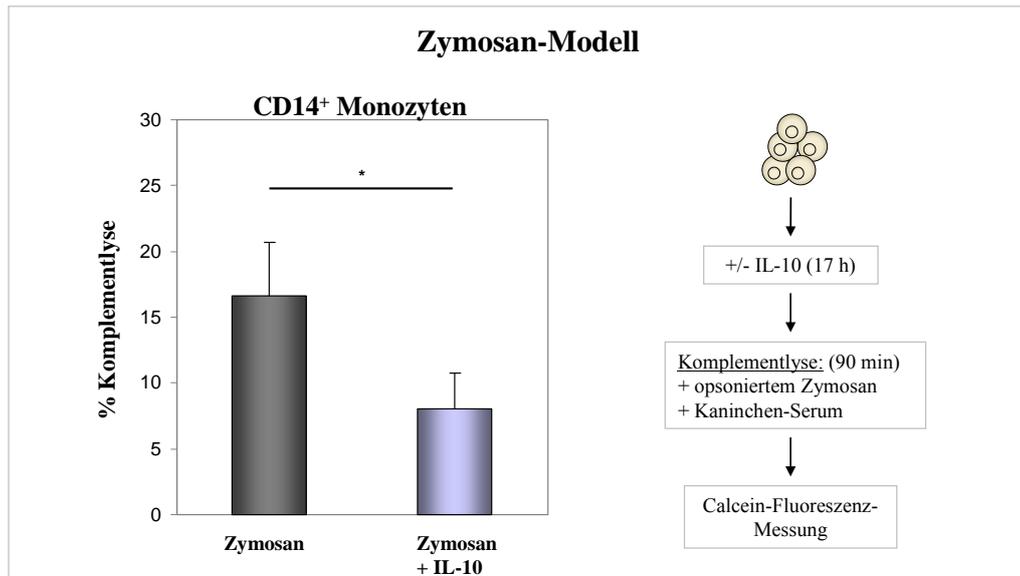


Abb. 6.2 IL-10 schützt Monozyten vor Komplementlyse während der Phagozytose

Frisch isolierte und CD14-positiv-selektierte Monozyten wurden mit oder ohne IL-10 (10 ng/ml) für 17 h inkubiert. Danach folgten der Komplementlyseassay mit opsoniertem Zymosan und Kaninchenserum sowie die Detektion der Zellyse mittels Calceinfluoreszenzmessung. Die Messwerte wurden prozentual zur Totallyse mit Triton ins Verhältnis gesetzt. Die Komplementlyse berechnet sich aus der Differenz der Lyse von aktivem Komplement enthaltendem Serum und inaktiviertem Serum. Dargestellt sind die Ergebnisse von 5 unabhängigen Blutspendern als Mittelwert, wobei die Standardfehler der Mittelwerte als Fehlerbalken angezeigt sind. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem zweiseitigen Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben und ist als Sternchen angegeben (* $p < 0,05$).

Mit Zymosan kann man ebenso deutlich und statistisch signifikant erkennen, dass Monozyten durch IL-10 vermehrt vor Komplementlyse geschützt werden (siehe Abb. 6.2). Insgesamt ist die Anzahl lysierter Zellen ohne IL-10-Stimulation wesentlich geringer (durchschnittlich 16 %) als nach MHC-I-Inkubation. Der IL-10-Schutz war mit ca. 50 % jedoch ebenso stark ausgeprägt. Weiterhin bestätigt sich die Unabhängigkeit des IL-10-Effektes von möglichen MHC-I-Expressionsveränderungen.

6.1.2 Interleukin-10 schützt auch Makrophagen, nicht aber Lymphozyten vor Komplementlyse

Wir stellten uns nun die Frage, ob nicht auch andere Zellen des Immunsystems durch IL-10 verstärkt vor dem Komplementsystem geschützt werden. Da Makrophagen insbesondere im Verlauf einer Infektion aus Monozyten differenzieren und zu den am meisten an der Phagozytose beteiligten Zellen gehören, war es nahe liegend, zunächst Makrophagen zu untersuchen. Gleichmaßen waren für uns auch Lymphozyten von Interesse, da sie eine weitere große Population des Immunsystems darstellen. So wurden CD14-positiv-selektierte Monozyten

durch 6-tägige Stimulation mit M-CSF zu Makrophagen generiert. Diese und CD14-negative PBMCs (Separation mittels MACS) wurden dann über Nacht in An- oder Abwesenheit von IL-10 inkubiert. Danach erfolgte der Komplementlyse-Assay mit MHC-I-Antikörpern wie in den vorher beschriebenen Experimenten. Die Differenzierung der Makrophagen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie kontrolliert (siehe Abb. 5.4).

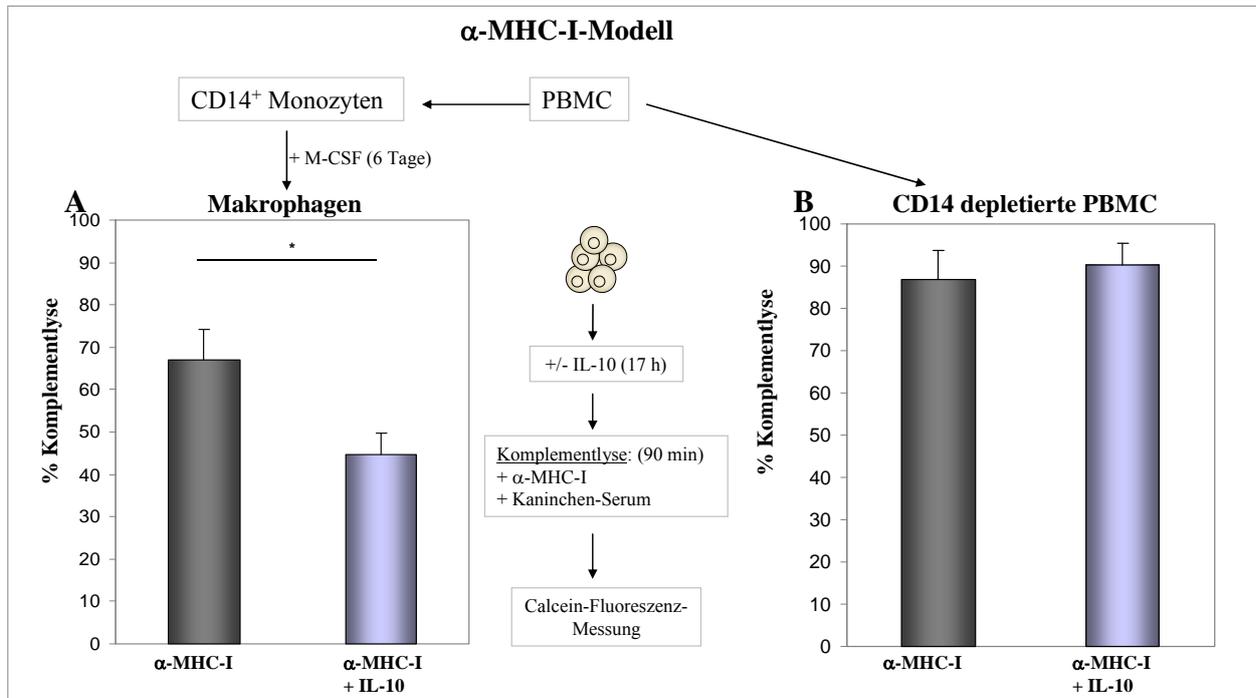


Abb. 6.3 IL-10 schützt auch Makrophagen, nicht aber Lymphozyten vor Komplementlyse

Die Makrophagendifferenzierung erfolgte durch Inkubation von CD14-positiv-selektierten Monozyten mit M-CSF über 6 Tage. Makrophagen und CD14-negativ-selektierte PBMCs wurden mit oder ohne IL-10 (10 ng/ml) für 17 h inkubiert. Danach folgten der Komplementlyseassay mit MHC-I-Antikörpern und Kaninchen-Serum sowie die Detektion der Zellyse mittels Calceinfluoreszenzmessung. Die Messwerte wurden prozentual zur Totallyse mit Triton ins Verhältnis gesetzt. Die Komplementlyse ergibt sich aus der Differenz der Lyse von aktivem Komplement enthaltendem Serum und inaktiviertem Serum. Dargestellt sind die Ergebnisse von 10 (A) bzw. 3 (B) unabhängigen Blutproben als Mittelwert, wobei die Standardfehler der Mittelwerte als Fehlerbalken angezeigt sind. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem zweiseitigen Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben und ist als Sternchen angegeben (* $p < 0,05$).

Wie erwartet, lässt sich der durch IL-10 induzierte Schutz vor Komplementlyse in ähnlicher Ausprägung auch bei Makrophagen nachweisen (siehe Abb. 6.3). Im Gegensatz dazu zeigen Lymphozyten keine Reduktion der Komplementlyse durch IL-10 (87 % versus 90 % Lyse). Dabei ist sicherlich nicht auszuschließen, dass kleine Subpopulationen der Lymphozyten, wie beispielsweise regulatorische T-Zellen, doch durch IL-10 vermehrt vor Komplementlyse geschützt sein werden.

6.2 Welches ist der zugrunde liegende Mechanismus für den Schutz vor Komplementlyse durch IL-10?

6.2.1 IL-10 steigert die CD59-Expression von Monozyten

CD59, auch Protektin genannt, ist ein auf allen Zellen vorhandenes Membranprotein, welches die Bildung und Durchlässigkeit von MACs (membrane-attack complexes) hemmt und somit eigene Zellen vor Komplementlyse schützt [34]. Des Weiteren ist bekannt, dass IL-10 mehrere den Komplementschutz verstärkende Gene induziert. Von diesen ist CD59 eines der auf mRNA-Ebene am stärksten hochregulierten Proteine [66]. Daher versuchten wir die Hochregulation von CD59 auf Proteinebene mit Hilfe der Durchflusszytometrie zu bestätigen. CD14-positiv-selektierte Monozyten wurden nach Stimulation mit oder ohne IL-10 mit CD59-FITC- und CD14-APC-Antikörpern gefärbt. Im Anschluss erfolgte die Messung der Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie. Abb. 6.4 zeigt einen repräsentativen Versuch von vier Experimenten.

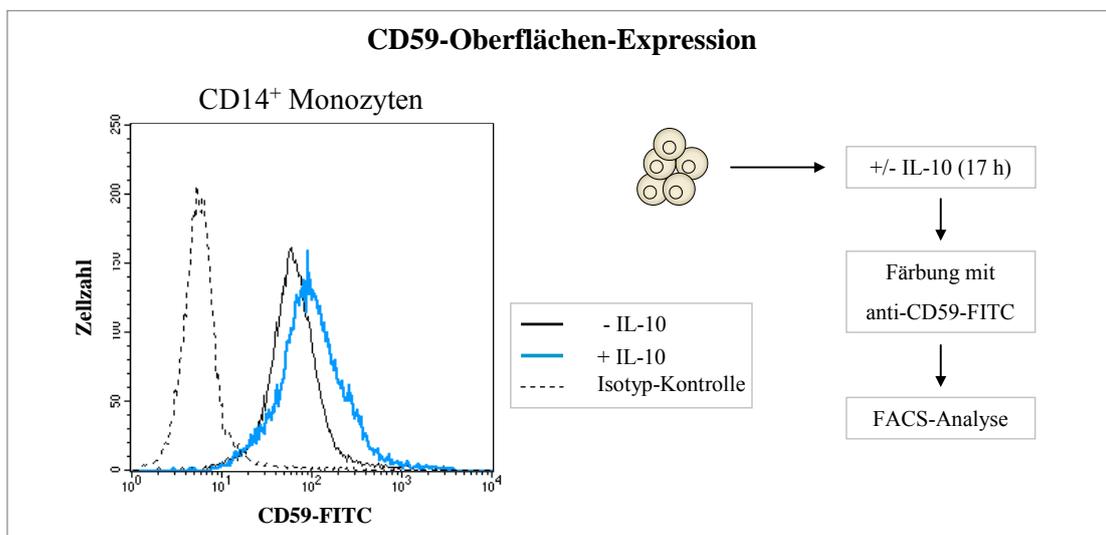


Abb. 6.4 IL-10 steigert die CD59-Expression von Monozyten

CD14-positiv-selektierte Monozyten wurden nach Inkubation mit oder ohne IL-10 (17 h) mit CD14-APC und CD59-FITC bzw. FITC-Isotyp-Antikörpern gefärbt und im FACS gemessen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch als Überlagerungshistogramm, wobei nur CD14-positive Zellen berücksichtigt wurden.

In der Auswertung wurden nur CD14-positive Zellen (den Monozyten entsprechend) berücksichtigt und als Überlagerungshistogramm bezüglich der CD59-Fluoreszenzintensität dargestellt. Nach 17 h IL-10-Behandlung, wird deutlich, dass Monozyten vermehrt CD59 auf ihrer

Oberfläche exprimieren. Es könnte demnach sein, dass die Hochregulation von CD59 für den Komplementschutz durch IL-10 zumindest teilweise verantwortlich ist.

6.2.2 CD59 vermittelt nicht den IL-10 induzierten Schutz vor Komplementlyse

Nachdem eine Hochregulation der CD59-Oberflächenproteine bei Monozyten nachgewiesen werden konnte, sollte weiterführend untersucht werden, ob dies die Ursache für den Komplementschutz durch IL-10 ist. In diesem Fall müssten CD59-blockierende Antikörper den IL-10-Effekt aufheben können. Es wurde wieder der Komplementlyse-Assay mit CD14-positiv-selektierten Monozyten nach Stimulation über Nacht mit und ohne IL-10 durchgeführt. Gleichzeitig mit den MHC-I-Antikörpern wurden jedoch auch Antikörper hinzugegeben, die CD59 auf der Zelloberfläche binden und seine Funktion blockieren [96]. Der Komplement-Assay wurde außerdem dahingehend verändert, dass anstelle von Kaninchenserum nun humanes Serum verwendet wurde. Diese Modifikation war notwendig, da viele Komplementregulatoren, wie auch CD59, nur Spezies-spezifisch wirken [97].

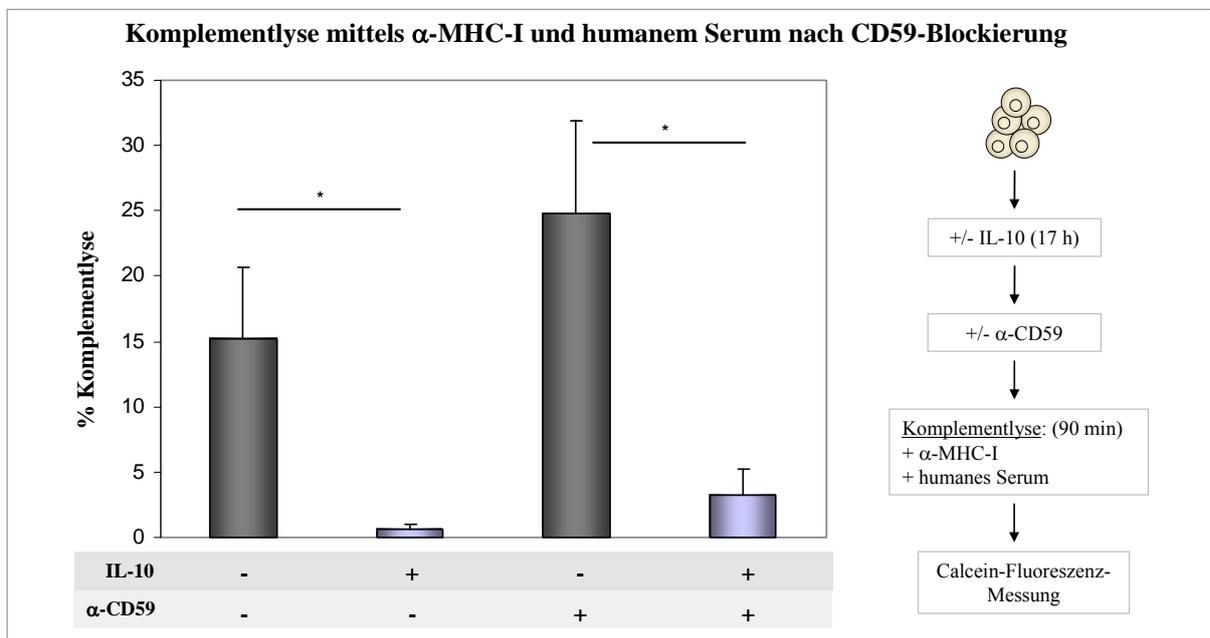


Abb. 6.5 CD59 ist nicht verantwortlich für den IL-10 induzierten Schutz vor Komplementlyse

Frisch isolierte und CD14-positiv-selektierte Monozyten wurden mit oder ohne IL-10 (10 ng/ml) für 17 h inkubiert. Danach folgte der Komplementlyse-Assay mit MHC-I-Antikörpern und gleichzeitiger Zugabe von CD59-Antikörpern. Aufgrund der Speziespezifität von CD59 wurde humanes Serum verwendet. Die Messwerte der Calceinfluoreszenz wurden prozentual zur Totallyse mit Triton ins Verhältnis gesetzt. Die Komplementlyse ergibt sich nun aus der Differenz der Lyse von aktivem Komplement enthaltendem Serum und inaktiviertem Serum. Dargestellt sind die Ergebnisse von fünf unabhängigen Versuchen als Mittelwert, wobei die Standardfehler der Mittelwerte als Fehlerbalken angezeigt sind. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem zweiseitigen Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben und ist als Sternchen angegeben (* $p < 0,05$).

Zunächst ist in Abbildung 6.5 auffällig, dass bei geringerer Gesamtlyse mit humanem Serum gegenüber Kaninchenserum der Schutz durch IL-10 umso ausgeprägter ist. Dabei beträgt die Reduktion der Lyse durch IL-10 mehr als 90 %. Die um durchschnittlich 67 % signifikant ($p < 0,05$) erhöhten Lysewerte von Zellen mit anti-CD59-Inkubation gegenüber denen ohne CD59-Inkubation belegen die blockierende Wirkung der CD59-Antikörper. Ferner wird damit die vor Komplement schützende Funktion von CD59 bestätigt. Dennoch besteht ein klarer und signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten und mit IL-10 stimulierten Monozyten, unabhängig von der CD59-Blockierung ($p < 0,05$), wobei die Reduktion der Lyse in beiden Fällen ähnlich stark ausgeprägt ist. Das zeigt, dass der Schutz vor Komplementlyse durch IL-10 nicht nur durch eine Hochregulation von CD59-Oberflächenmolekülen hervorgerufen sein kann.

6.2.3 Endozytose-Inhibitoren können den IL-10-Effekt nicht aufheben

In der Literatur ist beschrieben, dass sich U937-Zellen (monozytäre Zelllinie) vor Komplementlyse schützen können, indem sie MACs (membrane-attack complexes) von ihrer Zelloberfläche eliminieren [98]. Das geschieht durch Bildung und Abschnürung von Membranvesikeln, die mit MACs beladen sind, nach intra- (Endozytose) oder extrazellulär (Exozytose) [99].

Zur Überprüfung, ob der Schutz vor Komplementlyse durch IL-10 vielleicht auf eine erhöhte Endo- oder Exozytoseaktivität zurückzuführen ist, wurde zusätzlich Latrunculin B im Komplementlyse-Assay eingesetzt. Latrunculin B zerstört die Organisation von Aktin-Mikrofilamenten und hemmt somit sowohl endozytotische als auch exozytotische Prozesse [100]. Den CD14-positiv-selektierten Monozyten wurden zum Zeitpunkt der MHC-I-Gabe zusätzlich 50 μ M Latrunculin zugesetzt. Ansonsten erfolgten IL-10-Stimulation und Komplementlyse-Assay mit Kaninchenserum analog den vorherigen Versuchen. Abb.6.6 zeigt ein repräsentatives Experiment von zwei Einzelversuchen.

Durch die Zugabe von Latrunculin B steigt insgesamt die Anzahl lysierter Zellen von 56 % auf 90 %. Das spricht dafür, dass Latrunculin B erwartungsgemäß die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Komplementlyse erhöht. Allerdings bleibt bei Inkubation mit IL-10 trotzdem ein deutlicher, vor Komplement schützender Effekt erhalten mit einer Reduktion der Komplementlyse um 52 %. Folglich scheinen endo- oder exozytotische Prozesse nicht für den IL-10-Effekt verantwortlich zu sein.

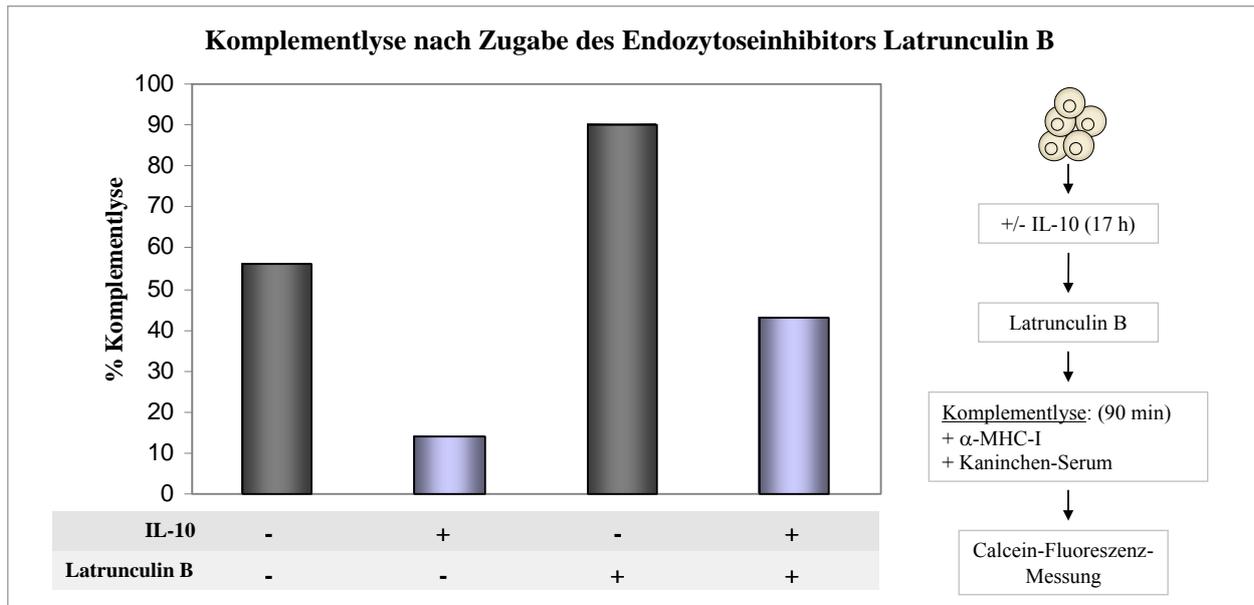


Abb. 6.6 Endozytose-Inhibitoren heben den IL-10-Effekt nicht auf

Frisch isolierte und CD14-positiv-selektierte Monozyten wurden mit oder ohne IL-10 (10 ng/ml) für 17 h inkubiert. Nach Zugabe von Latrunculin B (50 μ M) wurde sogleich der Komplementlyse-Assay mit MHC-I-Antikörpern und Kaninchenserum durchgeführt. Die Messwerte der Calceinfluoreszenz wurden prozentual zur Totallyse mit Triton ins Verhältnis gesetzt. Die Komplementlyse ergibt sich nun aus der Differenz der Lyse von aktivem Komplement enthaltendem Serum und inaktiviertem Serum. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von zwei Experimenten.

6.2.4 HO-1 Induktion durch IL-10 in Monozyten

Hämoxygenase-1 (HO-1) ist ein Hitzeschockprotein (Hsp32) mit stark zellprotektiven Eigenschaften. In Xenotransplantations-Modellen und dem Forssmann-Anaphylaxis-Modell in Meerschweinchen konnte für HO-1 bzw. seinem Abbauprodukt Bilirubin ein Schutz vor Komplementlyse nachgewiesen werden [81, 101]. Ferner wurde gezeigt, dass HO-1 in Maus-Makrophagen, in humanen Monozyten und humanen Makrophagen durch IL-10 hochreguliert wird [67, 102].

Abgesehen von der IL-10-induzierten Hochregulation von HO-1 auf mRNA-Ebene [66], konnte die ausgeprägte IL-10-abhängige HO-1-Induktion bei Monozyten mit der Western Blot Analyse nachgewiesen werden. Dafür wurden mit Hilfe von magnetischen CD14-Beads Monozyten und CD14-negative PBMCs separiert und jeweils mit oder ohne IL-10 17 Stunden stimuliert. Die Proteine der Zellen wurden dann mit Hilfe der Western Blot Methode elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. HO-1 und auch β -Aktin zur Ladungskontrolle wurden mittels Enhanced Chemilumineszenz (ECL) nachgewiesen.

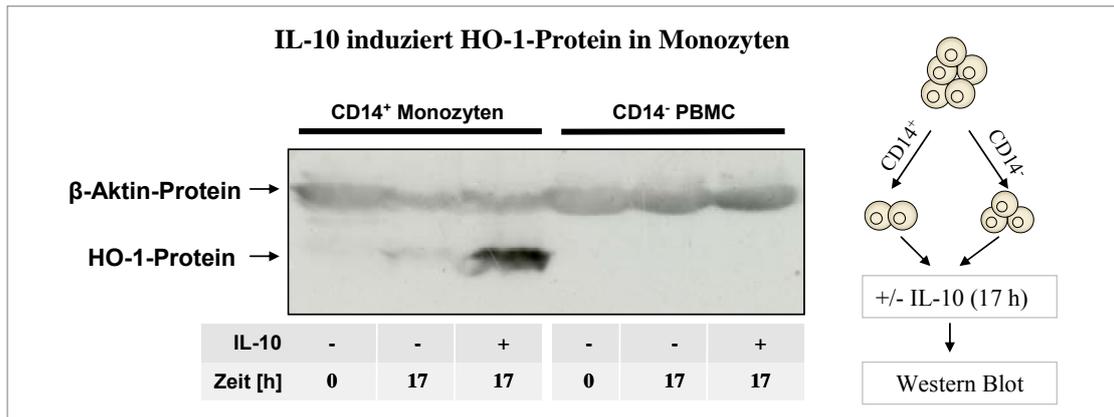


Abb. 6.7 IL-10 steigert die HO-1-Protein-Expression in Monozyten

Frisch isolierte PBMCs wurden mittels MACS in CD14-positive Zellen (Monozyten) und in CD14-negative Zellen (Lymphozyten) aufgetrennt und für 0 h bzw. 17 h mit oder ohne IL-10 (10 ng/ml) inkubiert. Daraufhin erfolgte die Western Blot Analyse für HO-1 und β -Aktin (Ladungskontrolle). Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von drei Experimenten.

Es ist in Abbildung 6.7 deutlich zu erkennen, dass durch Zugabe von IL-10 bei Monozyten eine ausgeprägte HO-1-Induktion auf Proteinebene stattfindet. Interessanterweise konnte bei CD14-negativ-selektierten PBMCs (überwiegend Lymphozyten) keine Steigerung der HO-1-Proteinexpression nachgewiesen werden. IL-10 kann demnach in Monozyten HO-1 induzieren und auch Monozyten vor Komplement schützen, wohingegen bei Lymphozyten durch IL-10 weder eine HO-1-Induktion erfolgte noch ein Schutz vor Komplementlyse nachzuweisen war (siehe auch Abb. 6.3). Aufgrund dieser Ergebnisse und der in der Literatur beschriebenen Komplementresistenz HO-1 exprimierender Zellen, erschien es uns möglich, dass HO-1 für den IL-10 Schutz von entscheidender Bedeutung sein könnte.

6.2.5 SnPP, ein HO-1-Inhibitor, scheint den IL-10-Effekt aufzuheben

Für die Erforschung, ob HO-1 im Komplementschutz-Mechanismus von IL-10 eine Rolle spielt, ist es erforderlich, HO-1 gezielt auszuschalten und zu überprüfen, ob dies zur Aufhebung des IL-10-Effektes führt. Deshalb wurde der irreversible HO-1-Inhibitor Zinn-Proto-Porphyrin (SnPP) verwendet, der HO-1 bindet und die enzymatische Aktivität hemmt. Zunächst erfolgte per FACS-Analyse der Ausschluss, dass SnPP die MHC-I-Expression auf Monozyten beeinflusst. Dafür wurden Monozyten über Nacht mit oder ohne SnPP inkubiert und anschließend mit CD14-APC- und MHC-I-FITC bzw. FITC-Isotyp-Antikörpern gefärbt, fixiert und im FACS gemessen.

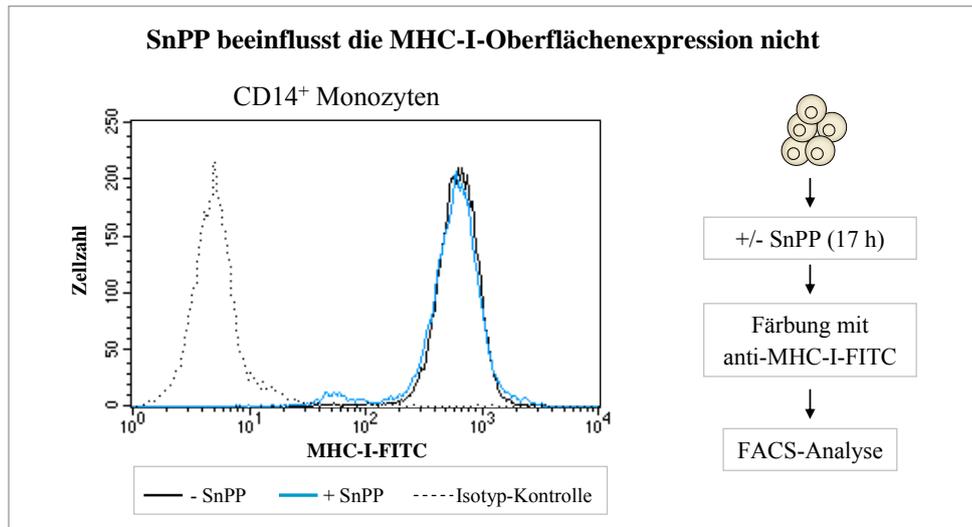


Abb. 6.8 SnPP beeinflusst nicht die MHC-I-Oberflächenexpression

CD14-positiv-selektierte Monozyten wurden nach Inkubation mit oder ohne SnPP (17 h) mit CD14-APC- und MHC-I-FITC- bzw. FITC-Isotyp-Antikörpern gefärbt und im FACS gemessen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch als Überlagerungshistogramm, wobei nur CD14-positive Zellen berücksichtigt wurden.

Die Abbildung 6.8 zeigt klar, dass SnPP die Anzahl der MHC-I-Moleküle auf Monozyten nicht beeinflusst. Demnach stand der Aktivierung des Komplementsystems durch MHC-I-Antikörper zur Untersuchung der SnPP-Wirkung nichts entgegen.

Es wurden CD14-positiv-selektierte Monozyten nicht nur mit oder ohne IL-10, sondern auch gleichzeitig mit oder ohne SnPP über Nacht inkubiert. Komplementlyse-Test mit Kaninchenserum und Detektion der Zellyse mittels Calcein erfolgten im Anschluss. In Abbildung 6.9 ist die Zusammenfassung von 16 Experimenten dargestellt. Dabei ist ein deutlicher Komplementschutz zwischen mit IL-10 behandelten und unstimulierten Zellen erkennbar ($p < 0,001$). Wurde jedoch zu den Zellen neben IL-10 auch SnPP dazugegeben, kam es zu einer Abnahme des Schutzes vor Komplementlyse ($p < 0,01$). Letztendlich ist bei SnPP-behandelten Monozyten kein signifikanter Unterschied mehr in der Komplementlyse zwischen mit IL-10 behandelten oder unbehandelten Zellen erkennbar (im Durchschnitt 63 % versus 59 % Komplementlyse). Das heißt, der Einsatz von SnPP konnte den IL-10-Effekt fast vollständig aufheben, weshalb angenommen wurde, dass die Erhöhung der HO-1-Expression in Monozyten den durch IL-10 hervorgerufenen Komplementschutz verursacht.

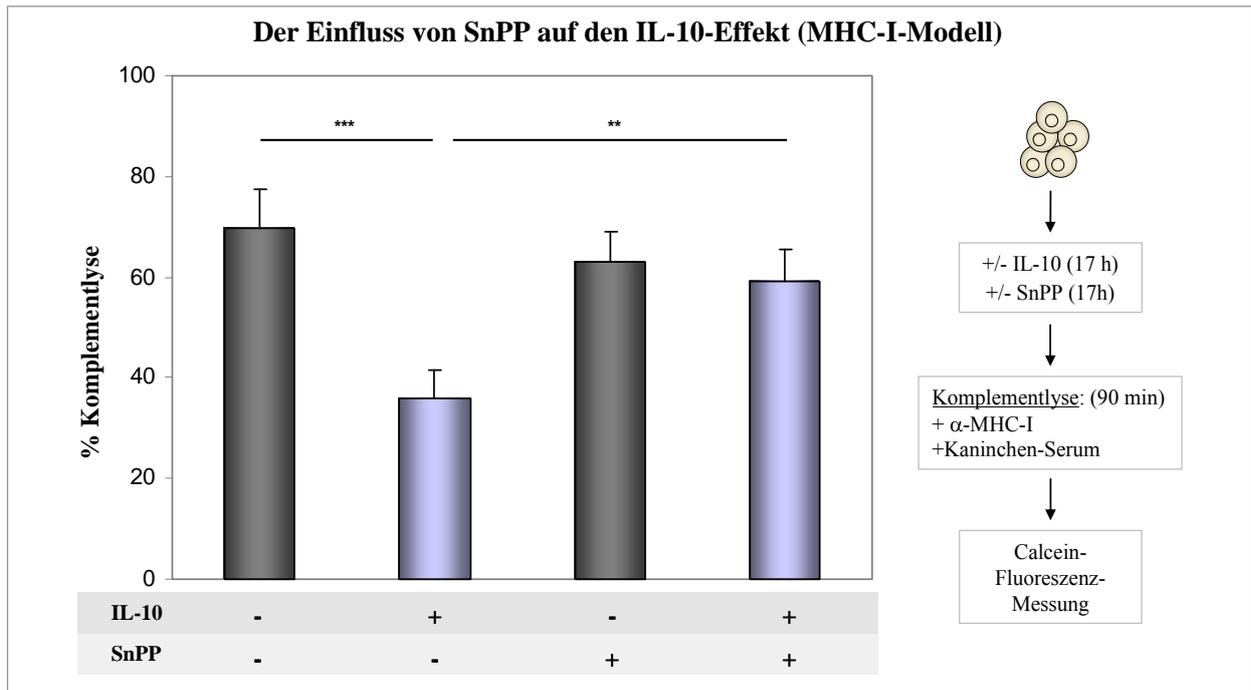


Abb. 6.9 SnPP hebt den IL-10-Effekt auf

Frisch isolierte und CD14-positiv-selektierte Monozyten wurden mit oder ohne IL-10 (10 ng/ml) für 17 h inkubiert. Zum gleichen Zeitpunkt der IL-10-Zugabe wurde zu der Hälfte der Proben SnPP (20 μ M) hinzugefügt. Der Komplementlyseassay erfolgte mit MHC-I-Antikörpern und Kaninchenserum. Die Messwerte der Calcein-fluoreszenz wurden prozentual zur Totallyse mit Triton ins Verhältnis gesetzt. Die Komplementlyse berechnet sich aus der Differenz der Lyse von aktivem Komplement enthaltendem Serum und inaktiviertem Serum. Dargestellt sind die Ergebnisse von 16 unabhängigen Versuchen als Mittelwert, wobei die Standardfehler der Mittelwerte als Fehlerbalken angezeigt sind. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem zweiseitigen Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben und ist als Sternchen angegeben (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

6.2.6 HO-1-Suppression durch siRNA kann den IL-10-Effekt nicht aufheben

Um mit einer weiteren Methode zu bestätigen, dass HO-1 für den IL-10-Schutz vor Komplementlyse in Monozyten verantwortlich ist, wurde später mittels RNA-Interferenz HO-1 in Monozyten ausgeschaltet und anschließend der Komplementlyse-Assay durchgeführt. Dazu wurden am Tag 1 CD14-positive Zellen nach der Selektion im Amaxa-Nukleofektions-Gerät mit HO-1-siRNA transfiziert und unmittelbar nach der Transfektion im Brutschrank inkubiert. Zur Erholung der Zellen von der Nukleofektion erfolgte die Stimulation mit IL-10 am Tag 2 und der Komplementlyse-Test bzw. der Western Blot am Tag 3.

Als Positivkontrolle für den IL-10-Effekt wurden nicht transfizierte Monozyten verwendet, als Negativkontrolle für die Nukleofektion Zellen, die mit Kontroll-siRNA oder ohne siRNA transfiziert wurden. Die Erfolgskontrolle für die Nukleofektion geschah mittels Western Blot Analyse für HO-1. Dafür wurden transfizierte Monozyten direkt nach der Nukleofektion separat mit oder ohne IL-10 stimuliert und am Tag 3 die Probenvorbereitung, sprich Lyse und

Benzonaseverdau, für den Western Blot durchgeführt. Abbildung 6.12 zeigt den Kontroll-Western Blot nach Nukleofektion mit siRNA, wobei die obere Bandenreihe β -Aktin als Ladungskontrolle zeigt.

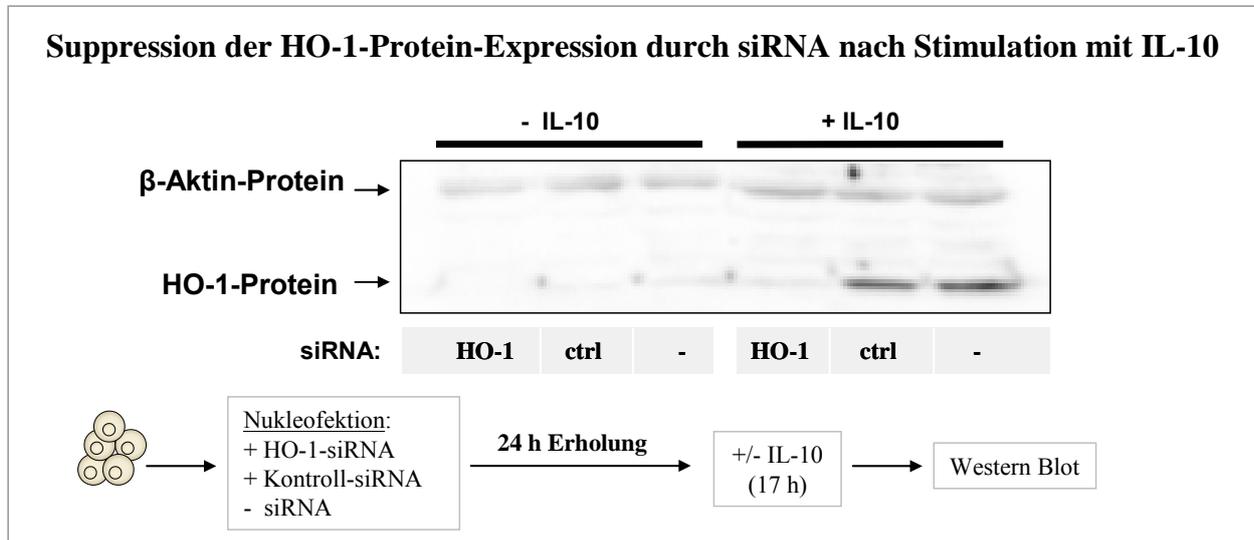


Abb. 6.10 HO-1-Protein-Suppression durch siRNA

Mittels Nukleofektion wurde spezifische siRNA für HO-1, Kontroll-siRNA oder keine siRNA in frisch isolierte, CD14 positiv selektierte Monozyten transfiziert. Nach 24 h Erholungszeit erfolgte die Stimulation mit oder ohne IL-10 (10 ng/ml) für 17 h. Daraufhin schloss sich die Western Blot Analyse für HO-1 und β -Aktin (Ladungskontrolle) an. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von drei Experimenten (ctrl steht für Kontroll-siRNA).

Die ersten drei Banden der unteren Reihe zeigen, dass ohne IL-10-Stimulation auch nach Nukleofektion keine HO-1-Induktion erfolgte. Bei den IL-10 stimulierten Zellen ist in den Negativkontrollen mit Transfektion ohne siRNA oder mit Kontroll-siRNA wie erwartet eine deutliche HO-1-Induktion feststellbar. Dagegen ist bei Zugabe von HO-1-siRNA zur Nukleofektion trotz vorheriger IL-10-Stimulation keine HO-1-Bande erkennbar. Somit ist die Wirkung der Nukleofektion von HO-1-siRNA auf Proteinebene nachgewiesen.

Parallel zum Western Blot wurden die Monozyten nach der Nukleofektion und nach einem weiteren Tag Erholung mit IL-10 über Nacht stimuliert. Am nächsten Tag erfolgte die Fortsetzung des Experiments mit dem Komplementlyse-Assay. Dieser wurde standardmäßig mit MHC-I-Antikörpern und Kaninchenserum durchgeführt. In Abb. 6.13 ist die Zusammenfassung dreier unabhängiger Lyseversuche dargestellt.

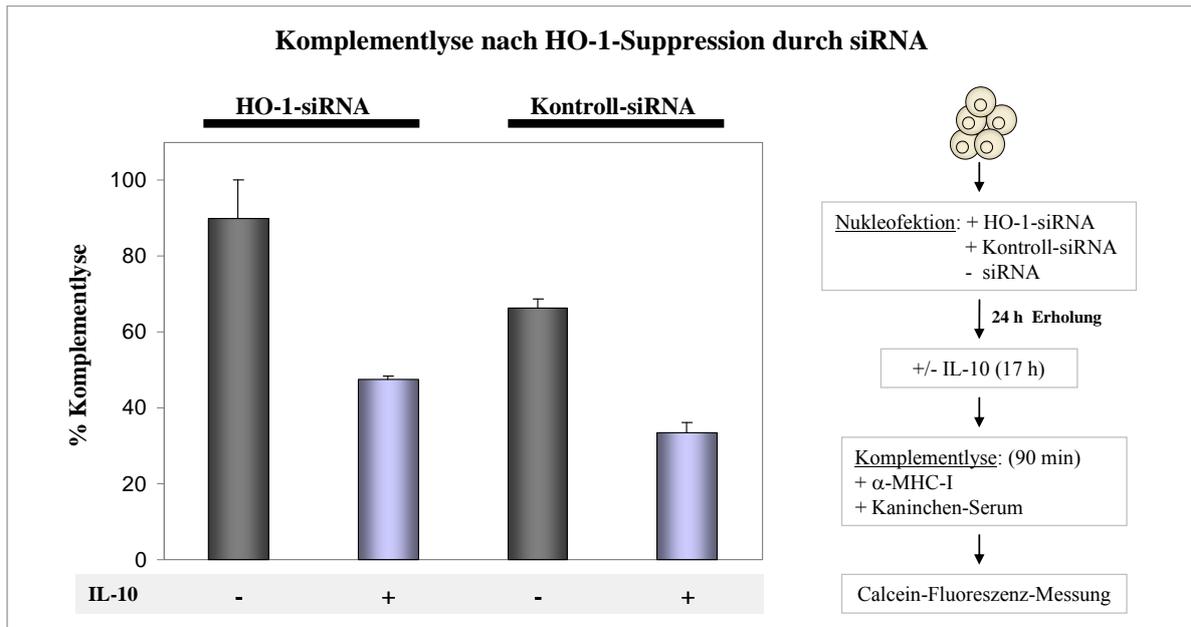


Abb. 6.11 HO-1-Suppression durch siRNA kann den IL-10-Effekt nicht aufheben

Mittels Nucleofektion wurde HO-1-spezifische siRNA, Kontroll-siRNA oder keine siRNA in frisch isolierte, CD14-positiv-selektierte Monozyten transfiziert. Nach 24 h Erholungszeit erfolgte die Stimulation mit oder ohne IL-10 (10 ng/ml) für 17 h. Der Komplementlyse-Assay wurde mit MHC-I-Antikörpern und Kaninchen-serum durchgeführt. Die Messwerte der Calceinfloureszenz wurden prozentual zur Totallyse mit Triton ins Verhältnis gesetzt. Die Komplementlyse berechnet sich aus der Differenz der Lyse von aktivem Komplement enthaltendem Serum und inaktiviertem Serum. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen als Mittelwert, wobei die Standardfehler der Mittelwerte als Fehlerbalken angezeigt sind.

Die graue Säule der zwei Paare zeigt jeweils die Komplementlyse nicht stimulierter Zellen, die blaue Säule die Komplementlyse nach 17-stündiger IL-10-Inkubation. In beiden Zellpopulationen ist eine deutliche Reduktion der Komplementlyse bei vorheriger IL-10-Stimulation erkennbar. Nach Transfektion der Zellen mit HO-1-siRNA zeigt sich eine Reduktion der Komplementlyse um 47 % durch IL-10. Damit konnte in den funktionellen Komplementlyse-Experimenten trotz klarer Reduktion von HO-1-Protein durch die siRNA-Transfektion der IL-10-Effekt nicht aufgehoben werden. Diese Ergebnisse widersprechen der Annahme, dass HO-1 eine entscheidende Rolle für den Komplementschutz von IL-10 spielt, die sich durch die Aufhebung des IL-10-Effektes durch SnPP begründete.

6.2.7 Regulation von HO-1 durch IL-10 und IL-6

In den Versuchen von Lee *et al.* scheint es, dass IL-10 in J774-Zellen, einer murinen Makrophagen-Zelllinie, in Abhängigkeit von p38 die HO-1-Produktion steigert [67]. Dem widersprechend zeigten Ricchetti *et al.* eine STAT3-abhängige, jedoch p38-unabhängige HO-1-Induktion durch IL-10 in humanen Makrophagen [102]. Es wird vermutet, dass MAP-Kinasen

abhängig von der Zelllinie und den jeweiligen Kulturbedingungen verschiedene Auswirkungen auf die HO-1-Expression haben [67, 103]. Aus diesen Gründen war es von Interesse den Signalweg der durch IL-10 vermittelten HO-1-Induktion in unserem Model zu prüfen. Zusätzlich wurde mit der Western Blot Analyse auch untersucht, ob eine HO-1-Induktion durch IL-6 in humanen Monozyten möglich ist, da dies für humane Makrophagen und J774-Zellen gezeigt wurde [67, 102].

So wurden mit CD14-Beads isolierte Monozyten über Nacht mit IL-10, IL-6 oder ohne Zusätze stimuliert. Gleichzeitig wurden der STAT3-Inhibitor JSI-124 oder der p38-Inhibitor SB220025 dazugegeben. Am nächsten Tag erfolgte die Analyse der Proteinexpression der Zellen mittels Western Blot. Dabei wurden diesmal an einen Infrarot-Farbstoff gekoppelte Sekundärantikörper verwendet, deren Auswertung im Li-Cor Infrarot Imager erfolgte. Abb. 6.10 zeigt den Western Blot eines repräsentativen Einzelversuches von vier verschiedenen Experimenten, wobei β -Aktin als Ladungskontrollprotein diente.

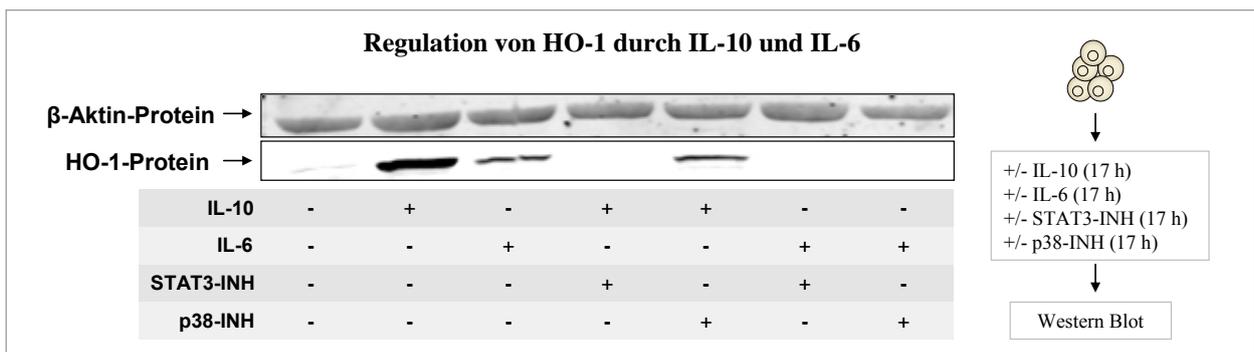


Abb. 6.12 IL-10 reguliert HO-1 über STAT3

Frisch isolierte und CD14-positiv-selektierte Monozyten wurden für 17 h mit IL-10, IL-6, einem STAT3-Inhibitor (JSI-24, 2,5 μ M) oder einem p38-Inhibitor (SB22025, 5 μ M) oder ohne Zusätze inkubiert. Im Anschluss wurde die HO-1-Protein-Expression mittels Western Blot Analyse ermittelt. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von vier verschiedenen Experimenten. Als Ladungskontrolle ist die β -Aktin-Expression des gleichen Blots dargestellt.

Neben der HO-1-Induktion durch IL-10 kann man klar erkennen, dass auch IL-6 HO-1 induziert, jedoch in geringerem Ausmaß, wobei die HO-1-Induktion durch IL-10 ungefähr das Doppelte der von IL-6 beträgt. Bei Zugabe von SB220025, einem sehr spezifischen p38-Hemmer, resultiert bei IL-10-vorbehandelten Zellen nur eine geringe Reduktion der normalerweise durch IL-10 verursachten HO-1-Induktion, wohingegen der STAT3-Inhibitor die HO-1-Proteinexpression vollständig aufhebt. Interessanterweise wird bei IL-6-behandelten Zellen sowohl durch Zugabe des STAT3-Inhibitors, also auch durch Zugabe des p38-Inhibitors, die HO-1-Expression aufgehoben. Nicht stimulierte Monozyten zeigen eine sehr geringfügige HO-1-Induktion. Das ist wahrscheinlich auf die endogene IL-10-Produktion von Monozyten zurückzuführen, zumal sich damit auch das niedrigere HO-1-Niveau von STAT3-behandelten

Zellen gegenüber unbehandelten Zellen erklärt. Interessanterweise reduzieren beide Inhibitoren die HO-1-Expression auf ein im Western Blot nicht nachweisbares Proteinexpressionslevel, wenn die Zellen zuvor mit IL-6 stimuliert wurden. Demnach können wir schlussfolgern, dass die IL-10-verursachte Steigerung der HO-1-Proteinexpression mehr STAT3-abhängig und eher p38-unabhängig ist, während bei der durch IL-6-induzierten HO-1-Erhöhung STAT3 und auch p38 von Bedeutung zu sein scheinen.

Da auch IL-6 HO-1 induzierte, lag es in unserem Interesse zu überprüfen, ob IL-6 auch in der Lage ist, Monozyten vor Komplementlyse zu schützen. Es wurde also der durch MHC-I-Antikörper induzierte Komplementlyse-Test mit Monozyten und Kaninchenserum wiederholt, jedoch mit vorheriger Stimulation der Zellen durch IL-6.

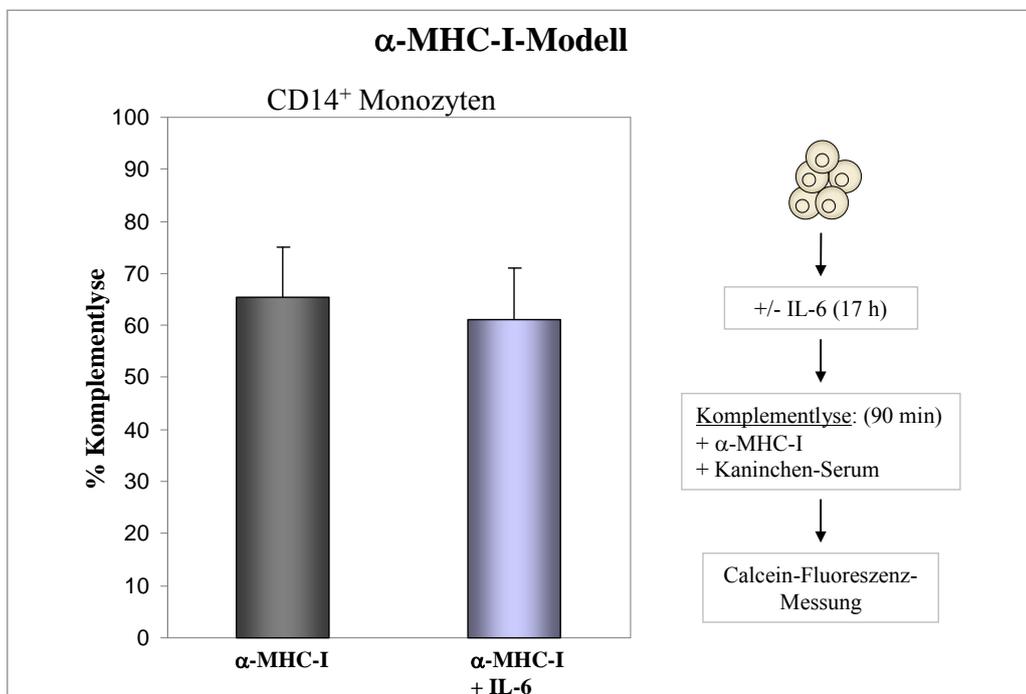


Abb. 6.13 IL-6 schützt Monozyten nicht vor Komplementlyse

Frisch isolierte und CD14 positiv selektierte Monozyten wurden mit oder ohne IL-6 (10 ng/ml) für 17 h inkubiert. Danach folgte der Komplementlyse-Assay analog den IL-10-Experimenten mit MHC-I-Antikörpern und Kaninchenserum. Die Messwerte der Calceinfluoreszenz wurden prozentual zur Totallyse mit Triton ins Verhältnis gesetzt. Die Komplementlyse berechnet sich aus der Differenz der Lyse von aktivem Komplement enthaltenem Serum und inaktiviertem Serum. Dargestellt sind die Ergebnisse von 11 unabhängigen Blutspendern als Mittelwert, wobei die Standardfehler der Mittelwerte als Fehlerbalken angezeigt sind.

Entgegen den Erwartungen zeigt Abb. 6.11 keinen signifikanten Schutz vor Komplementlyse durch IL-6. Betrachtet man die Mittelwerte, d. h. 66 % Komplementlyse unstimulierter gegenüber 61 % Komplementlyse IL-10 stimulierter Zellen, lässt sich eine sehr kleine Tendenz für einen IL-6-Schutz vor Komplementlyse erkennen. Diese Tendenz wird noch etwas deutlicher, wenn nicht die Mittelwerte, sondern die Mediane verglichen werden. So beträgt

der Median unstimulierter Zellen 83 % und der Median IL-6 stimulierter Zellen 63 % Komplementlyse. Insgesamt kann bei fehlender Signifikanz aus diesen Versuchen jedoch nicht geschlussfolgert werden, dass IL-6 Monozyten vor Komplementlyse schützt.

7 Diskussion

Das Komplementsystem wird überaus schnell und vielfältig aktiviert und führt zur effektiven Zerstörung von Erregern. Dabei können auch eigene, gesunde Zellen von der Bildung lytischer MACs (membrane-attack complexes) betroffen sein, so dass eine Regulierung der Komplementlyse unerlässlich ist. Die erhöhten Spiegel aktivierter Komplementproteine im Entzündungsherd sowie die Gefahr während der Phagozytose selbst MACs ausgesetzt zu sein, erfordern einen besonders guten Schutz vor Komplementlyse für Makrophagen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Monozyten und Makrophagen, nicht aber Lymphozyten, durch das anti-inflammatorische und Phagozytose steigernde Zytokin Interleukin-10 verstärkt vor Komplementlyse geschützt werden. Zum Nachweis des Schutzes vor Komplementlyse wurden zwei verschiedene Modelle verwendet: zum einen die MHC-I-Antikörper-abhängige Komplementaktivierung und zum anderen die Aktivierung durch opsonisiertes Zymosan. Bei der Untersuchung möglicher zu Grunde liegender Mechanismen wurde eine IL-10 induzierte Erhöhung der Oberflächenexpression von Protektin (CD59) und der zellprotektiven Hämoxygenase-1 (HO-1) beobachtet. In weiterführenden Experimenten konnten CD59 und HO-1, ebenso wie der Schutz durch erhöhte Endozytosesteigerung, als ursächlicher Mechanismus für den IL-10-induzierten Schutz vor Komplementlyse ausgeschlossen werden.

7.1 Regulation des Komplementschutzes durch Zytokine

Während eines Entzündungsprozesses kommt es im Rahmen der Erregerabwehr typischerweise zur Steigerung der Komplementaktivität. Im Gegenzug müssen vor Komplement schützende Proteine, insbesondere von Immunzellen, hochreguliert werden, da gerade Immunzellen die Eliminierung von Erregern bewirken. Zytokine als Regulatoren der Entzündung bzw. Immunantwort können daher möglicherweise auch eine Steigerung zellprotektiver und vor Komplement schützender Proteine auf Wirtszellen auslösen.

In der Literatur sind diverse Versuche beschrieben, in denen Zytokine die Komplementlyse beeinflussen. Neben der schon in der Zielsetzung erwähnten Zytokin-abhängigen Steigerung der Komplementresistenz von Endothelzellen [104, 105], konnte auch in orbitalen Fibroblasten, Oligodendrozyten, Keratinozyten und Epithelzellen eine Hochregulation

membranständiger Komplement-Regulations-Proteine (mCRPs) beobachtet werden [106-109]. Ebenso wurden auch verschiedenste Tumorzellen untersucht, was aufgrund häufig auftretender Resistenzen gegenüber Chemotherapien mit spezifischen Antikörpern von besonderem Interesse ist. Oftmals konnte gezeigt werden, dass diese Resistenz auf die Überexpression Komplement-schützender Regulationsproteine zurückzuführen ist, wobei besonders CD59 effektiv vor Komplementlyse zu schützen scheint [24]. Beispielsweise konnte durch Blockierung von mCRPs die Komplement vermittelte Zytotoxizität mittels HER2-Antikörper (Trastuzumab) in humanen Brustkrebszelllinien um 15 % gesteigert werden und mittels polyklonalem anti-Tumor-Kaninchenserum von 10 % auf 80 % gesteigert werden [110]. Des Weiteren konnten Macor *et al.* den therapeutischen Effekt von Rituximab (anti-CD20-Antikörper) durch Zugabe von CD55- und CD59-blockierenden Antikörpern zu SCID-Mäusen (severe combined immunodeficiency), die an einem B-Zell-Lymphom erkrankt waren, verstärken. 30 % der Mäuse, denen zuvor B-Zell-Lymphomzellen injiziert wurden, lebten nach Erhalt einer ausschließlichen Rituximabtherapie nach 90 Tagen. Wurden zusätzlich zu Rituximab auch CD55- und CD59-blockierende Antikörper gegeben, waren 70 % der Mäuse nach 90 Tagen noch am Leben [111]. Auch von Patienten mit follikulärem Lymphom isolierte PBMCs zeigten nach Zugabe von Rituximab und blockierenden Antikörpern gegen CD55 und/oder CD59 eine deutlich erhöhte Komplement-abhängige Lyse gegenüber alleiniger Gabe von Rituximab [112].

Könnte nun die Komplementsuszeptibilität mit Hilfe von Zytokinen erhöht werden, würde dies das Therapiespektrum mit Antikörpern stark erweitern und die Ansprechrate verbessern. Eine Verminderung der Oberflächenexpression von Komplement-Regulations-Proteinen konnte vor allem in Nierentumor-Zellen durch IL-4, IL-1 β und TGF- β festgestellt werden. Aber auch TNF- α reduzierte die CD59-Expression und führte somit zu gesteigerter Komplementlyse [113]. In humanen Lungenkrebszellen und in Adenokarzinomzellen des Kolons jedoch, steigert TNF- α die DAF-Expression und somit auch den Komplementschutz [114, 115].

Interessant ist eine Studie von Spiller *et al.* an humanen Hepatoma-Zelllinien, da sie eine zu dieser Arbeit ähnliche theoretische Grundlage beinhaltet. Während der Akute-Phase-Antwort, hervorgerufen durch IL-1 β , IL-6 und TNF- α , kommt es zu vermehrter Bildung von Komplementkomponenten in Hepatozyten, was die Zellen in erhöhte Gefahr bringt, vom Komplementsystem geschädigt zu werden. In der Tat konnten die Autoren zeigen, dass nach dreitägiger Inkubation mit den Akute-Phase-Zytokinen IL-1 β , IL-6 und TNF- α , die Zellen vermehrt CD55 und CD59 auf ihrer Oberfläche exprimieren und gegen Komplementlyse resistenter wurden. Da sie keine Möglichkeiten hatten primäre Hepatozyten zu untersuchen, mussten sie jedoch auf Hepatoma (= Hepatozelluläre Karzinoma)-Zelllinien zurückgreifen [116].

IFN- γ dagegen hemmte hier nicht nur die CD59-Hochregulation, sondern führte auch zu einer verminderten CD59-Expression. In einer intestinalen Adeno-Karzinoma-Zelllinie wiederum bewirkte IFN- γ eine Hochregulation von CD59 und CD55 [117]. Die Zytokin-abhängige Regulation von membranständigen Komplement-Regulations-Proteinen (mCRPs) scheint demnach nicht nur von dem Zytokin an sich, sondern auch stark von den Zielzellen abzuhängen.

Eine IL-10 abhängige Komplementregulation auf Monozyten/Makrophagen ist, meines Wissens, von anderen Arbeitsgruppen noch nicht gezeigt oder untersucht worden. Nachdem wir in Genexpressionsanalysen eine Hochregulation von Proteinen zur Steigerung des Zellschutzes vor Komplementlyse beobachtet hatten, konnten wir an zwei verschiedenen Modellen nachweisen, dass Monozyten durch IL-10 vermehrt vor Komplementlyse geschützt sind (Abb. 6.1 und 6.2). Es wurden sowohl humane MHC-I-Antikörper als auch C3b-opsonisiertes Zymosan zur Aktivierung der Komplementlyse eingesetzt. Auf der Oberfläche der Zymosanpartikel kommt es zur Komplementaktivierung und MAC-Bildung. Aufgrund der Phagozytose von Zymosan durch Monozyten besteht eine unmittelbare Nähe zwischen Zymosan- und Monozytenoberfläche, so dass es als „bystander“-Prozess auch zur MAC-Bildung auf der Monozytenoberfläche kam. Dieser Aktivierungsweg entspricht eher den physiologischen Bedingungen während einer Entzündung. Die Ausgangslyse mit Zymosan lag mit maximal 27 % zwar deutlich niedriger als die der MHC-I-induzierten Lyse (bis zu 100 %); ein signifikanter Schutz vor Komplementlyse wurde trotzdem gemessen. Geht man davon aus, dass IL-10 sogar die Phagozytose-Rezeptorexpression und die Phagozytose steigert, was zu erhöhten Lyseraten durch IL-10 im Zymosan-Modell führen müsste, würde der IL-10-Effekt nach Ausschaltung dieser Bias sogar noch ausgeprägter sein als beobachtet.

Erwartungsgemäß wurden auch Makrophagen vor Komplementlyse durch IL-10 geschützt (Abb. 6.3). Dagegen weisen Lymphozyten, die auch den IL-10-Rezeptor-1 exprimieren, keinen IL-10-Schutz vor Komplementlyse auf (Abb. 6.3). Physiologisch könnte dies damit erklärt werden, dass IL-10 ein Zytokin mit eher entzündungslimitierenden Funktionen ist. Da Makrophagen als phagozytierende Zellen für die Abräumung des Entzündungsherdes noch gebraucht werden, die Aktivität pro-inflammatorischer Lymphozyten aber eingeschränkt oder beendet werden soll, scheint es sinnvoll, dass nur Makrophagen geschützt werden. Des Weiteren gehören T- und NK-Zellen nicht zu den phagozytierenden Zellen.

7.2 Regulation von CD59 durch IL-10

In den oben genannten Beispielen zur Zytokin-abhängigen Regulation des Komplementschutzes konnte die Resistenz gegen Komplementlyse hauptsächlich durch Hochregulation membrangebundener Komplement-Regulations-Proteine nachgewiesen werden, so dass dies auch für uns ein erster Ansatzpunkt auf der Suche nach dem zu Grunde liegenden Mechanismus des IL-10-Effektes war.

Genexpressionsanalysen mit DNA-Mikroarrays haben gezeigt, dass in Monozyten nach 24-stündiger IL-10-Inkubation, CD35 (CR1) und CD59 deutlich hochreguliert werden [66]. Für CD55 (DAF) oder CD46 (MCP) indessen, konnte keine eindeutige Regulation nachgewiesen werden. Daraufhin wurden FACS-Analysen der Oberflächenexpression von CD35 und CD59 an humanen Monozyten durchgeführt. Während für CD35 keine vermehrte Oberflächenexpression nachweisbar war, konnte in dieser Arbeit eine Steigerung der CD59-Expression durch IL-10 gezeigt werden (Abb. 6.4). Dieses Ergebnis ließ uns vermuten, dass vielleicht ein Teil des IL-10-Effektes durch Änderungen der CD59-Expressions hervorgerufen wird, auch wenn CD59, im Gegensatz zur MAC-Bildung, nur Spezies-spezifisch wirkt und wir den IL-10-Effekt auch mit Kaninchenserum beobachten konnten. Unter Verwendung von humanem Serum wurden Komplementlysen von humanen Monozyten mit und ohne IL-10 sowie mit und ohne Zugabe CD59-blockierender Antikörper verglichen. Trotz verminderter Ausgangslyse konnte in beiden Fällen ein signifikanter IL-10-Schutz vor Komplementlyse beobachtet werden (Abb. 6.5). Weiterhin gab es keine Anzeichen oder Tendenzen, dass sich der IL-10-Schutz durch Zugabe CD59-blockierender Antikörper verringert.

Nun stellt sich jedoch die Frage, warum CD59 durch IL-10 hochreguliert wird, wenn das keine Auswirkungen auf den Schutz vor Komplementlyse hat. Im Jahre 2005 von Longhi *et al.* veröffentlichte Ergebnisse zeigen eine Komplement-unabhängige Funktion von CD59 auf die T-Zell-Aktivierung [118]. Es wurde *in vivo* und *in vitro* mit Hilfe von CD59a^{-/-}-Mäusen gezeigt, dass CD59 die virusspezifische CD4⁺-T-Zellproliferation nach Infektion mit rekombinantem Vaccinia-Virus reduziert, wobei dieser Effekt unabhängig des Komplementsystems ist. In Anbetracht der Tatsache, dass IL-10 die T-Zellaktivierung hemmt, wäre somit denkbar, dass die IL-10-induzierte Steigerung der CD59-Expression auch in Monozyten eher eine immunregulatorische Funktion, unabhängig der Komplementregulation, ausübt.

7.3 Diskussion der Ergebnisse zur Hämoxigenase-1

Ein weiterer Kandidat als möglicher Vermittler des IL-10 induzierten Komplementschutzes ist die Hämoxigenase-1, die zu den Hitzeschockproteinen zählt. In verschiedensten inflammatorischen Tier-Modellen konnten positive Effekte durch Induktion von HO-1 auf den Verlauf von Erkrankungen beobachtet werden. Dazu zählen der Septische Schock [119], die Leberfibrose [120] und die Autoimmun-Encephalomyelitis (EAE) [121]. Auch in Xenograft-Transplantations-Modellen wirkte HO-1 protektiv vor einer Hyperakuten Abstoßungsreaktion [101, 122]. Die Konstellation der Hyperakuten Abstoßung, wo Antikörper gegen das Transplantat zur Komplementaktivierung und Zelltoxizität führen, ist unserem Modell der Anti-MHC-I-induzierten Komplementlyse sehr ähnlich. Dennoch ist es strittig, ob die positiven Effekte von HO-1 auf immunmodulatorische oder direkte zellprotektive Mechanismen zurückzuführen sind. Die genauen, molekularen Mechanismen sind noch nicht geklärt, auch wenn viele Funktionen den Abbauprodukten von HO-1, dabei insbesondere dem Kohlenmonoxid, zugeordnet werden können [80]. Beispielsweise wiesen RAW 264.7-Zellen nach CO-Exposition eine gesteigerte Phagozytoseaktivität von *E. coli* auf [123]. Bezüglich der Komplementlyse konnte gezeigt werden, dass HO-1 vor Komplementattacken schützt [81, 82, 101].

In Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Experimenten an Monozyten/Makrophagen [67, 102], konnte ich die in den Genexpressionsanalysen beobachtete Steigerung von HO-1 durch IL-10 [66] auch im Western Blot auf Proteinebene für CD14-positiv-selektierte, humane Monozyten eindeutig nachweisen. Gleichzeitig zeigten die restlichen CD14-negativen Zellen der Probe, die größtenteils Lymphozyten entsprechen, keine Steigerung der HO-1-Expression. Dies schien ein weiterer Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen HO-1 und dem beobachteten IL-10-Effekt, da auch im Calcein-Modell kein IL-10-Effekt für Lymphozyten nachweisbar war. In der Tat konnte durch Zugabe des spezifischen HO-1-Inhibitors SnPP der IL-10-Effekt nicht mehr beobachtet werden. Gleichermaßen wurden nach Inkubation mit CoPP, einem HO-1-Induktor, Monozyten vermehrt vor Komplementlyse geschützt, allerdings in deutlich geringerem Ausmaß als mit IL-10 (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse sowie widersprüchliche Daten in der Literatur veranlassten uns, detailliertere Untersuchungen bezüglich des IL-10/HO-1-Pathways durchzuführen. Des Weiteren wurde auch IL-6 zusätzlich einbezogen, da von Ricchetti *et al.* eine HO-1-Induktion in humanen Makrophagen gezeigt wurde [102].

In Western Blot Analysen wurde die HO-1-Expression in humanen Monozyten nach Inkubation mit IL-6, IL-10 und spezifischen STAT3- oder p38-Inhibitoren untersucht. Durch

Zugabe des sehr spezifischen MAPK p38-Inhibitors SB220025 zu IL-10 vorbehandelten Monozyten, wurde die IL-10-vermittelte HO-1-Induktion nur teilweise gehemmt, wohingegen mit dem STAT3-Inhibitor JSI-124 das HO-1-Level unter das Level von unbehandelten Zellen sank. Diese Beobachtungen stimmen mit den Daten an humanen Makrophagen von Ricchetti *et al.* überein, die eine STAT3- jedoch keine p38-Abhängigkeit der HO-1-Induktion durch IL-10 unter Verwendung eines STAT3 dominant-negativ kodierenden Adenovirus zeigten. Dem widersprechen jedoch die Ergebnisse von Lee *et al.*, die durch Hemmung von p38 eine Aufhebung der HO-1-Induktion durch IL-10 aufwiesen. Beide Arbeitsgruppen haben den etwas weniger spezifischen p38-Inhibitor SB203580 in ähnlichen Konzentrationen eingesetzt [124]; jedoch verwendeten Lee *et al.* eine Maus-Makrophagen-Zelllinie, Ricchetti *et al.* dagegen humane Makrophagen. So könnten die gegensätzlichen Ergebnisse aufgrund von Spezies-spezifischen Unterschieden zwischen Mensch und Maus erklärt werden, was beispielsweise auch für IFN- γ -Stimulationen beobachtet wurde [125].

Auch die IL-6-Stimulation führte zur Hochregulation der HO-1, allerdings in geringerem Umfang. Im Komplementlyse-Assay mit MHC-I-Antikörpern konnte IL-6 die Komplementlyse von Monozyten jedoch nicht signifikant beeinflussen (Abb. 6.13). Interessanterweise, wurde die HO-1-Induktion in IL-6 vorbehandelten Zellkulturen durch die jeweilige Zugabe beider Inhibitoren (SB220025 bzw. JSI 124) vollständig gehemmt (Abb. 6.12). Diese Ergebnisse deuten auf eine Verknüpfung des STAT3- und des p38-Signalweges hin. Einen solchen Zusammenhang zeigten bereits Zauberman *et al.* an humanen Hepatoma-Zellen. Sie fanden heraus, dass in der STAT3-abhängigen, transkriptionellen Aktivierung des Haptoglobin-Promotors (Haptoglobin gehört zu den Akute-Phase-Proteinen) durch IL-6 auch p38 mit involviert ist [126]. Es sind jedoch weitere Experimente für eine genaue Aufklärung dieses Signalweges erforderlich.

Um zu überprüfen, ob der Schutz vor Komplementlyse durch HO-1 vermittelt wird, verwendete ich SnPP, einen Inhibitor von HO-1. In der Tat war durch Inkubation der Monozyten mit SnPP der IL-10-Effekt aufgehoben. Chemische Inhibitoren wie SnPP können Nebenwirkungen aufweisen. Ferner gibt es jüngste Berichte über unspezifische, HO-1-unabhängige Wirkungen von SnPP oder CoPP auf zelluläre Funktionen. Beispielsweise wurden durch CoPP eine HO-1-unabhängige Induktion von IL-8 in Zellen einer humanen Endothelzelllinie und eine HO-1-unabhängige STAT3-Aktivierung in Dendritischen Zellen von Mäusen nachgewiesen [127, 128]. Somit sahen wir uns veranlasst mit einer alternativen Methode zu überprüfen, ob eine HO-1-Hemmung den IL-10-Effekt aufhebt. Überraschenderweise war der Schutz vor Komplementlyse nach siRNA-Nukleofektion in Monozyten, trotz einer im Western Blot

nachweislichen Hemmung der HO-1 auf Proteinebene, weiterhin deutlich durch IL-10 induzierbar (Abb. 6.11). Das spricht gegen HO-1 als Vermittler des IL-10-Schutzes. Auch die Experimente mit IL-6 sprechen eher gegen einen Komplementschutz über HO-1. Obwohl IL-6 HO-1 induziert, war jedoch kein Schutz vor Komplementlyse durch IL-6 nachweisbar. Andererseits kann man nicht ausschließen, dass während der Nukleofektion, einer sehr invasiven Methode, die Löcher in der Zellmembran generiert, Veränderungen von Monozytenfunktionen auftreten. So wäre es möglich, dass andere Stress-Proteine zur Kompensation der protektiven Wirkungen von HO-1 induziert wurden.

Weitere Möglichkeiten, HO-1 spezifisch auszuschalten, sind die Durchführung des Komplementlyse-Assays mit Monozyten/Makrophagen von HO-1^{-/-}-Mäusen und die Transfektion von Monozyten/Makrophagen mit shRNA. Bei der Realisation beider Experimente traten jedoch methodische Probleme auf. Zunächst musste der Komplementlyse-Assay auf das Maus-Modell umgestellt werden und entsprechende MHC-I-Antikörper eingesetzt werden, da Mäuse über ein anderes Klassifikations-System von MHC-I-Antikörpern verfügen und diese je nach Stamm der Mäuse variabel sind. Die von mir verwendeten Knock-out-Mäuse waren sogar aus zwei unterschiedlichen Stämmen generiert, so dass die MHC-I-Antikörper-Auswahl schwierig war. Der Komplementlyse-Assay wurde mit Mausmakrophagen, die unter Stimulation von M-CSF aus Knochenmark-Stammzellen differenzierten, von Wildtyp- und HO-1^{-/-}-Mäusen durchgeführt. Allerdings war auch bei der Wildtyp-Population kein IL-10-Schutz nachweisbar, so dass eine Aussage über die HO-1^{-/-}-Mäuse nicht möglich war (Daten nicht gezeigt). Es erscheint eher unwahrscheinlich, dass dies auf Unterschiede zwischen humanen Makrophagen und Mausmakrophagen *per se* zurückzuführen ist, da der IL-10-Effekt mit RAW-264.7-Zellen, einer Maus-Makrophagen-Zelllinie, deutlich nachweisbar war (Abb. 7.1). Unterschiede zwischen Zelllinien und primären Zellen, die meist weniger stabil sind, können möglicherweise eine Rolle gespielt haben. Auch waren nur wenige HO-1^{-/-}-Mäuse verfügbar.

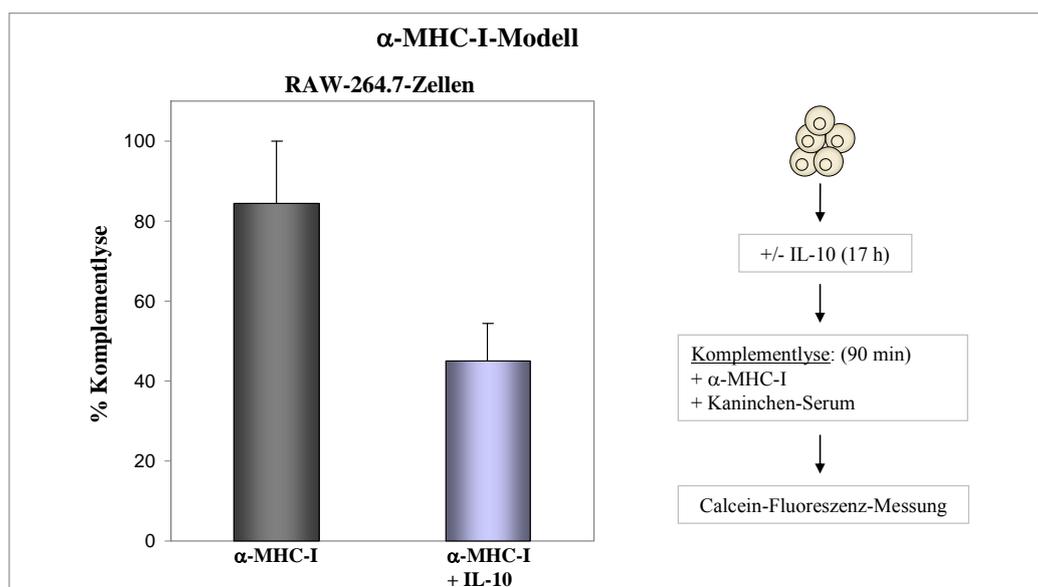


Abb. 7.1 IL-10 schützt auch Maus-Makrophagen vor Komplementlyse

Maus-Makrophagen der Zelllinie RAW-264.7 wurden mit oder ohne IL-10 (10 ng/ml) für 17 h inkubiert. Danach folgten der Komplementlyseassay mit 2 µg/ml von mausspezifischen MHC-I-Antikörpern (H₂-D^d) und Kaninchenserum sowie die Detektion der Zellyse mittels Calcein-fluoreszenz. Die Messwerte wurden prozentual zur Totallyse mit Triton ins Verhältnis gesetzt. Die Komplementlyse ergibt sich aus der Differenz der Lyse von aktivem Komplement enthaltendem Serum und inaktiviertem Serum. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei Einzelversuchen als Mittelwert, wobei die Standardfehler der Mittelwerte als Fehlerbalken angezeigt sind.

Wir versuchten in den RAW-264.7-Zellen durch Transfektion von shRNA HO-1 spezifisch auszuschalten. Die Aufnahme der shRNA in die Zellen erfolgte mittels jetPEITM-Macrophage, ein an Mannose konjugiertes, lineares Polyethylenimin-Derivat, welches an Mannose-Rezeptoren bindet und somit von Makrophagen durch Endozytose aufgenommen wird. Humane Monozyten/Makrophagen ließen sich nicht mit dieser Methode transfizieren. Durch Kopplung der shRNA an ein Neomycin-Resistenz-Gen wurden unter Zugabe von Neomycin zur Zellkultur die Klone mit erfolgreicher Transfektion selektiert. Im Komplementlyse-Assay konnte jedoch kein IL-10-Effekt mehr für Zellen, die mit Negativkontroll-RNA transfiziert wurden, gezeigt werden. Das deutet darauf hin, dass die Zellen infolge der Transfektion, des Passagierens oder der langen Neomycin-Inkubation funktionelle Eigenschaften verloren oder sich verändert haben. Sowohl für Klone mit nachgewiesener HO-1-Induktion im Western Blot, als auch für Klone mit erwiesenem HO-1-Knock-Down, konnte kein eindeutiger oder signifikanter Schutz vor Komplementlyse durch IL-10 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend gesehen, konnten wir, trotz Aufhebung des IL-10-Effektes mit SnPP, einen deutlichen Schutz vor Komplementlyse durch IL-10 in Monozyten in Abwesenheit von

HO-1 beobachten (siRNA-Experimente). Das weist darauf hin, dass andere Mechanismen für die protektive Wirkung von IL-10 gegenüber der Komplementlyse verantwortlich sind.

7.4 Weitere Mechanismen des Komplementlyseschutzes

7.4.1 Endo- und Exozytose

Sofortige Endozytose bzw. Exozytose von MACs ist eine andere Möglichkeit potentiell gefährliche, lytische MACs von der Zelloberfläche zu eliminieren. Beispielsweise beträgt die Halbwertszeit der MACs auf U937-Zellen nur 1 min [98]. Es werden nach sublytischen MAC-Ablagerungen kleine Membranvesikel von der Zelloberfläche abgeschnürt, die u. a. auch MACs enthalten und entweder direkt nach außen abgestoßen (Exozytose) oder ins Zytoplasma gebracht (Endozytose). Die endozytischen Vesikel können in sogenannten Multivesikulären Bodies (MVB) gesammelt werden und dann, durch Entleerung der MVB in den Extrazellulärraum, entfernt werden. Solche, vor Komplementlyse schützenden Vesikelabschnürungen, wurden für viele Zellarten nachgewiesen, darunter auch Oligodendrozyten, Thrombozyten, Epithelzellen und die humanen Tumorzellenlinien K562 (myelogene Leukämie-Zelllinie) und U937 (Monozyten) [98, 99, 129, 130]. Auch in humanen Monozyten wurden exozytotische Prozesse nach Behandlung mit Kalzium-Ionophor beschrieben [131]. Es wäre also möglich, dass IL-10 durch Steigerung der Endo- oder Exozytose MACs vor Eintreten der Zelllyse von der Monozytenoberfläche entfernt und somit vor der Zelllyse schützt. Bei Zugabe von Latrunculin B, einem Endo- und Exozytose-Inhibitor, zum MHC-I-induzierten Komplementlyse-Assay, war der IL-10-Schutz vor Komplementlyse allerdings weiterhin deutlich vorhanden. Latrunculin B hemmt die Polymerisation von Aktin und beeinflusst dadurch die meisten endo- und exozytotischen Prozesse, nämlich alle, die Aktin-abhängig sind [132, 133]. Mit diesem Versuch kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass möglicherweise andere Aktin-unabhängige Endozytosemechanismen durch IL-10 induziert werden, zumal Aktin nicht für alle endozytotischen Abläufe dringend notwendig zu sein scheint [134]. Die erhöhten Ausgangslysen durch Latrunculin B sprechen eher dafür, dass Latrunculin B wirkt und die Zellen insgesamt anfälliger für die Lyse durch Komplement macht.

In der Literatur sind unterschiedliche Ergebnisse zur Endozytose-Regulation durch IL-10 erhoben worden. Während Piemonti *et al.* nachwies, dass IL-10 die FITC-Dextran-Aufnahme

von Makrophagen und von in vitro aus Monozyten differenzierten Dendritischen Zellen steigert [135], beobachteten Montaner *et al.* eher eine reduzierte Endozytoseaktivität in humanen Makrophagen [136]. Im letzteren Artikel wurde die Endozytoseaktivität mittels HRP-Aufnahme (Meerrettich-Peroxidase) untersucht. Interessanterweise war die gemessene Verminderung der HRP-Aufnahme durch IL-10 eher auf eine verminderte Speicherung von HRP in Makrophagen, als auf die Senkung der totalen HRP-Aufnahme zurückzuführen.

7.4.2 Lösliche Regulatoren der Komplementlyse

Neben zellulären Faktoren ist auch eine gesteigerte Sekretion löslicher Komplement-Inhibitoren von Monozyten/Makrophagen infolge IL-10-Inkubation denkbar. In einem Ischämie-Reperfusion-Mausmodell konnte die Infusion von löslichem CR1 (CD35) vor und nach der Ischämiezeit die Vitalität der Muskelzellen erheblich steigern und eine Aktivierung des Alternativen Weges fast vollständig unterbinden [137]. Andere Studien zeigten Zytokin-abhängige Regulation löslicher Komplementregulatoren wie Faktor H, C4BP, Clusterin und lösliches CD55 [23, 108, 138-140] und auch in der Arbeitsgruppe von Dr. Grütz konnte eine Induktion von Pentraxin 3 durch IL-10 auf mRNA-Ebene festgestellt werden [58]. Allerdings, konnte in 5 unabhängigen Versuchen durch Inkubation frisch isolierter, unbehandelter Monozyten mit dem Überstand von IL-10-vorbehandelten Monozyten kein Schutz vor Komplementlyse nachgewiesen werden [66]. Eventuell nicht gebundenes IL-10 im Überstand wurde dabei durch Zusatz neutralisierender IL-10-Antikörper blockiert. Somit scheinen lösliche Faktoren nicht für den IL-10-Effekt verantwortlich zu sein, es sei denn, es würde sich um sehr flüchtige Gase handeln.

7.4.3 Apoptose

Verschiedene Publikationen beschreiben einen Zusammenhang zwischen Komplementaktivierung und apoptotischen Prozessen (programmierter Zelltod). So gibt es Studien, die zeigen, dass C5a oder MAC-Bindung zu geringeren Apoptose-Raten führen, wobei vornehmlich sublytische MAC-Dosen eingesetzt wurden [141]. Gleichzeitig, weisen jedoch andere Studien auf eine Induktion apoptotischer Prozesse infolge Komplementaktivierung

hin [142]. Da in späteren Phasen der Apoptose, besonders auch *in vitro*, Zelllysen auftreten [143, 144], könnte der IL-10-Effekt über die Hemmung von Apoptose funktionieren. Überdies wurde auch eine erhöhte Anfälligkeit von apoptotischen Jurkat-Zellen gegenüber Komplementlyse beschrieben [145]. So könnte eine durch IL-10 gesteigerte bcl-2-Expression [146, 147], welche anti-apoptotisch wirkt, zu einer Reduktion der Komplementlyse führen. Doch auch hier zeigen Ergebnisse anderer Studien zwar eine erhöhte Komplementopsonisierung von apoptotischen Zellen, im Gegensatz dazu jedoch eine verminderte MAC-Bindung und Zelllyse [148]. Verantwortlich dafür scheinen beispielsweise Phagozytose-induzierende und Faktor H-bindende Eigenschaften von CRP oder die schnelle Konversion von C3b zu iC3b zu sein [141, 149, 150]. Obwohl ich in meinen Experimenten keine Apoptose induzierenden Reagenzien verwendet habe, ist ein Vorhandensein apoptotischer Monozyten möglich, da für Monozyten Spontanapoptose in Zellkulturen beschrieben ist [151, 152]. Letzten Endes wurde eine Hemmung der Apoptose als Ursache für den IL-10-Mechanismus untersucht und ausgeschlossen. Mechthild Jung und auch Andere zeigten, dass IL-10 die Apoptose in humanen Monozyten eher induziert als hemmt [66, 153-155].

7.4.4 Andere, mögliche Ursachen für den IL-10 Effekt

Erst kürzlich wurde entdeckt, dass ein Phagozytose-Rezeptor auf Makrophagen auch den Alternativen Weg der Komplementaktivierung hemmt. Es handelt sich dabei um CRIg (Z39Ig), welches C3b und C3c bindet und selektiv die C3- und C5-Konvertasen inhibiert [156]. Eine Regulation durch IL-10 für CRIg wurde in der Literatur bislang nicht beschrieben. Allerdings wird durch IL-10 die Phagozytose von Makrophagen durch Hochregulation anderer Phagozytose-Rezeptoren (CR4, Fc γ -RI, Fc γ -RIII, CD163) gesteigert, so dass auch glaubhaft ist, dass CRIg oder andere, noch nicht bekannte Regulationsproteine, den Komplementschutz durch IL-10 auslösen. Da CRIg hauptsächlich auf Gewebs-Makrophagen, nicht aber auf Makrophagen in entzündlichen Regionen nachgewiesen werden konnte, würde dies zur Funktion der Aufrechterhaltung einer Gewebshomöostase und Auflösung von Entzündungen durch IL-10 passen [157].

Es gibt weitere, zahlreiche Untersuchungen bezüglich eines Zellschutzes vor Komplementlyse, die häufig auch an Tumorzellen durchgeführt wurden. So konnten zusätzliche Mediatoren, insbesondere für den Schutz vor Komplementlyse durch sublytische MAC-Bindung,

identifiziert werden. Dabei wurden gleiche Ergebnisse auch durch Verwendung anderer Porenformer (z. B. Streptolysin O) erzielt. Zur Induktion des Zellschutzes sind die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration [158], *de novo* Proteinsynthese [40, 159] und die Aktivierung der PKC (Proteinkinase C) sowie in Abhängigkeit davon auch der ERK (extrazelluläre Signale regulierende Kinase) notwendig [160]. Ebenso wurde gezeigt, dass die Zugabe/Induktion von cAMP zu Antikörper- und Komplement-beladenen, aber noch nicht lysierten Tumorzellen, diese Zellen vor Lyse schützt [161, 162]. Interessanterweise führten Alterationen des Fettstoffwechsels von C5b-8 beladenen Ehrlich-Zellen bei Zugabe von C9 zu vermehrter Komplementlyse. Inhibitoren der Lipid-Transmethylierung steigerten die Rate der MAC-Bindungen auf der Zelloberfläche, während Lysolecithin-Reacetylierungs-Inhibitoren die MAC-Elimination reduzierten [163]. Weiterhin wurden auch Ecto-Proteasen, die C3 abbauen, und Ecto-Proteinkinasen, nach extrazellulär zeigende, membranverankerte Proteinkinasen, die C3 oder C9 phosphorylieren, als Zellschutz vor Komplementlyse beschrieben [39].

7.4.5 Resümee

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Steigerung der CD59-Oberflächen-Expression, der HO-1-Protein-Expression und endozytotischer Prozesse nicht für den Schutz vor Komplementlyse in Monozyten/Makrophagen durch IL-10 verantwortlich sind. Des Weiteren scheinen andere, bekannte Oberflächenproteine der Komplementregulation nicht durch IL-10 vermehrt exprimiert zu sein, so dass die Frage, wodurch IL-10-behandelte Monozyten im Gegensatz zu unbehandelten Monozyten resistenter gegenüber Komplementlyse werden, noch offen bleibt.

Denkbar wäre, dass die untersuchten Mechanismen einzeln nur in sehr geringem Maße vor Komplementlyse schützen. Eine Aufhebung des IL-10-Effektes wäre dann erst durch gleichzeitiges Ausschalten aller Mechanismen zu beobachten, was methodisch jedoch nicht realisierbar ist. Weiterhin ist auch vorstellbar, dass IL-10 in den Zellen komplexe, metabolische Veränderungen, wie z. B. Alterationen des Fettstoffwechsels, bewirkt, wodurch Reparaturmechanismen von Membranschäden gesteigert, intrazelluläre Todes-Prozesse gehemmt wären oder osmotische Abweichungen besser gepuffert würden. Auch andere Proteine bzw. Mechanismen schützen möglicherweise vor Komplementlyse, deren vollständige Wirkungen

noch nicht bekannt sind. So wurde beispielsweise die Hemmung des Alternativen Weges durch CRIg erst kürzlich entdeckt.

7.5 Pathophysiologische und medizinische Relevanz des IL-10-Schutzes vor Komplementlyse

Komplementaktivierung spielt in der Pathogenese vieler Erkrankungen eine wichtige Rolle, so beispielsweise beim Myokardinfarkt, beim Schlaganfall, bei Antikörper-vermittelten Autoimmunerkrankungen und bei der Hyperakuten Abstoßungsreaktion nach Transplantation [164-168]. Dabei kommt es durch Initiierung der Komplementlyse nach Bindung von Antikörpern zu Kollateralschäden an eigenen Zellen mit nachfolgender Nekrose, Thrombose und Entzündungsreaktion. So ist es therapeutisch von Interesse, auf welche Art und Weise sich die Komplementlyse hemmen lässt. Wir konnten zeigen, dass Interleukin-10, ein anti-inflammatorisches Zytokin, nach Komplementaktivierung über den Klassischen Weg die Komplementlyse hemmt. Interessant wäre es demnach fortführend zu untersuchen, ob auch andere Zellen, wie beispielsweise Endothelzellen, Mukosazellen oder Herzmuskelzellen durch IL-10 oder andere Zytokine vor Komplementlyse geschützt werden können.

Mit dem Zymosanmodell, welches eine normale Infektion simuliert, haben wir außerdem zeigen können, dass Monozyten/Makrophagen während der Phagozytose von Komplement-aktivierenden Pathogenen (in unserem Modell dem Zymosan entsprechend) auch unerwünschterweise vom Komplementsystem lysiert werden können. Dabei schützt IL-10 auch im Zymosanmodell vor Komplementlyse. Somit bestätigen und festigen unsere Ergebnisse die Anfangsthese, dass Makrophagen, die durch Interleukin-10 zu vermehrter Phagozytose angeregt werden, damit auch dem erhöhten Risiko der Komplementlyse ausgesetzt sind und zusätzlich vor Komplementlyse geschützt sind. Da Makrophagen diejenigen Zellen sind, die hauptsächlich an der Auflösung von Entzündungen und der Beseitigung von Zellabfall beteiligt sind, wäre ihre Zerstörung in vielen Situationen von Nachteil und könnte vermehrt zu Schädigungen eigener Zellen und eigenen Gewebes oder zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen, z. B. Systemischer Lupus Erythematosus, führen [169]. IL-10 scheint demnach eine Differenzierung in einen speziellen Makrophagentyp mit verstärkter „Clearance-“ und Phagozytosefunktion zu bewirken und sie gleichzeitig vor Komplementlyse zu schützen, so dass sie länger in einer

entzündlichen Umgebung überleben können und die Auflösung der Entzündung forcieren können.

Ein Beispiel, worin ein Zusammenhang zwischen Komplementlyse und IL-10 *in vivo* während einer Infektion beschrieben ist, ist die Arbeit von Ismail *et al.* [170]. Darin entwickelten IL-10^{-/-}-Mäuse durch eine *Helicobacter pylori*-Infektion eine schwere Gastritis und konnten jedoch *Helicobacter pylori* eradizieren, wohingegen WT-Mäuse nur milde bis gar keine Alterationen der Magenschleimhaut zeigten und bei ihnen *Helicobacter pylori* aber im Magen persistierte. Durch Depletion der Komplementfaktoren konnte die Entwicklung der Gastritis in IL-10^{-/-}-Mäusen stark reduziert werden. Das deutet auf eine Beeinflussung der Komplementlyse durch IL-10 hin, wobei allerdings ein indirekter Mechanismus nicht ausgeschlossen ist.

Weitere Optionen der Anwendung in der Medizin, bestehen auf dem Gebiet der Tumorforschung. Zum einen wäre denkbar, dass außer Makrophagen auch andere Zellen wie beispielsweise Endothelzellen oder bestimmte Tumorzellen, die IL-10 in größeren Mengen produzieren [171, 172], vor Komplementlyse durch IL-10 geschützt sind. Oftmals sind spezifische Antikörpertherapien gegen Tumorzellen aufgrund deren hohen Schutzes vor Komplementlyse nicht wirksam [173, 174]. Denkbar ist ein möglicher Zusammenhang mit vermehrter IL-10-Produktion des Tumors, so dass bei gleichzeitiger Antagonisierung von IL-10 eventuell eine vermehrte Tumorlyse erreicht werden könnte.

Des Weiteren wird gerade in letzter Zeit vermehrt bezüglich eines Zusammenhangs von Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) und deren Relevanz für die Prognose von Tumorerkrankungen geforscht. TAMs sind Makrophagen, die ubiquitär im Tumorgewebe vorkommen können und besonders häufig in nekrotischen Arealen aufzufinden sind. Oftmals entspricht ihr Phänotyp dem einer M2c-Differenzierung, die durch hohe Produktion von IL-10 oder TGF- β durch Tumorzellen und die TAMs selbst verursacht wird [175]. Entsprechend zeigen sie erhöhte Phagozytoseaktivität, fördern die Angiogenese und senden Proliferationssignale für Reparatur und Umgestaltung von Gewebe. Sie produzieren kaum NO [176] oder reaktive Sauerstoffmetabolite, nur geringe Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-12, IL-1 β , TNF- α und IL-6 und weisen eine stark reduzierte Antigenpräsentation auf [177]. Insgesamt führen sie somit zur Unterdrückung von anti-tumörösen Prozessen und fördern das Wachstum und die Metastasierung bzw. Ausbreitung von Tumoren.

Lin *et al.* konnten zeigen, dass in CSF-1^{-/-}-PyMT-Mäusen, die spontan Mamma-Karzinome entwickeln, die Rate an pulmonalen Metastasen deutlich reduziert ist und die Tumoren langsamer in höhere Stadien übergehen, im Gegensatz zu CSF-1^{+/+}-PyMT-Mäusen

[178]. CSF-1 (colony stimulating factor 1 oder M-CSF) ist ein Zytokin, welches die Makrophagen-differenzierung aus hämatopoetischen Stammzellen fördert und die Migration von Makrophagen begünstigt, wobei CSF-1^{-/-}-Mäuse stark Makrophagen-depletiert sind. Ebenso zeigten in die Subkutis von Mäusen transplantierte Lewis-Lungenkarzinome ein stark reduziertes Wachstum in CSF-1^{-/-}-Mäusen, im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen [179]. Auch die Makrophagendepletion mittels Clodronat-Liposomen in Mäusen mit subkutan transplantierten Teratokarzinoma-Zellen bzw. Rhabdomyosarkoma-Zellen oder intraperitoneal transplantierten Mesothelioma-Zellen bewirkte ein deutlich reduziertes Tumorwachstum [180, 181].

Für die meisten Tumoren, wie beispielsweise Mamma-Karzinom [182, 183], Prostata-Karzinom [184] und Blasenkarzinom [185], konnte ein positiver Zusammenhang zwischen Anzahl der TAMs und Prognose der Erkrankung nachgewiesen werden. Es muss aber auch erwähnt werden, dass es Studien gibt, die diesbezüglich negative Korrelationen offenbarten. So konnten beim Magenkarzinom [186] und Kolonkarzinom [187-189] eher eine Verbesserung der Prognose bei hoher TAM-Anzahl im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Diese Unterschiede könnten beispielsweise auf unterschiedlich differenzierte Makrophagen (M1- oder M2-Phänotyp) zurückzuführen sein, wobei der M2-Phänotyp eher pro-tumorale Effekte und der M1-Phänotyp eher anti-tumorale Effekte aufweist. In einer Studie der Arbeitsgruppe um Staudt *et al.* an 191 Lymphknotenbiopsien von Patienten mit follikulärem Lymphom wurde diese Phänotypdifferenzierung berücksichtigt [190]. Gen-Expressions-Profile von der Hälfte der Biopsien zeigten, dass vermehrte Expression von Genen der Immunantwort I (entsprechend den M1-Makrophagen) von nicht-malignen Immunzellen mit einer besseren Prognose einherging. Dahingegen hatten Patienten mit überwiegender Expression von Genen der Immunantwort II (M2-Makrophagen), eine bedeutend schlechtere Prognose. An den restlichen Patientenbiopsien wurde diese These überprüft und zeigte eine hohe statistische Signifikanz. Natürlich wurden hier nicht nur Gene von Makrophagen evaluiert, sondern von allen CD19-negativen Zellen. Ein denkbarer therapeutischer Ansatz wäre demnach zum einen die Umpolarisierung von M2-Makrophagen in M1-Makrophagen zur Ausnutzung einer Anti-Tumor-Immunantwort oder die Depletion Tumor-assoziiertes Makrophagen zur Unterdrückung von Proliferation und Metastasierung fördernden Signalen. So konnte, die zuerst genannte Hypothese betreffend, in verschiedenen Mausmodellen mittels Umpolarisierung von TAMs vom M2-Phänotyp in den M1-Phänotyp signifikant das Tumorwachstum gehemmt werden [191-194]. Aber auch die Depletion von Makrophagen in Tumoren scheint therapeutisch sinnvoll, da in den oben erwähnten Experimenten mit CSF-1^{-/-}-Mäusen bzw. Clodronat-Liposomen der Tumorprogress stark eingeschränkt werden konnte. Robinson *et al.* reduzierten den Makrophagen-Anteil in

murinen Mamma-Karzinomen mittels eines Chemokin-Rezeptor-Antagonisten und erreichten damit eine Verzögerung des Tumorwachstums [195]. Unter Berücksichtigung, dass IL-10, welches in Tumoren oftmals in hohem Maße exprimiert wird, die Komplementlyse von Makrophagen reduziert, könnten möglicherweise mit einer anti-IL-10-Therapie und hochspezifischen Antikörpern gegen Oberflächenproteine von TAMs bzw. M2-Makrophagen diese durch Komplementaktivierung lysiert werden.

Zusammenfassend gesehen, stellen Makrophagen einen Großteil des Tumor-Stromas dar. Zunehmend wird gezeigt, dass nicht nur die Tumorzellen selbst, sondern auch die Makrophagen Einfluss auf Prognose und Entwicklung des Tumors haben. So kann die Erkenntnis, dass IL-10 Makrophagen vor Komplementlyse schützt, möglicherweise zur Depletion von TAMs und somit zur Therapie von Tumoren genutzt werden.

8 Zusammenfassung

Im Rahmen einer Entzündung wird das Komplementsystem als Bestandteil der angeborenen Immunantwort vermehrt aktiviert. Dabei kann es auch zur Bindung von lytischen MACs (membrane-attack complexes) an eigene, gesunde Zellen kommen, obwohl diese durch zellprotektive Komplement-Regulations-Proteine geschützt sind. Insbesondere scheinen phagozytierende Zellen wie Monozyten/Makrophagen, die eine wesentliche Rolle bei der Auflösung einer Entzündung spielen, in Gefahr zu sein, lysiert zu werden. Während der Phagozytose kommt es zum unmittelbaren Kontakt der Makrophagenoberfläche zur Pathogenoberfläche, an der die Komplementaktivierung erfolgt. Dadurch könnte es auch zu einer Komplementlyse der phagozytierenden Makrophagen kommen. Derzeit ist unklar, wie und ob eine Anpassung des Schutzes vor Komplementlyse bei Monozyten/Makrophagen in einer entzündlichen Umgebung erfolgt.

Nachdem wir in Genexpressionsanalysen von Monozyten eine Steigerung der Expression von Komplement-Regulations-Proteinen durch Interleukin-10 (IL-10) beobachtet hatten, vermuten wir, dass IL-10 Monozyten vermehrt vor Komplementlyse schützt. IL-10 spielt eine Schlüsselrolle in der Auflösungsphase einer Entzündung und steigert die Phagozytose von Monozyten/Makrophagen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Monozyten und Makrophagen, nicht aber Lymphozyten, durch IL-10 verstärkt vor Komplementlyse geschützt werden. Dabei war der Schutz vor Komplementlyse durch IL-10 in zwei verschiedenen Modellen nachweisbar, zum einen in der MHC-I-Antikörper getriggerten Komplementaktivierung und zum anderen in der Aktivierung durch opsonisiertes Zymosan. Bei der Untersuchung möglicher, zu Grunde liegender Mechanismen wurde eine IL-10-induzierte Erhöhung der Oberflächenexpression von Protektin (CD59) und der zellprotektiven Hämoxygenase-1 (HO-1) beobachtet. Durch das Einsetzen von CD59-blockierenden Antikörpern wurde zwar die Komplementlyse gesteigert, jedoch war der IL-10-Effekt weiterhin nachweisbar. Interessanterweise führte die Zugabe von SnPP, einem chemischen Inhibitor von HO-1, zur Aufhebung des IL-10-Schutzes. Jedoch konnten Experimente mit HO-1-Knock-down mittels siRNA dies nicht bestätigen.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Monozyten/Makrophagen durch IL-10 zu einer Population mit gesteigerter Phagozytoseaktivität differenzieren, die gegenüber Komplementlyse vermehrt resistent ist und somit in einer entzündlichen Umgebung besser überleben kann.

9 Literaturverzeichnis

1. Pettigrew, H.D., S.S. Teuber, and M.E. Gershwin, *Clinical significance of complement deficiencies*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1173**: p. 108-23.
2. Manderson, A.P., M. Botto, and M.J. Walport, *The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 431-56.
3. Bhakdi, S. and J. Trantum-Jensen, *Complement lysis: a hole is a hole*. Immunol Today, 1991. **12**(9): p. 318-20; discussion 321.
4. Mold, C., H.D. Gresham, and T.W. Du Clos, *Serum amyloid P component and C-reactive protein mediate phagocytosis through murine Fc gamma Rs*. J Immunol, 2001. **166**(2): p. 1200-5.
5. Hong, K., et al., *Inhibition of immune precipitation by complement*. J Immunol, 1984. **133**(3): p. 1464-70.
6. Markiewski, M.M. and J.D. Lambris, *The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight*. Am J Pathol, 2007. **171**(3): p. 715-27.
7. Hsu, M.H., et al., *NF-kappa-B activation is required for C5a-induced interleukin-8 gene expression in mononuclear cells*. Blood, 1999. **93**(10): p. 3241-9.
8. Albrecht, E.A., et al., *C5a-induced gene expression in human umbilical vein endothelial cells*. Am J Pathol, 2004. **164**(3): p. 849-59.
9. Lee, D.M., et al., *Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis*. Science, 2002. **297**(5587): p. 1689-92.
10. Schindler, R., J.A. Gelfand, and C.A. Dinarello, *Recombinant C5a stimulates transcription rather than translation of interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor: translational signal provided by lipopolysaccharide or IL-1 itself*. Blood, 1990. **76**(8): p. 1631-8.
11. Takabayashi, T., et al., *A new biologic role for C3a and C3a desArg: regulation of TNF-alpha and IL-1 beta synthesis*. J Immunol, 1996. **156**(9): p. 3455-60.
12. Kildsgaard, J., et al., *Cutting edge: targeted disruption of the C3a receptor gene demonstrates a novel protective anti-inflammatory role for C3a in endotoxin-shock*. J Immunol, 2000. **165**(10): p. 5406-9.
13. Kilgore, K.S., et al., *Sublytic concentrations of the membrane attack complex of complement induce endothelial interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 through nuclear factor-kappa B activation*. Am J Pathol, 1997. **150**(6): p. 2019-31.
14. Perlmann, H., et al., *Interaction of target cell-bound C3bi and C3d with human lymphocyte receptors. Enhancement of antibody-mediated cellular cytotoxicity*. J Exp Med, 1981. **153**(6): p. 1592-603.
15. Melchers, F., et al., *Growth control of activated, synchronized murine B cells by the C3d fragment of human complement*. Nature, 1985. **317**(6034): p. 264-7.
16. Whaley, K., *Biosynthesis of the complement components and the regulatory proteins of the alternative complement pathway by human peripheral blood monocytes*. J Exp Med, 1980. **151**(3): p. 501-16.
17. Garred, P., et al., *Synthesis of C3, C5, C6, C7, C8, and C9 by human fibroblasts*. Scand J Immunol, 1990. **32**(5): p. 555-60.
18. Langeggen, H., et al., *The endothelium is an extrahepatic site of synthesis of the seventh component of the complement system*. Clin Exp Immunol, 2000. **121**(1): p. 69-76.
19. Huber-Lang, M., et al., *Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway*. Nat Med, 2006. **12**(6): p. 682-7.

20. Wiggins, R.C., P.C. Giclas, and P.M. Henson, *Chemotactic activity generated from the fifth component of complement by plasma kallikrein of the rabbit*. J Exp Med, 1981. **153**(6): p. 1391-404.
21. Thurman, J.M. and V.M. Holers, *The central role of the alternative complement pathway in human disease*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1305-10.
22. Janeway, C.A., Jr./Travers, P./Walport, M./Shlomchik, M. J., *Immunobiology, The immune system in health and disease*. 6th ed. 2005, New York and London: Garland Science Publishing. 823.
23. Criado Garcia, O., P. Sanchez-Corral, and S. Rodriguez de Cordoba, *Isoforms of human C4b-binding protein. II. Differential modulation of the C4BPA and C4BPB genes by acute phase cytokines*. J Immunol, 1995. **155**(8): p. 4037-43.
24. Fishelson, Z., et al., *Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors*. Mol Immunol, 2003. **40**(2-4): p. 109-23.
25. Nilsson, S.C., et al., *Genetic, molecular and functional analyses of complement factor I deficiency*. Eur J Immunol, 2009. **39**(1): p. 310-23.
26. Kazatchkine, M.D., D.T. Fearon, and K.F. Austen, *Human alternative complement pathway: membrane-associated sialic acid regulates the competition between B and beta1 H for cell-bound C3b*. J Immunol, 1979. **122**(1): p. 75-81.
27. de Cordoba, S.R. and E.G. de Jorge, *Translational mini-review series on complement factor H: genetics and disease associations of human complement factor H*. Clin Exp Immunol, 2008. **151**(1): p. 1-13.
28. Jokiranta, T.S., et al., *Where next with atypical hemolytic uremic syndrome?* Mol Immunol, 2007. **44**(16): p. 3889-900.
29. Inal, J.M., et al., *Complement C2 receptor inhibitor trispanning: a novel human complement inhibitory receptor*. J Immunol, 2005. **174**(1): p. 356-66.
30. Hui, K.M., et al., *CRIT peptide interacts with factor B and interferes with alternative pathway activation*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **344**(1): p. 308-14.
31. Harpel, P.C. and N.R. Cooper, *Studies on human plasma C1 inactivator-enzyme interactions. I. Mechanisms of interaction with C1s, plasmin, and trypsin*. J Clin Invest, 1975. **55**(3): p. 593-604.
32. Frank, M.M., 8. *Hereditary angioedema*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(2 Suppl): p. S398-401; quiz S419.
33. Nauta, A.J., et al., *Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q*. Eur J Immunol, 2003. **33**(2): p. 465-73.
34. Farkas, I., et al., *CD59 blocks not only the insertion of C9 into MAC but inhibits ion channel formation by homologous C5b-8 as well as C5b-9*. J Physiol, 2002. **539**(Pt 2): p. 537-45.
35. Miyata, T., et al., *Abnormalities of PIG-A transcripts in granulocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria*. N Engl J Med, 1994. **330**(4): p. 249-55.
36. Shichishima, T., et al., *Complement sensitivity of erythrocytes in a patient with inherited complete deficiency of CD59 or with the Inab phenotype*. Br J Haematol, 1999. **104**(2): p. 303-6.
37. Tschopp, J. and L.E. French, *Clusterin: modulation of complement function*. Clin Exp Immunol, 1994. **97 Suppl 2**: p. 11-4.
38. Heinen, S., et al., *Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation*. Blood, 2009. **114**(12): p. 2439-47.
39. Jurianz, K., et al., *Complement resistance of tumor cells: basal and induced mechanisms*. Mol Immunol, 1999. **36**(13-14): p. 929-39.

40. Reiter, Y., A. Ciobotariu, and Z. Fishelson, *Sublytic complement attack protects tumor cells from lytic doses of antibody and complement*. Eur J Immunol, 1992. **22**(5): p. 1207-13.
41. Ziegler-Heitbrock, H.W., et al., *The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages*. Eur J Immunol, 1993. **23**(9): p. 2053-8.
42. Auffray, C., M.H. Sieweke, and F. Geissmann, *Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 669-92.
43. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman, *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 71-82.
44. Martinez, F.O., et al., *Macrophage activation and polarization*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 453-61.
45. Helmy, K.Y., et al., *CR1g: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens*. Cell, 2006. **124**(5): p. 915-27.
46. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, *Fc-gamma receptors: old friends and new family members*. Immunity, 2006. **24**(1): p. 19-28.
47. Gantner, B.N., et al., *Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2*. J Exp Med, 2003. **197**(9): p. 1107-17.
48. Malisan, F., et al., *Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch recombination in human CD40-activated naive B lymphocytes*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 937-47.
49. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 683-765.
50. Berg, D.J., et al., *Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance*. J Clin Invest, 1995. **96**(5): p. 2339-47.
51. Kuhn, R., et al., *Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis*. Cell, 1993. **75**(2): p. 263-74.
52. Hart, P.H., et al., *Regulation of surface and soluble TNF receptor expression on human monocytes and synovial fluid macrophages by IL-4 and IL-10*. J Immunol, 1996. **157**(8): p. 3672-80.
53. de Waal Malefyt, R., et al., *Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression*. J Exp Med, 1991. **174**(4): p. 915-24.
54. Lingnau, M., et al., *Interleukin-10 enhances the CD14-dependent phagocytosis of bacteria and apoptotic cells by human monocytes*. Hum Immunol, 2007. **68**(9): p. 730-8.
55. Capsoni, F., et al., *IL-10 up-regulates human monocyte phagocytosis in the presence of IL-4 and IFN-gamma*. J Leukoc Biol, 1995. **58**(3): p. 351-8.
56. Buchwald, U.K., et al., *Interleukin-10: effects on phagocytosis and adhesion molecule expression of granulocytes and monocytes in a comparison with prednisolone*. Eur J Med Res, 1999. **4**(3): p. 85-94.
57. te Velde, A.A., et al., *IL-10 stimulates monocyte Fc gamma R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-gamma, IL-4, and IL-10*. J Immunol, 1992. **149**(12): p. 4048-52.
58. Jung, M., et al., *Expression profiling of IL-10-regulated genes in human monocytes and peripheral blood mononuclear cells from psoriatic patients during IL-10 therapy*. Eur J Immunol, 2004. **34**(2): p. 481-93.

59. Calzada-Wack, J.C., M. Frankenberger, and H.W. Ziegler-Heitbrock, *Interleukin-10 drives human monocytes to CD16 positive macrophages*. J Inflamm, 1996. **46**(2): p. 78-85.
60. Sulahian, T.H., et al., *Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155*. Cytokine, 2000. **12**(9): p. 1312-21.
61. Grutz, G., *New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression*. J Leukoc Biol, 2005. **77**(1): p. 3-15.
62. Takeda, K., et al., *Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils*. Immunity, 1999. **10**(1): p. 39-49.
63. Williams, L.M., et al., *Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation -a continuing puzzle*. Immunology, 2004. **113**(3): p. 281-92.
64. Yasukawa, H., et al., *IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages*. Nat Immunol, 2003. **4**(6): p. 551-6.
65. Donnelly, R.P., H. Dickensheets, and D.S. Finbloom, *The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes*. J Interferon Cytokine Res, 1999. **19**(6): p. 563-73.
66. Jung, M., *Mechanismen der immunomodulatorischen Wirkung von Interleukin-10 auf humane Monozyten*, in *Fakultät für Biowissenschaften*. 2003, Universität Witten/Herdecke. p. 131.
67. Lee, T.S. and L.Y. Chau, *Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice*. Nat Med, 2002. **8**(3): p. 240-6.
68. Kontoyiannis, D., et al., *Interleukin-10 targets p38 MAPK to modulate ARE-dependent TNF mRNA translation and limit intestinal pathology*. Embo J, 2001. **20**(14): p. 3760-70.
69. Maines, M.D., *The heme oxygenase system: update 2005*. Antioxid Redox Signal, 2005. **7**(11-12): p. 1761-6.
70. Drechsler, Y., et al., *Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effects of acute alcohol on IL-10 induction involving p38 MAPK activation in monocytes*. J Immunol, 2006. **177**(4): p. 2592-600.
71. Wagener, F.A., et al., *Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation*. Pharmacol Rev, 2003. **55**(3): p. 551-71.
72. Brune, B. and V. Ullrich, *Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase*. Mol Pharmacol, 1987. **32**(4): p. 497-504.
73. Otterbein, L.E., et al., *Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 422-8.
74. Sawle, P., et al., *Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs) attenuate the inflammatory response elicited by lipopolysaccharide in RAW264.7 murine macrophages*. Br J Pharmacol, 2005. **145**(6): p. 800-10.
75. Nakao, A., A.M. Choi, and N. Murase, *Protective effect of carbon monoxide in transplantation*. J Cell Mol Med, 2006. **10**(3): p. 650-71.
76. Tullius, S.G., et al., *Inhibition of ischemia/reperfusion injury and chronic graft deterioration by a single-donor treatment with cobalt-protoporphyrin for the induction of heme oxygenase-1*. Transplantation, 2002. **74**(5): p. 591-8.
77. Ferris, C.D., et al., *Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(3): p. 152-7.
78. Balla, G., et al., *Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium*. J Biol Chem, 1992. **267**(25): p. 18148-53.
79. Stocker, R., et al., *Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance*. Science, 1987. **235**(4792): p. 1043-6.
80. Otterbein, L.E., et al., *Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme*. Trends Immunol, 2003. **24**(8): p. 449-55.

81. Nakagami, T., et al., *A beneficial role of bile pigments as an endogenous tissue protector: anti-complement effects of biliverdin and conjugated bilirubin.* Biochim Biophys Acta, 1993. **1158**(2): p. 189-93.
82. Kinderlerer, A.R., et al., *Heme oxygenase-1 expression enhances vascular endothelial resistance to complement-mediated injury through induction of decay-accelerating factor: a role for increased bilirubin and ferritin.* Blood, 2009. **113**(7): p. 1598-607.
83. Kawashima, A., et al., *Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case.* Hum Pathol, 2002. **33**(1): p. 125-30.
84. Poss, K.D. and S. Tonegawa, *Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10925-30.
85. Nath, K.A., et al., *Heme protein-induced chronic renal inflammation: suppressive effect of induced heme oxygenase-1.* Kidney Int, 2001. **59**(1): p. 106-17.
86. Sass, G., et al., *Cooperative effect of biliverdin and carbon monoxide on survival of mice in immune-mediated liver injury.* Hepatology, 2004. **40**(5): p. 1128-35.
87. Soares, M.P., et al., *Immunoregulatory effects of HO-1: how does it work?* Curr Opin Pharmacol, 2009. **9**(4): p. 482-9.
88. Yachie, A., et al., *Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency.* J Clin Invest, 1999. **103**(1): p. 129-35.
89. Ezekowitz, R.A., et al., *Interaction of human monocytes, macrophages, and polymorphonuclear leukocytes with zymosan in vitro. Role of type 3 complement receptors and macrophage-derived complement.* J Clin Invest, 1985. **76**(6): p. 2368-76.
90. Wang, X.M., et al., *A new microcellular cytotoxicity test based on calcein AM release.* Hum Immunol, 1993. **37**(4): p. 264-70.
91. <http://www.eldan.biz/eMall/zoomEN.htm?shops/1903/14484-tb-siRNA.gif>.
92. Morgan, B.P. and A.K. Campbell, *The recovery of human polymorphonuclear leucocytes from sublytic complement attack is mediated by changes in intracellular free calcium.* Biochem J, 1985. **231**(1): p. 205-8.
93. Caspar-Bauguil, S., et al., *Chlamydia pneumoniae induces interleukin-10 production that down-regulates major histocompatibility complex class I expression.* J Infect Dis, 2000. **182**(5): p. 1394-401.
94. Moreau, P., et al., *IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes.* Int Immunol, 1999. **11**(5): p. 803-11.
95. Spittler, A., et al., *IL-10 augments CD23 expression on U937 cells and down-regulates IL-4-driven CD23 expression on cultured human blood monocytes: effects of IL-10 and other cytokines on cell phenotype and phagocytosis.* Immunology, 1995. **85**(2): p. 311-7.
96. Davies, A., et al., *CD59, an LY-6-like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex on homologous cells.* J Exp Med, 1989. **170**(3): p. 637-54.
97. Rollins, S.A., et al., *Inhibition of homologous complement by CD59 is mediated by a species-selective recognition conferred through binding to C8 within C5b-8 or C9 within C5b-9.* J Immunol, 1991. **146**(7): p. 2345-51.
98. Ramm, L.E., et al., *Elimination of complement channels from the plasma membranes of U937, a nucleated mammalian cell line: temperature dependence of the elimination rate.* J Immunol, 1983. **131**(3): p. 1411-5.
99. Pilzer, D., et al., *Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer.* Springer Semin Immunopathol, 2005. **27**(3): p. 375-87.
100. Spector, I., et al., *Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells.* Science, 1983. **219**(4584): p. 493-5.
101. Wang, N., et al., *Induction of xenograft accommodation by modulation of elicited antibody responses I 2.* Transplantation, 2002. **74**(3): p. 334-45.

102. Ricchetti, G.A., L.M. Williams, and B.M. Foxwell, *Heme oxygenase 1 expression induced by IL-10 requires STAT-3 and phosphoinositol-3 kinase and is inhibited by lipopolysaccharide*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(3): p. 719-26.
103. Petit-Bertron, A.F., et al., *Adherence influences monocyte responsiveness to interleukin-10*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(1): p. 145-54.
104. Mason, J.C., et al., *Induction of decay-accelerating factor by cytokines or the membrane-attack complex protects vascular endothelial cells against complement deposition*. Blood, 1999. **94**(5): p. 1673-82.
105. Moutabarrik, A., et al., *Cytokine-mediated regulation of the surface expression of complement regulatory proteins, CD46(MCP), CD55(DAF), and CD59 on human vascular endothelial cells*. Lymphokine Cytokine Res, 1993. **12**(3): p. 167-72.
106. Pasch, M.C., et al., *Transforming growth factor-beta isoforms regulate the surface expression of membrane cofactor protein (CD46) and CD59 on human keratinocytes [corrected]*. Eur J Immunol, 1999. **29**(1): p. 100-8.
107. Andoh, A., et al., *Tumour necrosis factor-alpha up-regulates decay-accelerating factor gene expression in human intestinal epithelial cells*. Immunology, 1997. **90**(3): p. 358-63.
108. Gasque, P. and B.P. Morgan, *Complement regulatory protein expression by a human oligodendrocyte cell line: cytokine regulation and comparison with astrocytes*. Immunology, 1996. **89**(3): p. 338-47.
109. Cocuzzi, E.T., et al., *Upregulation of DAF (CD55) on orbital fibroblasts by cytokines. Differential effects of TNF-beta and TNF-alpha*. Curr Eye Res, 2001. **23**(2): p. 86-92.
110. Jurianz, K., et al., *Neutralization of complement regulatory proteins augments lysis of breast carcinoma cells targeted with rhuAb anti-HER2*. Immunopharmacology, 1999. **42**(1-3): p. 209-18.
111. Macor, P., et al., *In vivo targeting of human neutralizing antibodies against CD55 and CD59 to lymphoma cells increases the antitumor activity of rituximab*. Cancer Res, 2007. **67**(21): p. 10556-63.
112. Golay, J., et al., *Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis*. Blood, 2000. **95**(12): p. 3900-8.
113. Blok, V.T., et al., *Cytokines affect resistance of human renal tumour cells to complement-mediated injury*. Scand J Immunol, 2003. **57**(6): p. 591-9.
114. Varsano, S., et al., *Cytokines modulate expression of cell-membrane complement inhibitory proteins in human lung cancer cell lines*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1998. **19**(3): p. 522-9.
115. Bjorge, L., T.S. Jensen, and R. Matre, *Characterisation of the complement-regulatory proteins decay-accelerating factor (DAF, CD55) and membrane cofactor protein (MCP, CD46) on a human colonic adenocarcinoma cell line*. Cancer Immunol Immunother, 1996. **42**(3): p. 185-92.
116. Spiller, O.B., et al., *Cytokine-mediated up-regulation of CD55 and CD59 protects human hepatoma cells from complement attack*. Clin Exp Immunol, 2000. **121**(2): p. 234-41.
117. Schmitt, C.A., et al., *Expression and regulation by interferon-gamma of the membrane-bound complement regulators CD46 (MCP), CD55 (DAF) and CD59 in gastrointestinal tumours*. Eur J Cancer, 1999. **35**(1): p. 117-24.
118. Longhi, M.P., et al., *CD59a deficiency exacerbates influenza-induced lung inflammation through complement-dependent and -independent mechanisms*. Eur J Immunol, 2007. **37**(5): p. 1266-74.
119. Otterbein, L., S.L. Sylvester, and A.M. Choi, *Hemoglobin provides protection against lethal endotoxemia in rats: the role of heme oxygenase-1*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1995. **13**(5): p. 595-601.

120. Wang, F., Z.J. Duan, and Y.J. Sun, *Influence of heme oxygenase-1 expression on immune liver fibrosis induced by cobalt protoporphyrin in rats*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(24): p. 3009-14.
121. Liu, Y., et al., *Heme oxygenase-1 plays an important protective role in experimental autoimmune encephalomyelitis*. Neuroreport, 2001. **12**(9): p. 1841-5.
122. Soares, M.P., et al., *Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival*. Nat Med, 1998. **4**(9): p. 1073-7.
123. Otterbein, L.E., A. May, and B.Y. Chin, *Carbon monoxide increases macrophage bacterial clearance through Toll-like receptor (TLR)4 expression*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2005. **51**(5): p. 433-40.
124. Jackson, J.R., et al., *The role of platelet activating factor and other lipid mediators in inflammatory angiogenesis*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1392**(1): p. 145-52.
125. Takahashi, K., et al., *Suppression of heme oxygenase-1 mRNA expression by interferon-gamma in human glioblastoma cells*. J Neurochem, 1999. **72**(6): p. 2356-61.
126. Zauberman, A., et al., *Stress activated protein kinase p38 is involved in IL-6 induced transcriptional activation of STAT3*. Oncogene, 1999. **18**(26): p. 3886-93.
127. Mashreghi, M.F., et al., *Inhibition of dendritic cell maturation and function is independent of heme oxygenase 1 but requires the activation of STAT3*. J Immunol, 2008. **180**(12): p. 7919-30.
128. Loboda, A., et al., *Heme oxygenase-1-dependent and -independent regulation of angiogenic genes expression: effect of cobalt protoporphyrin and cobalt chloride on VEGF and IL-8 synthesis in human microvascular endothelial cells*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2005. **51**(4): p. 347-55.
129. Moskovich, O. and Z. Fishelson, *Live cell imaging of outward and inward vesiculation induced by the complement c5b-9 complex*. J Biol Chem, 2007. **282**(41): p. 29977-86.
130. Scolding, N.J., et al., *Vesicular removal by oligodendrocytes of membrane attack complexes formed by activated complement*. Nature, 1989. **339**(6226): p. 620-2.
131. Satta, N., et al., *Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide*. J Immunol, 1994. **153**(7): p. 3245-55.
132. Doherty, G.J. and H.T. McMahon, *Mechanisms of endocytosis*. Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 857-902.
133. Lanzetti, L., *Actin in membrane trafficking*. Curr Opin Cell Biol, 2007. **19**(4): p. 453-8.
134. Fujimoto, L.M., et al., *Actin assembly plays a variable, but not obligatory role in receptor-mediated endocytosis in mammalian cells*. Traffic, 2000. **1**(2): p. 161-71.
135. Allavena, P., et al., *IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages*. Eur J Immunol, 1998. **28**(1): p. 359-69.
136. Montaner, L.J., et al., *Type 1 and type 2 cytokine regulation of macrophage endocytosis: differential activation by IL-4/IL-13 as opposed to IFN-gamma or IL-10*. J Immunol, 1999. **162**(8): p. 4606-13.
137. Pemberton, M., et al., *Microvascular effects of complement blockade with soluble recombinant CR1 on ischemia/reperfusion injury of skeletal muscle*. J Immunol, 1993. **150**(11): p. 5104-13.
138. Luo, W. and D.P. Vik, *Regulation of complement factor H in a human liver cell line by interferon-gamma*. Scand J Immunol, 1999. **49**(5): p. 487-94.
139. Williams, S.A. and D.P. Vik, *Characterization of the 5' flanking region of the human complement factor H gene*. Scand J Immunol, 1997. **45**(1): p. 7-15.
140. Nasu, J., et al., *Cytokine-stimulated release of decay-accelerating factor (DAF; CD55) from HT-29 human intestinal epithelial cells*. Clin Exp Immunol, 1998. **113**(3): p. 379-85.

141. Fishelson, Z., G. Attali, and D. Mevorach, *Complement and apoptosis*. Mol Immunol, 2001. **38**(2-3): p. 207-19.
142. Nauta, A.J., et al., *The membrane attack complex of complement induces caspase activation and apoptosis*. Eur J Immunol, 2002. **32**(3): p. 783-92.
143. Doonan, F. and T.G. Cotter, *Morphological assessment of apoptosis*. Methods, 2008. **44**(3): p. 200-4.
144. Palma, P.F., et al., *Evaluation of annexin V and Calcein-AM as markers of mononuclear cell apoptosis during human immunodeficiency virus infection*. Braz J Infect Dis, 2008. **12**(2): p. 108-14.
145. Attali, G., D. Gancz, and Z. Fishelson, *Increased sensitivity of early apoptotic cells to complement-mediated lysis*. Eur J Immunol, 2004. **34**(11): p. 3236-45.
146. Cohen, S.B., et al., *Interleukin-10 rescues T cells from apoptotic cell death: association with an upregulation of Bcl-2*. Immunology, 1997. **92**(1): p. 1-5.
147. Weber-Nordt, R.M., et al., *Interleukin-10 increases Bcl-2 expression and survival in primary human CD34+ hematopoietic progenitor cells*. Blood, 1996. **88**(7): p. 2549-58.
148. Mevorach, D., et al., *Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages*. J Exp Med, 1998. **188**(12): p. 2313-20.
149. Mold, C., H. Gewurz, and T.W. Du Clos, *Regulation of complement activation by C-reactive protein*. Immunopharmacology, 1999. **42**(1-3): p. 23-30.
150. Gershov, D., et al., *C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity*. J Exp Med, 2000. **192**(9): p. 1353-64.
151. Bohnenkamp, H.R., et al., *Apoptosis of monocytes and the influence on yield of monocyte-derived dendritic cells*. J Immunol Methods, 2004. **294**(1-2): p. 67-80.
152. Eslick, J., et al., *IL-4 and IL-10 inhibition of spontaneous monocyte apoptosis is associated with Flip upregulation*. Inflammation, 2004. **28**(3): p. 139-45.
153. Schmidt, M., et al., *IL-10 induces apoptosis in human monocytes involving the CD95 receptor/ligand pathway*. Eur J Immunol, 2000. **30**(6): p. 1769-77.
154. Hashimoto, S.I., et al., *IL-10 inhibits granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent human monocyte survival at the early stage of the culture and inhibits the generation of macrophages*. J Immunol, 2001. **167**(7): p. 3619-25.
155. Wang, Z.Q., et al., *Interleukin-10 induces macrophage apoptosis and expression of CD16 (FcγRIII) whose engagement blocks the cell death programme and facilitates differentiation*. Immunology, 2001. **102**(3): p. 331-7.
156. Wiesmann, C., et al., *Structure of C3b in complex with CRIg gives insights into regulation of complement activation*. Nature, 2006. **444**(7116): p. 217-20.
157. He, J.Q., C. Wiesmann, and M. van Lookeren Campagne, *A role of macrophage complement receptor CRIg in immune clearance and inflammation*. Mol Immunol, 2008. **45**(16): p. 4041-7.
158. Carney, D.F., C.H. Hammer, and M.L. Shin, *Elimination of terminal complement complexes in the plasma membrane of nucleated cells: influence of extracellular Ca²⁺ and association with cellular Ca²⁺*. J Immunol, 1986. **137**(1): p. 263-70.
159. Baker, P.J., et al., *C567-initiated cytolysis of lymphoid cells: description of the phenomenon and studies on its control by C567 inhibitors*. J Immunol, 1977. **118**(1): p. 198-202.
160. Kraus, S., R. Seger, and Z. Fishelson, *Involvement of the ERK mitogen-activated protein kinase in cell resistance to complement-mediated lysis*. Clin Exp Immunol, 2001. **123**(3): p. 366-74.

161. Boyle, M.D., S.H. Ohanian, and T. Borsos, *Studies on the terminal stages of antibody-complement-mediated killing of a tumor cell. II. Inhibition of transformation of T to dead cells by 3'5' cAMP*. J Immunol, 1976. **116**(5): p. 1276-9.
162. Kaliner, M. and K.F. Austen, *Adenosine 3'5'-monophosphate: inhibition of complement-mediated cell lysis*. Science, 1974. **183**(125): p. 659-61.
163. Papadimitriou, J.C., D.F. Carney, and M.L. Shin, *Inhibitors of membrane lipid metabolism enhance complement-mediated nucleated cell killing through distinct mechanisms*. Mol Immunol, 1991. **28**(8): p. 803-9.
164. Vakeva, A.P., et al., *Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 therapy*. Circulation, 1998. **97**(22): p. 2259-67.
165. Weisman, H.F., et al., *Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis*. Science, 1990. **249**(4965): p. 146-51.
166. Zhou, W., et al., *Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury*. J Clin Invest, 2000. **105**(10): p. 1363-71.
167. Platt, J.L., *The immunological barriers to xenotransplantation*. Crit Rev Immunol, 1996. **16**(4): p. 331-58.
168. Seelen, M.A., A. Roos, and M.R. Daha, *Role of complement in innate and autoimmunity*. J Nephrol, 2005. **18**(6): p. 642-53.
169. Munoz, L.E., et al., *Apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. Lupus, 2008. **17**(5): p. 371-5.
170. Ismail, H.F., et al., *Role for complement in development of Helicobacter-induced gastritis in interleukin-10-deficient mice*. Infect Immun, 2003. **71**(12): p. 7140-8.
171. Kawamura, K., et al., *Secretion of interleukin-10 from murine colon carcinoma cells suppresses systemic antitumor immunity and impairs protective immunity induced against the tumors*. Cancer Gene Ther, 2002. **9**(1): p. 109-15.
172. Gastl, G.A., et al., *Interleukin-10 production by human carcinoma cell lines and its relationship to interleukin-6 expression*. Int J Cancer, 1993. **55**(1): p. 96-101.
173. Zhao, W.P., et al., *Neutralization of complement regulatory proteins CD55 and CD59 augments therapeutic effect of herceptin against lung carcinoma cells*. Oncol Rep, 2009. **21**(6): p. 1405-11.
174. Ellison, B.S., M.K. Zanin, and R.J. Boackle, *Complement susceptibility in glutamine deprived breast cancer cells*. Cell Div, 2007. **2**: p. 20.
175. Sica, A., A. Saccani, and A. Mantovani, *Tumor-associated macrophages: a molecular perspective*. Int Immunopharmacol, 2002. **2**(8): p. 1045-54.
176. Dinapoli, M.R., C.L. Calderon, and D.M. Lopez, *The altered tumoricidal capacity of macrophages isolated from tumor-bearing mice is related to reduce expression of the inducible nitric oxide synthase gene*. J Exp Med, 1996. **183**(4): p. 1323-9.
177. Mantovani, A., et al., *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. Trends Immunol, 2002. **23**(11): p. 549-55.
178. Lin, E.Y., et al., *Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy*. J Exp Med, 2001. **193**(6): p. 727-40.
179. Nowicki, A., et al., *Impaired tumor growth in colony-stimulating factor 1 (CSF-1)-deficient, macrophage-deficient op/op mouse: evidence for a role of CSF-1-dependent macrophages in formation of tumor stroma*. Int J Cancer, 1996. **65**(1): p. 112-9.
180. Zeisberger, S.M., et al., *Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach*. Br J Cancer, 2006. **95**(3): p. 272-81.

181. Miselis, N.R., et al., *Targeting tumor-associated macrophages in an orthotopic murine model of diffuse malignant mesothelioma*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(4): p. 788-99.
182. Leek, R.D., et al., *Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast*. Br J Cancer, 1999. **79**(5-6): p. 991-5.
183. Hamada, I., et al., *Clinical effects of tumor-associated macrophages and dendritic cells on renal cell carcinoma*. Anticancer Res, 2002. **22**(6C): p. 4281-4.
184. Lissbrant, I.F., et al., *Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival*. Int J Oncol, 2000. **17**(3): p. 445-51.
185. Hanada, T., et al., *Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer*. Int J Urol, 2000. **7**(7): p. 263-9.
186. Ohno, S., et al., *The degree of macrophage infiltration into the cancer cell nest is a significant predictor of survival in gastric cancer patients*. Anticancer Res, 2003. **23**(6D): p. 5015-22.
187. Forssell, J., et al., *High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(5): p. 1472-9.
188. Sickert, D., et al., *Characterization of macrophage subpopulations and microvessel density in carcinomas of the gastrointestinal tract*. Anticancer Res, 2007. **27**(3B): p. 1693-700.
189. Lackner, C., et al., *Prognostic relevance of tumour-associated macrophages and von Willebrand factor-positive microvessels in colorectal cancer*. Virchows Arch, 2004. **445**(2): p. 160-7.
190. Dave, S.S., et al., *Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells*. N Engl J Med, 2004. **351**(21): p. 2159-69.
191. Sacconi, A., et al., *p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance*. Cancer Res, 2006. **66**(23): p. 11432-40.
192. Hagemann, T., et al., *Regulation of macrophage function in tumors: the multifaceted role of NF-kappaB*. Blood, 2009. **113**(14): p. 3139-46.
193. Guiducci, C., et al., *Redirecting in vivo elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection*. Cancer Res, 2005. **65**(8): p. 3437-46.
194. Sinha, P., V.K. Clements, and S. Ostrand-Rosenberg, *Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease*. J Immunol, 2005. **174**(2): p. 636-45.
195. Robinson, S.C., et al., *A chemokine receptor antagonist inhibits experimental breast tumor growth*. Cancer Res, 2003. **63**(23): p. 8360-5.

10 Danksagung

Mein erster und ganz besonderer Dank geht an Prof. Dr. Hans-Dieter Volk für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Anfertigung der Doktorarbeit in seinem Institut. Mein zweiter und ebenfalls ganz besonderer Dank gilt Dr. Gerald Grütz für die ausgezeichnete Betreuung, sei es durch Einführung in das FACS-Gerät, durch tatkräftige Unterstützung bei den shRNA-Experimenten oder durch die regelmäßigen „Krisensitzungen“ beim Auftreten unerwarteter Ergebnisse, die so manches Problem lösen konnten.

Weiterhin möchte ich mich insbesondere bei Marcel Krüger bedanken, der mich mit vielen Tricks und Tipps über PBMC-Präparation, Western Blot Analysen oder Monozyten-Behandlung in die Laborarbeit eingeführt hat. Auch bei Katrin Bossmann, Katrin Kopplin, Nadine Nippe, Nimisha Suman und Sandra Naundorf möchte ich mich für die sehr gute und produktive Laboratmosphäre, für die fachliche Unterstützung und für die lustigen Gespräche in der Mensa bedanken.

Ich danke der AG Kurtz für die Möglichkeit der Nutzung des Tecan-Fluoreszenz-Readers und besonders auch Gorden Brestrich, der mir bei Problemen mit dem Calcein-Assay ein paar wesentliche Hinweise gegeben hat. Ebenso möchte ich der AG Meisel, dem gesamten Team des Instituts für Medizinische Immunologie, einschließlich Christa Liebenthal und Kristin Neuhaus und dem DRFZ für die Mitbenutzung des Li-Cor-Image-Readers herzlich danken.

Mein Dank gilt auch der Bayer Schering Pharma AG und insbesondere Herrn Prof. Dr. Khusru Asadullah für die gute Kooperation und Unterstützung, ohne diese die Realisation des Projektes vielleicht nicht möglich gewesen wäre. Ferner möchte ich Herrn Prof. Dulak sehr für die Bereitstellung der HO^{-/-}-Mäuse und für den herzlichen Empfang in Krakau danken.

Eine große Unterstützung war mir meine Familie, der ich ganz herzlich für das Anhören und Diskutieren meiner Probleme, das Korrigieren der Orthographie und alle weiteren Hilfen danke. Auch an Phil und meine Freunde geht ein großes Dankeschön.

Gedankt sei außerdem allen Freunden und Kollegen, die mir bereitwillig ihr Blut für die Gewinnung von unzähligen Monozyten gespendet haben.

11 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

12 Publikationsliste

- April 2009 Koch N. and Jung M., Sabat R., Krätzschar J., Döcke W.-D., Asadullah K., Volk H.-D. and Grütz G., *IL-10 protects monocytes and macrophages from complement mediated lysis*, J Leukoc Biol, 2009 Jul; 86(1): 155-66.
Epub 2009 Apr 22.
- März 2007 Vortrag auf der Leiden International Medical Student Conference, Leiden, Niederlande
- September 2006 Posterpräsentation (PA-3009) auf dem 1st European Congress of Immunology in Paris, Frankreich

13 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Nadine Koch, geb. am 24.01.81, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Interleukin-10 vermittelter Schutz vor Komplementlyse in Monozyten und Makrophagen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift