

**Aus der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und  
Jugendmedizin Tübingen**

**Abteilung Kinderheilkunde IV mit Poliklinik  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Ch. F. Poets**

**Wirkungen des Pancaspase-Inhibitors  
zVAD-FMK auf die Apoptose von Makrophagen und  
Lymphozyten**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Jutta Sinikka Bauhammer, geb. Schröter  
aus Mutlangen**

**2005**

Dekan:

Professor Dr. C.D. Claussen

1. Berichtstatter:

Professor Dr. Ch.F. Poets

2. Berichtstatter:

Privatdozent Dr. C. Belka

*Meinem Mann,*

*für seine Unterstützung, seine Liebe und  
dafür, dass er an mich glaubt*

---

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1 EINLEITUNG</b> .....	1
1.1 Immunsystem	
1.1.1 Allgemeines .....	1
1.1.2 Makrophagen und Lymphozyten .....	1
1.1.3 Untersuchte Zelloberflächenmoleküle und die CD-Nomenklatur .....	4
1.2 Zelltod	
1.2.1 Nekrose und Apoptose .....	10
1.2.2 Apoptose: Molekulare Mechanismen und die Caspasefamilie	
1.2.2.1 Molekulare Mechanismen .....	12
1.2.2.2 Die Caspasefamilie .....	15
1.2.2.3 Caspaseunabhängige Apoptosewege .....	16
1.2.2.4 Die Umverteilung von Phosphatidyl-Serin in der Zellmembran ...	17
1.2.3 Apoptosehemmung durch Caspase-Inhibitoren: zVAD-FMK.....	17
1.3 Apoptose im Immunsystem: Vorkommen und Bedeutung .....	19
1.4 Die Interaktion zwischen Makrophagen und T-Zellen .....	21
1.5 Das Immunsystem des Neugeborenen.....	23
1.6 Ziel der Arbeit.....	24
<b>2 MATERIAL</b> .....	25
2.1 Patienten und Zellen .....	25
2.2 Chemikalien und Reagenzien .....	25
2.3 Material für die Durchflusszytometrie .....	26
2.4 Geräte.....	27
2.5 Glas- und Plastikmaterial .....	28
<b>3 METHODEN</b> .....	29
3.1 Gewinnung von mononukleären Zellen (MNC) .....	29
3.2 Zellzahlbestimmung .....	29
3.3 Caspase-Inhibition .....	30

---

3.4	Zellkultur und Stimulation.....	31
3.5	Durchflusszytometrie	
3.5.1	Prinzip der Durchflusszytometrie .....	32
3.5.2	Immunfluoreszenzfärbung .....	33
3.5.3	Messung und Auswertung .....	34
3.6	Apoptose-Detektion	
3.6.1	Vorwärts-, Seitwärtsstreulicht (FSC, SSC) apoptotischer Zellen .....	39
3.6.2	Färbung mit Annexin V .....	41
3.6.3	Färbung mit Propidiumiodid.....	42
3.7	Zellfunktionstests	
3.7.1	Makrophagenstimulation mit LPS .....	43
3.7.2	T-Zelldeletion und –stimulation mit OKT3.....	44
3.7.3	Deletion der CD4 T-Zellen mit ch412.....	46
3.8	Überprüfung einer möglichen DMSO-Wirkung.....	47
3.9	Statistik .....	48
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>49</b>
4.1	Abnahme des Makrophagenanteils durch zVAD-FMK.....	49
4.2	Änderung von Makrophagengröße und –granularität.....	51
4.3	Färbung mit Annexin V und Propidiumiodid .....	54
4.4	Regulation des CD14-Oberflächenmoleküls .....	56
4.5	Zeitliche Abfolge der geschilderten Ergebnisse .....	58
4.6	Wirkung von zVAD-FMK auf andere Oberflächenmoleküle der Makro- phagen	
4.6.1	MHC Klasse I- und MHC Klasse II-Moleküle (HLA-DR).....	62
4.6.2	Moleküle der B7-Familie (CD86, CD80) .....	63
4.6.3	Das CD16-Oberflächenmolekül (Fcγ-Rezeptor-III).....	65
4.7	Wirkung von zVAD-FMK auf Lymphozyten	
4.7.1	Absolute Lymphozytenzahl und Prozentanteile einzelner Lympho- zytensubpopulationen.....	66
4.7.2	Regulation des CD4-Moleküls .....	67

---

4.7.3	Expression von anderen lymphozyttypischen Oberflächenmolekülen .....	68
4.7.4	Färbung der Lymphozyten mit Annexin V und Propidiumiodid .....	69
4.8	Untersuchung der CD95- und CD95Ligand-Expression .....	70
4.9	Einfluss von Lipopolysaccharid auf die Makrophagenapoptose durch zVAD-FMK.....	71
4.10	Keine verstärkte Interferon- $\gamma$ -Produktion durch zVAD-FMK.....	75
4.11	zVAD-FMK und das T-Zellmitogen OKT3 (antiCD3-Antikörper)	
4.11.1	Einfluss von zVAD-FMK auf T-Zelldeletion und -proliferation durch OKT3 .....	76
4.11.2	Regulation von CD28.....	78
4.11.3	Wirkung von OKT3 und zVAD-FMK auf die Makrophagen .....	79
4.12	Wirkung von zVAD-FMK auf die CD4 T-Zelldeletion durch ch412 (monoklonaler Antikörper gegen CD4)	
4.12.1	Hemmung der ch412-induzierten CD4 T-Zellapoptose.....	81
4.12.2	Regulation der CD4-, CD3- und CD28-Expression von CD4 T-Zellen.....	84
4.12.3	Einfluss von ch412 auf die Makrophagen .....	86
4.13	Ergebnisse der Zellkulturen mit dem Caspase-Family Inhibitor Set.....	87
4.14	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	89
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>90</b>
5.1	Zur Methodik	
5.1.1	Zellkultur und Durchflusszytometrie.....	90
5.1.2	Apoptose-Detektion .....	93
5.1.3	Caspase-Inhibitoren .....	95
5.2	Zu den Ergebnissen	
5.2.1	Wirkung von zVAD-FMK auf Makrophagen und Lymphozyten.....	96
5.2.2	Zur Makrophagenaktivierung mit Lipopolysaccharid.....	103
5.2.3	Zur Stimulation mit OKT3 .....	104
5.2.4	Zur Wirkung von ch412.....	105

---

5.3	Unterschiede zwischen adulten und neonatalen Zellen .....	107
5.4	Schlussfolgerung .....	109
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>111</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>113</b>
7.1	Literaturverzeichnis .....	113
7.2	Veröffentlichungen .....	133
<b>8</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>135</b>
8.1	Verzeichnis der Abbildungen .....	135
8.2	Verzeichnis der Tabellen .....	136
8.3	Verzeichnis der Abkürzungen .....	137
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>140</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>142</b>

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Immunsystem

#### 1.1.1 Allgemeines

Das Immunsystem schützt unseren Körper sowohl vor körperfremden Eindringlingen als auch vor überalterten und entarteten körpereigenen Zellen (Tumor-, Autoimmunzellen). Es besteht aus einem Netzwerk von Organen und Gefäßsystemen, die schützende Zellen und Moleküle bilden und im Körper verteilen.

Es werden zwei Anteile unterschieden: Das angeborene, unspezifische Immunsystem und die erworbene, spezifische Immunität. Letztere wird erst nach einem Erstkontakt aktiv, bildet dann aber Gedächtniszellen aus und kann bei einem erneutem Erregerkontakt schnell und effektiv eingreifen. Beide Systeme arbeiten eng zusammen, und es gibt Zellen, die Aufgaben sowohl für die spezifische als auch für die unspezifische Immunität erfüllen.

#### 1.1.2 Makrophagen und Lymphozyten

(Die in diesem Abschnitt erwähnten Rezeptoren und CD-Moleküle (CD engl. für „cluster of differentiation“) werden unter 1.1.3 genauer erläutert.)

Ein wichtiges (zelluläres) Bindeglied zwischen unspezifischer und spezifischer Immunität bilden die Makrophagen. Sie werden als Teil des unspezifischen Immunsystems angesehen, kommunizieren aber rege mit Lymphozyten, den Hauptzellen des spezifischen Immunsystems. Beide Zellarten gehören zu den Leukozyten (weiße Blutkörperchen), die von Vorläuferzellen im Knochenmark abstammen, dort oder in den lymphatischen Organen heranreifen und schließlich im Blut durch den Körper wandern.

---

Makrophagen erfüllen ein breites Spektrum an Aufgaben. Während einer Abwehrreaktion werden sie durch chemotaktische Stoffe ins Entzündungsgebiet gelockt. Dort erkennen sie eingedrungene Pathogene über Rezeptoren an bestimmten Makromolekülen wie z.B. dem Lipopolysaccharid auf gramnegativen Bakterien („pattern recognizing receptors“) oder an bereits gebundenen Antikörpern (Fc-Rezeptoren). Sie binden die angreifenden Organismen über diese Strukturen, phagozytieren sie und „verdauen“ ihre Bestandteile im Zellinneren. Auf gleiche Art und Weise eliminieren die Makrophagen auch infizierte, mit Antikörpern markierte, entartete oder überalterte körpereigene Zellen sowie apoptotische Zelltrümmer. Das phagozytierte Material prozessieren die Makrophagen im Zellinneren, binden seine antigenen Bestandteile an spezielle Rezeptoren (MHC-Moleküle, siehe unter 1.1.3) und präsentieren sie anderen Immunzellen, v.a. Lymphozyten, auf der Zelloberfläche.

Abgesehen von der Phagozytoseaktivität bilden Makrophagen antimikrobiell wirkende Sauerstoffradikale und sezernieren eine Vielzahl von Botenstoffen und Enzymen, die das Verhalten anderer Immunzellen modulieren bzw. die Wundheilung unterstützen (Zytokine – v.a. IL-12, IL-1, IL-6 und TNF $\alpha$ , Wachstums-, Gerinnungsfaktoren, Komplementprodukte, Prostaglandine, diverse Proteasen / Hydrolasen, Lysozym u.a.).

(Aus: Perera & Waldmann, 1998, Smith et al., 2001)

Lymphozyten sind die hauptausführenden Zellen des spezifischen Immunsystems. Sie zeichnen sich im Gegensatz zu den Zellen der unspezifischen Immunität dadurch aus, dass sie Rezeptoren für je ein spezifisches Antigen exprimieren. Durch Kontakt mit diesem Antigen werden sie aktiviert, proliferieren und bilden einen Klon aktivierter, spezifisch gegen das jeweilige Antigen gerichteter Zellen (Altman & Lippolis, 2001).

Der größte Teil der im Körper vorhandenen Lymphozyten zirkuliert im peripheren Blut. Dort finden sich drei Subtypen in unterschiedlicher Häufigkeit: Bei gesunden Erwachsenen sind ca. 80% T-Zellen, 5-10% B-Lymphozyten und 10-15% NK-Zellen (Lewis & Harriman, 2001).

T-Zellen tragen als allgemeinen Marker das CD3-Molekül und den für jeden T-Zellklon spezifischen T-Zellrezeptor (TCR) zur Antigenerkennung. T-Zellen sind für eine Aktivierung auf professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) wie Makrophagen oder B-Lymphozyten angewiesen, die ihnen außer dem prozessierten Antigen ein zweites Signal in Form von kostimulierenden Molekülen (CD80, CD86) anbieten.

Nach Funktion und der Expression von bestimmten Oberflächenmolekülen werden folgende T-Zellarten unterschieden:

1) T-Helferzellen: Sie exprimieren abgesehen von CD3 das Membranmolekül CD4 und erkennen Antigene, die über MHC Klasse II-Moleküle präsentiert werden. T-Helferzellen führen keine direkten Effektorfunktionen gegen die Pathogene aus, sondern übernehmen essentielle Aufgaben für die Aktivierung und Unterstützung der anderen beteiligten Immunzellen. Durch Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen entwickelt sich die T-Helferzelle je nach Zytokinumgebung, Art des Antigens und eigener genetischer Ausstattung zu Th1- oder Th2-Zellen mit Aufgaben innerhalb der zellulären (Th1) bzw. humoralen (Th2) Immunantwort.

(Aus: Eagar et al., 2001, Koretzky & Peterson, 2001, Budd & Fortner, 2001)

2) Zytotoxische T-Zellen: Zytotoxische T-Zellen exprimieren zusätzlich zu CD3 das Oberflächenmolekül CD8 und werden durch Antigene aktiviert, die ihnen über MHC Klasse I-Moleküle präsentiert werden. Sie sind Teil der zellulären Immunantwort, binden an infizierte oder anderweitig unerwünschte Zellen und induzieren deren Apoptose. Dazu exprimieren die zytotoxischen T-Zellen bestimmte Todesliganden, allen voran den CD95Ligand (vergleiche auch 1.1.3 und 1.2.2.1). Zellen, die für diese Liganden nicht sensibel sind, töten sie über sezerniertes Perforin und Granzym B. Diese bilden Poren in die Zellmembran der Zielzelle (Perforin) und aktivieren in ihrem Zytoplasma die Effektorcaspase drei (Granzym B, vergleiche auch 1.2.2.3).

(Aus: Altman & Lippolis, 2001, Koretzky & Peterson, 2001, Budd & Fortner, 2001, Degterev et al., 2003)

3) NKT-Zellen: Sie bilden eine kleine Sondergruppe der T-Zellen (ca. 5%), die zum größten Teil weder CD4 noch CD8 exprimiert. NKT-Zellen können direkt auf Antigene reagieren und sind nicht auf deren Präsentation durch MHC-Moleküle angewiesen. Sie wirken v.a. gegen autoreaktive Immunzellen (Seaman, 2001).

B-Lymphozyten erkennen Antigene über spezifische, membrangebundene Antikörper. Nach Aktivierung differenzieren sie sich weiter zu sog. Plasmazellen, die als Effektoren der humoralen Immunantwort Antikörper gegen das spezifische Antigen bilden (Lewis & Harriman, 2001, Schroeder et al., 2001).

Natürliche Killerzellen tragen keine antigenspezifischen Rezeptoren, sondern zeichnen sich durch unspezifische zytotoxische Aktivität v.a. gegen virusinfizierte und entartete Zellen aus. Wie zytotoxische T-Zellen können sie über Todesliganden wie CD95L oder die Sekretion von Perforin und Granzym A/B in diesen Zellen Apoptose induzieren (Seaman, 2001).

### **1.1.3 Untersuchte Zelloberflächenmoleküle und die CD-Nomenklatur**

Die Immunzellen zeichnen sich durch die Expression von jeweils charakteristischen Zelloberflächenmolekülen aus, die in der CD-Nomenklatur (CD = engl. „cluster of differentiation“) klassifiziert werden. Anhand dieser Moleküle können Zelltyp und Funktionszustand einer Zellpopulation identifiziert werden (Lewis & Jackson, 1992, Mason et al., 2001).

Die in dieser Arbeit untersuchten Moleküle sollen im Folgenden bezüglich ihrer Zellverteilung und Funktion skizziert werden. In Tabelle 1.1 findet sich eine kurze Übersicht.

<b>Molekül</b>	<b>weitere Namen</b>	<b>Molekulare Masse (kDa), Familie</b>	<b>Expimierende Zellen</b>	<b>Funktion(en)</b>
CD3	T3, Leu-4	Besteht aus drei Polypeptidketten: $\gamma$ , 25-28; $\delta$ , 20; $\epsilon$ , 20; Ig-Superfamilie	Thymozyten, T-Zellen, NK1-T-Zellen	Signaltransduktion nach Antigenerkennung durch den T-Zellrezeptor
CD4	T4, Leu-3, L3T4(Maus), W3/25	55; Ig-Superfamilie	Untergruppen der Thymozyten, Th1- und Th2-Zellen, Monozyten, Makrophagen	Korezeptor für MCH-II; Signaltransduktion; Rezeptor für HIV-1 und HIV-2 gp120
CD8	T8, Leu-2, Lyt3	Besteht aus zwei 34kDa Ketten als $\alpha\alpha$ - oder $\alpha\beta$ -Dimer; Ig-Superfamilie	Untergruppen der Thymozyten, zytotoxische T-Zellen	Korezeptor für MHC-I; Signaltransduktion
CD14	LPS-Rezeptor; Leu M3, Mo2	53-55	Monozyten, Makrophagen, schwach auf Granulozyten	Rezeptor für LPS-LBP-Komplexe; Aktivierung von Monozyten / Makrophagen
CD16	FcRIII, Leu II	50-80, Transmembrankölib; Ig-Superfamilie	NK-Zellen, Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen	Niedrigaffiner Fcy-Rezeptor: ADCC, Aktivierung der NK-Zellen
CD19	Leu 12, B4	95; Ig-Superfamilie	Gesamte B-Zelllinie (außer Plasmazellstadium)	Korezeptor für B-Zellen, Aktivierung und Regulation der B-Zellen

CD28	Tp44, T44	Homodimer aus 44kDa-Ketten; Ig-Superfamilie	CD3 <sup>+</sup> Thymozyten, periphere T-Zellen, Plasmazellen (Funktion unbekannt)	T-Zellrezeptor für die kostimulierenden Moleküle CD80 und CD86
CD56	Leu-19, NKH1, NCAM	Heterodimer aus 175 - 220kDa-Ketten; Ig-Superfamilie	NK-Zellen, Untergruppe der T-Zellen, Nervenzellen	Adhäsionsmolekül
CD80	B7.1, BB1	60; Ig-Superfamilie	aktivierte B-Zellen, Monozyten / Makrophagen	Kostimulator, Ligand für CD28 und CTLA-4
CD86	B7.2, FUN-1, GR65	80; Immunglobulin	Monozyten / Makrophagen, aktivierte B-Zellen, dendritische Zellen	Ligand für CD28 und CTLA-4, Hauptkostimulator
CD95	Apo-1, Fas	45, 90, >200; TNF-Rezeptor-Superfamilie	Vielzahl von Zelllinien, stark auf aktivierten T- / B-Zellen	Bindet CD95L, Apoptose-induktion
CD95Ligand (CD95L)	Fas-Ligand (FasL)	Trimer; TNF-Familie	T-Zellen, NK-Zellen Makrophagen, aktivierte Th1-Zellen	Ligand für CD95, Bindung führt zur Apoptoseinduktion
MHC-I	HLA Klasse I (Gene HLA-A, -B, -C)	Heterodimer aus ~44kDa Kette und $\beta_2$ -Mikroglobulin (12kDa)	Fast alle kernhaltigen Zellen; stark auf T-, B-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen	Präsentation von Antigen intrazellulären Ursprungs für CD8 T-Zellen
MHC-II	HLA Klasse II (Gene HLA-DP, -DQ, -DR)	Heterodimer aus ~33kDa und ~31kDa-Ketten	Limitiert auf B-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen, Thymusepithelzellen	Präsentation von Antigenen extrazellulären Ursprungs an CD4 T-Zellen

Tabelle 1.1: Übersicht über die untersuchten Zelloberflächenmoleküle

Aufgeführt sind untersuchte Zelloberflächenmoleküle von Makrophagen und verschiedenen Lymphozytensubpopulationen mit ihrem Name nach der CD-Nomenklatur, weiteren Bezeichnungen, Größe, Familie, Zellverteilung und Funktion. (Aus: Sell & Max, 2001, Acton, 2001, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PROW>)

**CD3:** Das CD3-Molekül gilt als allgemeiner Marker für T-Zellen. Es ist als invarianter Polypeptidkomplex mit dem antigenspezifischen T-Zellrezeptor (TCR) assoziiert und wird nach dessen Bindung an präsentierte Antigene für die Signaltransduktion ins Zellinnere benötigt (Roitt et al., 2001, Lewis & Rickman, 1992).

**CD4 und CD8:** CD4 und CD8 sind auf T-Helferzellen bzw. zytotoxischen T-Zellen (vergleiche 1.1.2) zu finden und fungieren als Korezeptoren zum TCR. Sie binden seitlich an die antigenpräsentierenden MHC-Moleküle und stabilisieren dadurch die TCR-Antigen-MHC-Bindung (Janeway et al., 2001, Lewis & Jackson, 1992).

**CD19:** CD19 gilt als Marker für B-Lymphozyten. Es wird abgesehen vom Plasmazellstadium während der gesamten B-Zellentwicklung exprimiert und fungiert als Korezeptor zur B-Zellaktivierung (Schroeder et al., 2001).

**CD56:** Die Funktion des CD56-Moleküls ist noch unklar. Es dient als Adhäsionsmolekül für Nervenzellen und übernimmt bei den Immunzellen wahrscheinlich ähnliche Aufgaben. Zusammen mit dem CD16-Molekül gilt es als Marker für Natürliche Killerzellen, die CD56 in vergleichsweise starker Intensität exprimieren (Seaman, 2001).

**CD14:** CD14 wird als Marker für reife Monozyten und jüngere Makrophagen angesehen, die es als Rezeptor für Lipopolysaccharid (LPS, Bestandteil gramnegativer Bakterien) in hoher Dichte exprimieren. Die Bindung von LPS führt zur Aktivierung der Makrophagen (Wright et al., 1990). Daneben dient das

CD14-Molekül der Erkennung und Phagozytose von apoptotischen Zellen. (Gregory, 2000, Devitt et al., 1998, Marwitz et al., 1988).

Neben der membrangebundenen CD14-Form (mCD14) gibt es im Serum lösliches CD14 (sCD14, engl. „soluble“). Es entsteht durch enzymatische Abspaltung und „Abwurf“ des membrangebundenen Moleküls, das dadurch herabreguliert wird (Bazil & Strominger, 1991, Landmann et al., 1996, Ziegler-Heitbrock & Ulevitch, 1993). sCD14 wurde in dieser Arbeit nicht analysiert. Es wurde, falls überhaupt vorhanden, durch mehrfaches Waschen der Zellen während des Färbevorgangs (siehe Methoden 3.5.2) entfernt.

**Kostimulatorische Moleküle: CD80, CD86 und CD28:** CD80 und CD86 sind kostimulierende Moleküle der antigenpräsentierenden Zellen. Sie gehören zur B7-Familie, einer Gruppe strukturell verwandter Glykoproteine (Janeway et al., 2001). CD28 ist ihr wichtigster Rezeptor auf den T-Zellen (Carreno & Collins, 2002, Bour-Jordan & Bluestone, 2002, Salomon & Bluestone, 2001).

CD86 wird auf den Makrophagen bereits in Ruhe exprimiert, durch Aktivierung schnell heraufreguliert und dominiert die Kostimulation in der frühen T-Zell-Aktivierung. Dagegen wird CD80 erst zwölf bis 24 Stunden nach Aktivierung der Makrophagen exprimiert, bindet dann aber zwei- bis dreimal so stark an CD28 wie CD86, womit es für die Aufrechterhaltung der T-Zellantwort zuständig ist (Salomon & Bluestone, 2001, Girndt et al., 1998, Schmittel et al., 1995, Caux et al., 1994, Hathcock et al., 1994).

**MHC-Klasse I- und -Klasse II-Moleküle:** Die Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC: englisch „major histocompatibility complex“) dienen der Antigenpräsentation. Sie werden durch ein Cluster von hochpolymorphen Genen kodiert, die in jedem Menschen individuell zusammengestellt sind („immunologische Identität“).

MHC-Klasse I-Moleküle werden durch die drei Genregionen HLA- A, -B, -C kodiert und von fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert (HLA: englisch „human leucocyte antigen“). MHC-I-gebundene Antigene werden von CD8 T-Zellen

erkannt, die durch sie körpereigene von körperfremden Zellen unterscheiden sowie virusinfizierte und entartete Zellen erkennen können.

Genregionen für MHC-Klasse II-Moleküle sind HLA-DR, -DQ und -DP. MHC-II sind nur auf antigenpräsentierenden Zellen (v.a. Makrophagen, B-Lymphozyten und dendritischen Zellen) zu finden. An sie werden Antigene von phagozytierten, also zellfremden Bestandteilen gebunden, die CD4 T-Zellen aktivieren (Janeway et al., 2001, Roitt et al., 2001, Acton, 2001).

Makrophagen exprimieren sowohl MHC-Klasse I- als auch MHC-Klasse II-Moleküle. HLA-DP und -DQ ist nur auf einem kleinen Prozentanteil der Makrophagen zu sehen, während HLA-DR, das in dieser Arbeit untersucht wurde, vom Großteil der Makrophagen exprimiert wird (Brooks & Moore, 1988).

**CD16:** CD16 gehört zu den Fc-Rezeptoren, die auf verschiedenen Immunzellen zu finden sind. Über sie können die Zellen Fc-Bereiche von Immunglobulinen und damit freie Antikörper, Antigen-Antikörper-Komplexe oder antikörperbeladene Pathogene bzw. Zellen binden. Der Fc $\gamma$ -Rezeptor-III / CD16 wird u.a. von Makrophagen und NK-Zellen exprimiert. Natürliche Killerzellen binden über das CD16-Molekül unerwünschte Zellen und induzieren in ihnen Apoptose (Seaman, 2001).

Makrophagen nutzen das CD16-Molekül v.a. zur Phagozytose. Sie können mit ihm als Brücke aber auch Zellkonjugate mit antikörperbeladenen T-Zellen bilden und sie durch antikörperabhängige Zellzytotoxizität (ADCC) zerstören (vergleiche 1.3.3 und Methoden 3.7.2) (Janeway et al., 2001, Van de Winkel & Capel, 1993, Orlikowsky et al., 1997b).

**CD95 und CD95Ligand:** CD95 gehört zu den sog. Todesrezeptoren, die nach Bindung ihres Liganden Caspasen im Zytoplasma aktivieren und damit die Apoptose der eigenen Zelle triggern (siehe unter 1.2.2.1). CD95 wird von vielen verschiedenen Zellen exprimiert, während die Expression des zugehörigen CD95Liganden (CD95L) auf bestimmte Zellarten, insbesondere zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen, beschränkt ist (Elkon, 2001, Siegel et al.,

2000, Iwai et al., 1994), die CD95L für ihre zytotoxische Funktion anderen Zellen gegenüber nutzen (vergleiche 1.1.2 und 1.3 (ADCC)).

CD95Ligand wird als Membranmolekül exprimiert, kann aber durch Proteasen zu der löslichen Form sCD95Ligand abgespalten werden (s für engl. „soluble“ – löslich) (Krammer, 2000, Niinobu et al., 2000).

## 1.2 Zelltod

### 1.2.1 Nekrose und Apoptose

Der Zelltod ist essentiell für die normale Entwicklung und Differenzierung von Gewebe, zur Aufrechterhaltung eines Zellzahlgleichgewichts (Zelltod als Gegenpol zur Zellteilung) und als Antwort von Zellen auf schädigende Reize von außen oder auf körpereigene, funktionsbeeinträchtigende Veränderungen.

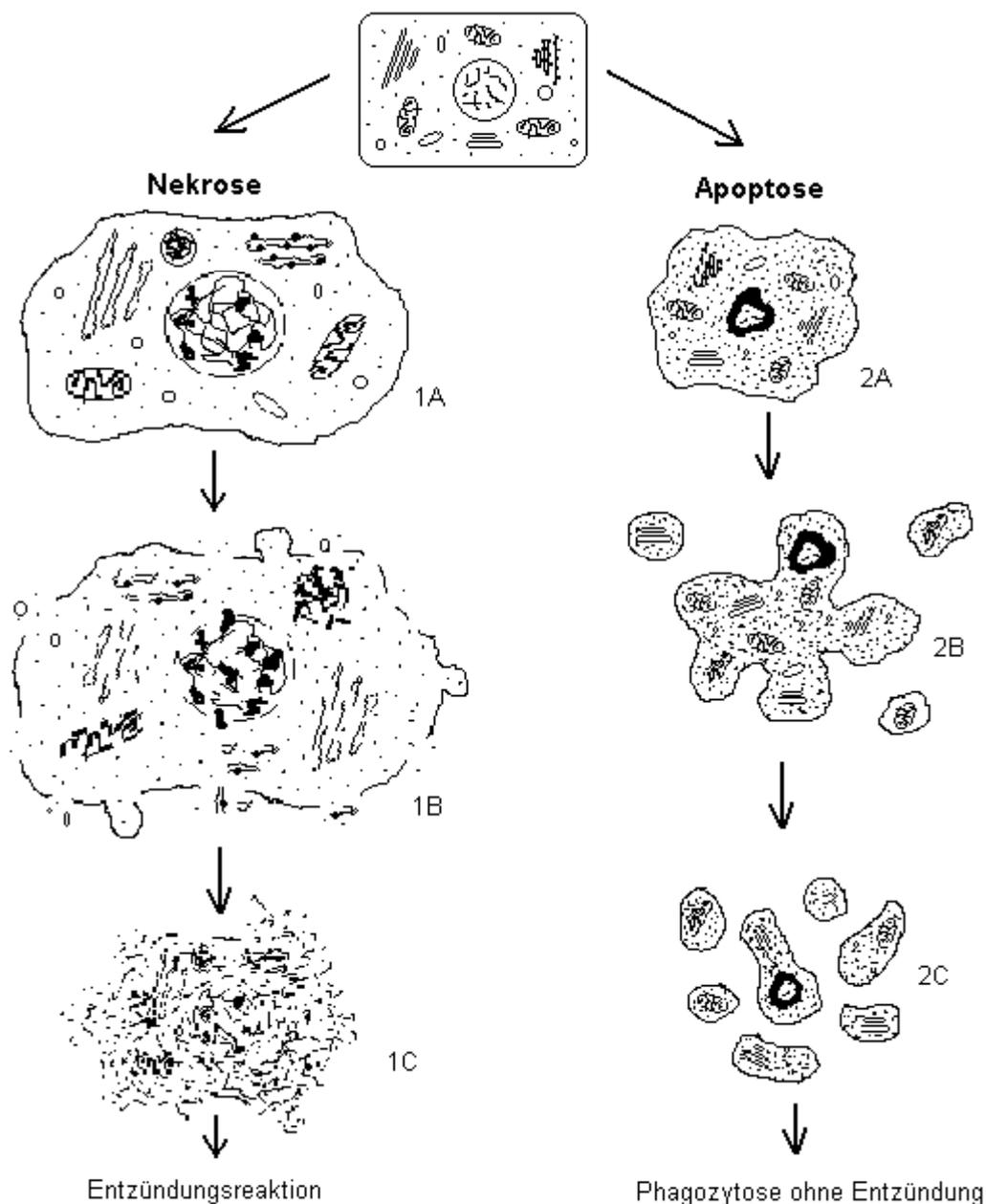
Die Art und Weise, auf die eine Zelle stirbt, hängt von Art, Stärke und Dauer des einwirkenden Reizes, vom Zelltyp sowie dem Funktionszustand und den Umgebungsbedingungen der Zelle ab.

Nach morphologischen Kriterien werden zwei „klassische“ Arten des Zelltods unterschieden: Nekrose und Apoptose.

Die Nekrose zeichnet sich dadurch aus, dass die Zellmembran aufgrund Energiemangel und versagender Ionenpumpen („zellulärer metabolischer Kollaps“) oder aufgrund Membranschädigung durchlässig wird, Wasser und Ionen einströmen, wodurch die Zelle und ihre Organellen anschwellen und letzten Endes lysieren (Abbildung 1.1). Durch Nekrose gehen im Regelfall größere Zellgruppen oder ganze Zellverbände zugrunde. Die freigesetzten Zytoplasmabestandteile lösen eine Entzündungsreaktion im umgebenden Gewebe aus (Majno & Joris, 1995, Van Cruchten & Van den Broeck, 2001; Kanduc et al., 2002; Levin et al., 2002).

Charakteristisch für die Apoptose, die 1972 durch Kerr et al. benannt wurde, ist ein genetisch determinierter und geordneter Ablauf in einzelnen Zellen oder kleinen Zellgruppen. Im Verlauf kommt es zu einer Abnahme des Zellvolumens,

zur Fragmentierung der DNA und zu einer kernperipheren Chromatinkondensation, zum Abbau des Zytoskeletts sowie zur Bildung von Membranausstülpungen und schließlich von Apoptose-Körperchen. Letztere sind Membranvesikel, die DNA-Fragmente und Reste von Zellorganellen enthalten. Im Gegensatz zur Nekrose bleibt die Zellmembran bei der Apoptose intakt (Abbildung 1.1). Die Apoptose-Körperchen werden durch Makrophagen oder Nachbarzellen erkannt, phagozytiert und abgebaut, bevor ihre Membran lysiert. Dadurch wird eine Entzündungsreaktion vermieden (Majno & Joris, 1995, Levin et al., 2002, Savill & Fadok, 2000, Fadok et al., 1998).



**Abbildung 1.1: Zelltod: Nekrose und Apoptose**

Nekrose zeichnet sich aus durch Schwellung der gesamten Zelle und der einzelnen Zellorganellen (1A). Die Zellmembran bildet Blasen (sog. „blebbing“), kann dem erhöhten Innendruck schließlich nicht mehr standhalten und rupturiert (1B). Genauso bersten die Membranen der Zellorganellen, wodurch aktiv spaltende Enzyme freigesetzt werden. Das Endstadium der Nekrose ist die völlige Desintegration der Zelle (1C). Freigesetzte Zytoplasmabestandteile lösen in der Umgebung eine Entzündungsreaktion aus. Die (membrandefekten) Zelltrümmer werden von Phagozyten abgeräumt.

Während der Apoptose kommt es zur Zellschrumpfung, Abbau des Zytoskeletts und zur Chromatinkondensation im Zellkern (2A). Im weiteren Verlauf bilden sich Membranausstülpungen (sog. „budding“) (2B). Schließlich teilt sich die Zelle in mehrere Apoptosekörperchen, die Zellorganellen oder Kernmaterial enthalten (2C). Die Apoptosekörperchen werden von einer intakten Membran umgeben und können in toto phagozytiert werden, wodurch eine Entzündung vermieden wird.

Schema modifiziert nach Beschreibungen von Van Cruchten & Van den Broeck, 2002, Majno & Joris, 1995 und Kerr et al., 1995.

**1.2.2 Apoptose: Molekulare Mechanismen und die Caspasefamilie****1.2.2.1 Molekulare Mechanismen**

Für die Apoptoseauslösung wurden auf molekularer Ebene bisher drei Hauptmechanismen (Van Cruchten & Van den Broeck, 2002, Chen & Wang, 2002) beschrieben, die alle zur Aktivierung einer Enzymfamilie, den Caspasen (siehe unter 1.2.2.2), führen:

**1. Rezeptor-Ligand-Interaktion: Todesrezeptoren**

Apoptose kann durch die Bindung zugehöriger Liganden an sog. Todesrezeptoren in der Zellmembran ausgelöst werden, die zur Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (TNF-R) gehören. Gut erforscht sind v.a. das CD95-Oberflächenmolekül und TNF-R<sub>1</sub> mit ihren Liganden CD95L und TNF $\alpha$ . Interaktion mit dem Liganden führt bei CD95 und TNF-R<sub>1</sub> zur Polymerisierung mit gleichartigen Rezeptormolekülen und zur Bindung eines Adaptormoleküls (FADD) auf der dem Zytoplasma zugewandten Seite (vergleiche Abbildung 1.2).

An dieses werden wiederum mehrere Pro-Caspase 8 und / oder 10-Moleküle angelagert. Die gesamte Formation aus Todesrezeptoren, Adaptormolekül und Pro-Caspasen 8 bzw. 10 wird als DISC (engl. für „death-inducing signaling complex“) bezeichnet. Die enge Zusammenlagerung der Pro-Caspasen innerhalb des DISC ermöglicht ihre Dimerisierung und damit Aktivierung (Chen & Wang, 2002, Kramer, 2000, Boatright & Salvesen, 2003).

## 2. Mitochondrialer Weg:

Dieser Apoptoseweg wird durch zytotoxische Substanzen wie bestimmte Chemikalien, Zytostatika und durch DNA-Schäden infolge Bestrahlung oder Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53 initiiert. Außerdem kann er im Verlauf der anderen beiden Wege zusätzlich, quasi als positives Feedback angestoßen werden (Sadowski-Debbing et al., 2002). Der entscheidende Schritt im mitochondrialen Weg ist die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytoplasma (siehe Abbildung 1.2), wo es an den „Apoptose-Protease aktivierenden Faktor“ (Apaf-1) und das Energie tragende Molekül ATP bindet. Die Dreiergruppe lagert sich mit Monomeren der Pro-Caspase 9 zusammen. Es entsteht ein Komplex, der als „Apoptosom“ bezeichnet wird. In seinem Mikromilieu dimerisieren die Pro-Caspase 9-Monomere zur aktiven Caspase 9-Molekülen (Chen & Wang, 2002, Boatright & Salvesen, 2003).

## 3. Weg des Endoplasmatischen Retikulums:

In den letzten Jahren wurde ein dritter möglicher Mechanismus entdeckt, der durch Schädigung des Endoplasmatischen Retikulums (ER) ausgelöst wird. Diese kann z.B. aus einem gestörten Kalziumhaushalt oder aus der Anhäufung von fehlerhaften Proteinen resultieren. Der ER-Weg wurde bisher vorwiegend in Mäusen untersucht, wo er zur Aktivierung der mäuseichen Caspase 12 führt. Sie ist mit den menschlichen Caspasen 4, 5 und 13 eng verwandt. Ob und unter welchen Bedingungen die ER-vermittelte Apoptose beim Menschen eine Rolle spielt ist bisher noch unklar (Van Cruchten & Van den Broeck, 2002, Sadowski-Debbing et al., 2002, Degterev et al., 2003).

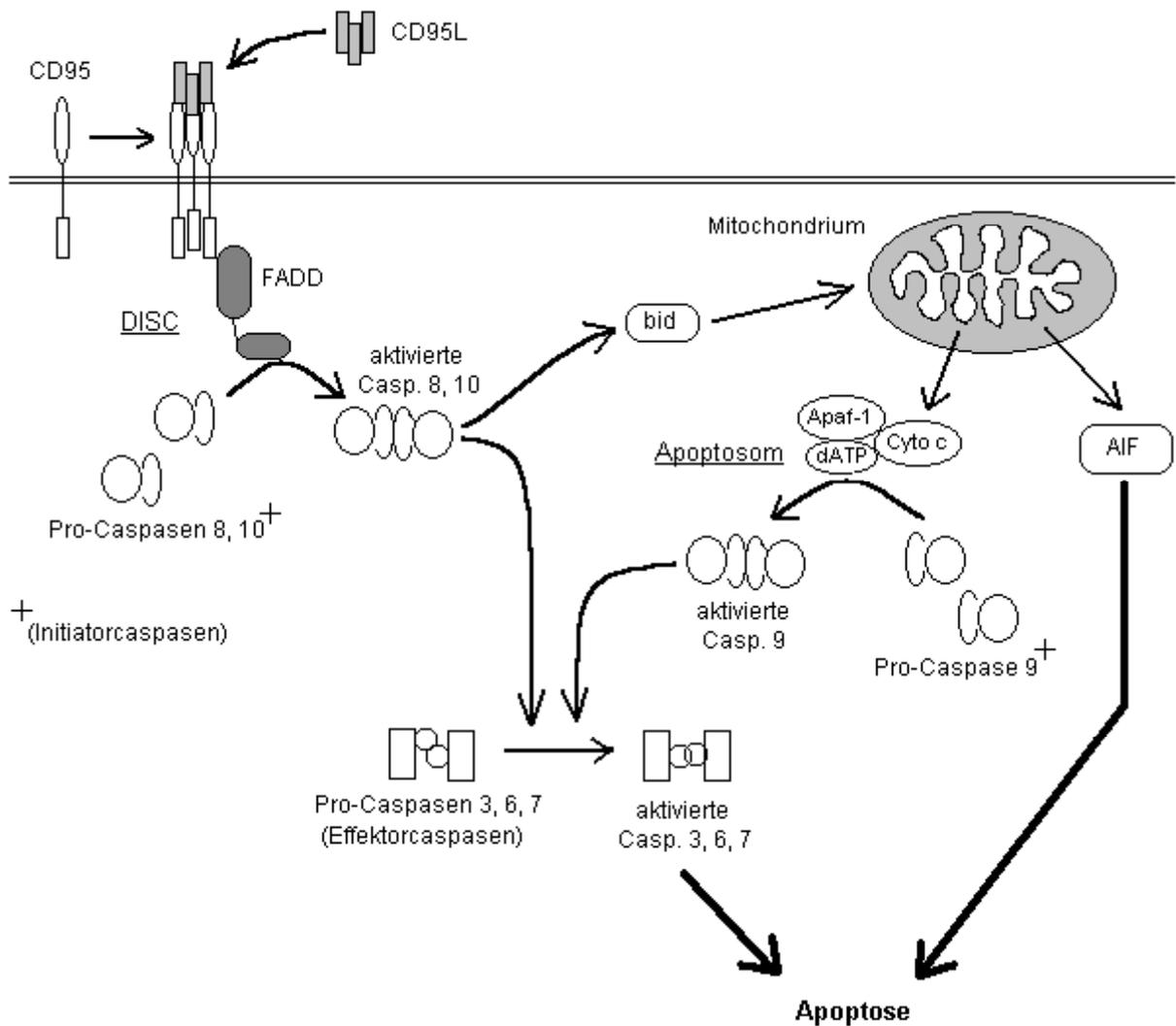


Abbildung 1.2: Todesrezeptor- und Mitochondrienabhängige Apoptosewege

Bindung des zugehörigen Liganden führt zur Bildung von DISC, bestehend aus Todesrezeptoren, Adaptorproteinen und Pro-Caspasen 8 und / oder 10. Die Caspasmoleküle dimerisieren innerhalb der DISC-Formation und werden dadurch aktiviert. DNA-schädigende Substanzen führen zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und zur Bildung eines Apoptosoms aus Cytochrom c, Apaf-1, ATP und Pro-Caspase 9-Molekülen. Letztere gehen durch Dimerisierung in aktive Caspasen 9 über. Die Initiatorcaspasen 8, 9, 10 spalten und aktivieren im weiteren Verlauf Effektorcaspasen wie die Caspasen 3, 6 oder 7. Aus den Mitochondrien kann außerdem AIF freigesetzt werden, das caspaseunabhängig zur Apoptose führt. Darstellung modifiziert nach Beschreibungen von Boatright & Salvesen, 2003, Sadowski-Debbing et al., 2002 und Chen & Wang, 2002.

### 1.2.2.2 Die Caspasefamilie

Die bereits erwähnten Caspasen bilden das Zentrum der Apoptose auf molekularer Ebene. Die verschiedenen Apoptosewege münden in ihre Aktivierung und eine von da an gemeinsame Endstrecke.

Alle Mitglieder dieser Enzymfamilie enthalten die Aminosäure Cystein in ihrem aktiven Zentrum und schneiden ihre Substrate spezifisch nach einem Aspartatrest. Ihr Name entstand als Abkürzung von C(ystein-abhängige) ASP(artat-schneidende) (Prote)ASEN. Beim Menschen sind derzeit mindestens 11 verschiedene Caspasen bekannt (Degterev et al., 2003, Concha & Abdel-Meguid, 2002). Sie liegen als Zymogene (inaktive Vorstufen) in allen kerntragenden Zellen vor. Caspasen sind eine der wenigen Proteasen, die in lebenden Zellen nicht auf Kompartimente beschränkt sind, sondern frei im Zytoplasma vorkommen (Degterev et al., 2003). Eine strenge Kontrolle ihrer Aktivität ist für das Zellüberleben essentiell.

Die Caspasen können in zwei Hauptgruppen unterteilt werden (nach Hengartner, 2000, Sadowski-Debbing et al., 2002, Boatright & Salvesen, 2003, Chen & Wang, 2002, Degterev et al., 2003):

- a) Initiierende Caspasen, die am Anfang der Reaktionskaskade stehen und durch die unter 1.2.2.1 beschriebenen Apoptosewege aktiviert werden. Zu dieser Gruppe gehören die Caspasen 8, 9, 10 und zu einem gewissen Grad Caspase 2. Sie liegen als inaktive Monomere im Zytoplasma vor und werden durch Dimerisierung aktiviert.
- b) Ausführende Caspasen, v.a. Caspasen 3, 6 und 7. Sie werden im Verlauf der Reaktionskaskade durch die Initiatorcaspasen proteolytisch aktiviert. Die Effektorcaspasen liegen bereits als (inaktive) Dimere vor und gehen nach proteolytischer Spaltung ihrer Verbindungseinheit in aktive Dimere über. Sie spalten strategisch wichtige zelluläre Bestandteile wie Proteine von Zytoskelett oder Kernstruktur, Enzyme mit Zellreparaturaufgaben, zellzyklusregulierende Moleküle sowie Moleküle oder Enzyme, die an Apoptoseablauf und -regulation selbst beteiligt sind (Degterev et al., 2003,

Hengartner, 2000). Die dadurch angestoßenen Reaktionen führen schließlich zu den morphologischen Apoptoseveränderungen der Zelle.

#### Apoptoseunabhängige Aufgaben der Caspasen:

Der Caspasefamilie werden abgesehen von ihrer Rolle innerhalb der Apoptose noch andere Aufgaben zugewiesen, die bei einzelnen Mitgliedern sogar dominieren. In knock-out-Studien bei Mäusen wurde gezeigt, dass die Caspasen eine wichtige Rolle in der Organentwicklung und der Zelldifferenzierung spielen. So zeigten knock out-Mäuse je nach ausgeschaltetem Caspasegen schwere Missbildungen von Gehirn, Auge und Herzmuskel oder Fehlfunktionen der Hämatopoese (Blutzellbildung) im Knochenmark. Teilweise führten diese Veränderungen bereits im Mutterleib oder kurz nach der Geburt zum Tode (Degterev et al., 2003, Sadowski-Debbing et al., 2002). Außerdem sind einige Caspasen an der Prozessierung und Sekretion von Zytokinen sowie an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt (Newton & Strasser, 2003, Sadowski-Debbing et al., 2002, Degterev et al., 2003, Algeciras-Schimnich et al., 2002).

#### **1.2.2.3 Caspaseunabhängige Apoptosewege**

In den letzten Jahren wurden mehrere caspaseunabhängige Apoptosewege entdeckt. Sie wurden in Versuchsmodellen beobachtet, in denen Caspasen gehemmt oder in knock out-Studien gänzlich ausgeschaltet waren. Diese Formen von Apoptose scheinen weniger effektiv, weniger schnell und z.T. ohne begleitende DNA-Fragmentierung abzulaufen. Sie werden maßgeblich durch den Apoptose-induzierenden Faktor (AIF), einem Protein, das aus den Mitochondrien freigesetzt werden kann, bestimmt (vergleiche Abbildung 1.2). Möglicherweise stellen die caspaseunabhängigen Apoptosewege evolutionsgeschichtlich Vorläufermechanismen dar, die primär in weniger hoch

entwickelten Lebewesen vorkommen und beim Menschen nur ersatzweise einspringen, wenn keine Caspasen zur Verfügung stehen (Hunot & Flavell, 2001, Joza et al., 2001, Borner & Monney, 1998, Lockshin & Zakeri, 2002, Cregan et al., 2002).

#### **1.2.2.4 Die Umverteilung von Phosphatidyl-Serin in der Zellmembran**

Im Verlauf der Apoptose kommt es zur Änderung der Zellmembranstruktur. Die in lebenden Zellen durch aktive Prozesse aufrechterhaltene asymmetrische Lipidverteilung zwischen Membraninnen- und –außenseite wird aufgegeben. Das Phospholipid Phosphatidyl-Serin, das sich in lebenden Zellen fast vollständig nur in der inneren Membranschicht befindet (Op den Kamp, 1979), wird früh in der Apoptose, noch vor der DNA-Fragmentierung oder anderen apoptotischen Zellveränderungen, auf die Außenseite der Membran verlagert (Fadok et al., 1992, Verhoven et al., 1999, Vermes et al., 2000). Die Umverteilung von Phosphatidyl-Serin scheint, unabhängig von Zelltyp und molekularem Apoptoseweg, bei allen apoptotischen Zellen der Fall zu sein (Vermes et al., 2000, Martin et al., 1995). Das exprimierte Phosphatidyl-Serin dient zusammen mit anderen, z.T. apoptotisch veränderten Oberflächenmolekülen der Erkennung durch phagozytierende Zellen (Fadok et al., 1992, Fadok et al., 2000, Savill & Fadok, 2000, Gregory, 2000). Nach außen verlagertes Phosphatidyl-Serin kann angefärbt werden und zur Detektion apoptotischer Zellen genutzt werden (siehe Methoden 3.6.2).

#### **1.2.3 Apoptosehemmung durch Caspase-Inhibitoren: zVAD-FMK**

Da die kaskadenartige Aktivierung von Caspasen die gemeinsame Endstrecke verschiedener Apoptosewege darstellt, bietet die Hemmung der Caspasen auf molekularer Ebene einen guten Ansatz zur Apoptosehemmung insgesamt. In

der Forschung werden hierfür v.a. synthetische Tetrapeptide verwendet, die reversibel oder irreversibel an das aktive Zentrum von allen oder nur von bestimmten Caspasen binden und es dadurch blockieren (Garcia-Calvo et al., 1998, Concha & Abdel-Meguid, 2002, Degterev et al., 2003, Borner & Monney, 1999).

Oral bioverfügbare Caspase-Inhibitoren für den therapeutischen In vivo-Einsatz beim Menschen sind in Entwicklung und werden für einige Indikationen (chronische Hepatitis B und C, Lebertransplantation) bereits in klinischen Studien eingesetzt (Idun Pharmaceuticals: [www.idun.com](http://www.idun.com), Nicholson, 2000).

In dieser Arbeit wurde der zellgängige Breitspektrum-Caspase-Inhibitor zVAD-FMK (Benzyloxycarbonyl-Valin-Alanin-Aspartat-Fluoromethylketon) verwendet. Er gehört zu den synthetischen Peptidinhibitoren und enthält die für Caspasesubstrate obligate Aminosäure Aspartat am C-Ende des Peptids. Die vierte Aminosäure in der Peptidkette ist durch den Benzyloxycarbonylrest ersetzt, wodurch zVAD-FMK unspezifisch an die aktiven Zentren von allen bisher bekannten Caspasen binden kann. Die Fluoromethylgruppe bindet kovalent an das aktive Zentrum der jeweiligen Caspase und führt zu einer sofortigen und irreversiblen Hemmung der Caspaseaktivität (Borner & Monney, 1999, Garcia-Calvo et al., 1998).

zVAD-FMK wurde erfolgreich in unterschiedlichen Krankheitsmodellen am Tier eingesetzt: Gewebeschäden durch zerebrale, intestinale, renale und Myokardischämie, traumatische Gehirnverletzungen, Verbrennungen oder Lebernoxen konnten durch zVAD-FMK nachweislich limitiert und die jeweilige Organfunktion dadurch verbessert werden (Hara et al., 1997, Schulz et al., 1999, Yaoita et al., 1998, Loddick et al., 1996, Fukuzuka et al., 1999, Rodriguez et al., 1996, Farber et al., 1999, Daemen et al., 1999). Im Sepsis-Modell an Mäusen konnte eine verminderte Lymphozytenapoptose und eine verbesserte Überlebensrate der Mäuse nachgewiesen werden (Hotchkiss et al., 2000). Des Weiteren verzögerte zVAD-FMK in Mäusen den Krankheitsbeginn von induzierter ALS (Amyotrophe Lateralsklerose, Li et al., 2000).

In vitro konnte in menschlichen wie tierischen Zellversuchen sowohl die spontane als auch unterschiedlich induzierte Apoptose durch zVAD-FMK verhindert oder zumindest vermindert werden. U.a. wurde in verschiedenen Versuchsaufbauten die Apoptose von Immunzellen gehemmt, so z.B. die Apoptose von aus Blut isolierten Lymphozyten, NK-Zellen und Neutrophilen sowie von verschiedenen lymphatischen und myeloischen Zelllinien (Banki et al., 1999, Hur et al., 2003, Leite-de-Moraes et al., 2000, Zhang et al., 2000, Komoriya et al., 2000, Nagahara et al., 2000).

### 1.3 Apoptose im Immunsystem: Vorkommen und Bedeutung

Die Apoptose hat im Immunsystem mehrere Aufgaben:

- 1) T- und B-Zelldifferenzierung zur Ausbildung einer Immuntoleranz gegenüber körpereigenem Gewebe: Die negative und positive Selektion der heranreifenden Lymphozyten stellen sicher, dass nur Zellen überleben, deren Antigenrezeptoren ausschließlich mit körpereigenen antigenpräsentierenden MHC-Molekülen, aber nicht gegen körpereigene Antigene selbst reagieren (Baumann et al., 2002, Rathmell & Thompson, 1999).
- 2) Zytotoxizität, ADCC: Die Apoptoseinduktion in unerwünschten Zellen gehört zu den Aufgaben von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen (vergleiche 1.1.2). Auch Makrophagen können zytotoxisch wirken, wenn sie antikörperbeladene Zellen über ihre Fc-Rezeptoren (CD16), binden und in ihnen Apoptose induzieren (v.a. über CD95Ligand und TNF $\alpha$ , siehe auch 1.2.3). Dieser Vorgang wird antikörperabhängige Zellzytotoxizität (ADCC, engl. für „antibody dependent cell cytotoxicity“) genannt (Cruse & Lewis, 1999, Orlikowsky et al., 1997b, Orlikowsky et al., 2001, Badley et al., 1997).
- 3) Beendigung einer Immunreaktion, AICD: Sobald eine Infektion erfolgreich bekämpft ist, muss die dann überflüssig hohe Zahl aktiver Immunzellen wieder reduziert werden. Daher begehen die meisten Immunzellen nach einer gewissen Aktivierungszeit Apoptose, was als AICD (engl. „activation induced

cell death“) bezeichnet wird. AICD wird über zwei Mechanismen getriggert: Zum einen wird durch Entzug aktivierender Zytokine der mitochondriale Apoptoseweg angestoßen. Zum anderen kann AICD über Todesrezeptoren (v.a. CD95) induziert werden (vergleiche 1.2.2.1). Dazu wird CD95Ligand nach Restimulation des (bereits aktivierten) T-Zellrezeptors auf zytotoxischen T-Zellen, Th1-Zellen und NK-Zellen exprimiert. Aktivierte Makrophagen sezernieren TNF $\alpha$ . Durch beide Liganden können die genannten Zellen in sich selbst und / oder in anderen aktivierten Immunzellen Apoptose induzieren (Baumann et al., 2002, Elkon, 2001, Krammer, 2000, Niinobu et al., 2000).

4) Spontane Apoptose: Auch ohne vorausgehende Aktivierung werden reife Immunzellen (außer Gedächtniszellen) spontan apoptotisch, wenn sie über geraume Zeit keine Überlebensstimuli wie Lipopolysaccharid, präsentierte Antigene, aktivierende Zytokine oder Wachstumsfaktoren erhalten: Diese „Deprivation“ aktiviert den mitochondrialen Apoptoseweg (Estaquier & Ameisen, 1997, Wang et al., 2001, Elkon, 2001, Schroeder et al., 2001, Rathmell & Thompson, 1999). Außerdem begehen Immunzellen wie jede andere Körperzelle bei Überalterung oder irreversiblen DNA-Schäden selbstgetriggert Selbstmord (Rathmell & Thompson, 1999).

5) Fehlerhafte Aktivierung: Wird eine T-Zelle nicht korrekt aktiviert, d.h. wird entweder nur der T-Zellrezeptor oder nur das kostimulierende Molekül CD28 gebunden, aber nicht beide gleichzeitig, wird die T-Zelle anerg (ein Zustand, in dem sie nicht mehr aktiviert werden kann, selbst wenn ihr im Verlauf alle nötigen Signale präsentiert werden). Sie begeht CD95-induzierte Apoptose (Janeway & Bottomly, 1994, Baumann et al., 2002, Krammer, 2000). Genauso werden B-Lymphozyten apoptotisch, wenn ihr Antigenrezeptor nicht ausreichend stimuliert wird (Rathmell & Thompson, 1999). Dadurch wird gewährleistet, dass nur korrekt und bewusst stimulierte Zellen aktiv werden können.

Begehen Immunzellen zu wenig Apoptose (z.B. durch eine Mutation von CD95 bzw. von CD95Ligand) können lymphoproliferative Syndrome (ALPS), Lymphome, Leukämien oder Autoimmunkrankheiten entstehen (Koretzky & Peterson, 2001, Elkon, 2001, Krammer, 2000). Ein Zuviel an Apoptose führt

dagegen zu Leukopenie und Immundefizienz. Ein Beispiel dafür ist AIDS (engl. für „acquired immunodeficiency syndrome“), bei dem T-Helferzellen durch ADCC zerstört werden (Orlikowsky et al., 1997b, Orlikowsky et al., 2001, Rathmell & Thompson, 1999, Badley et al., 1997).

#### **1.4 Die Interaktion zwischen Makrophagen und T-Zellen**

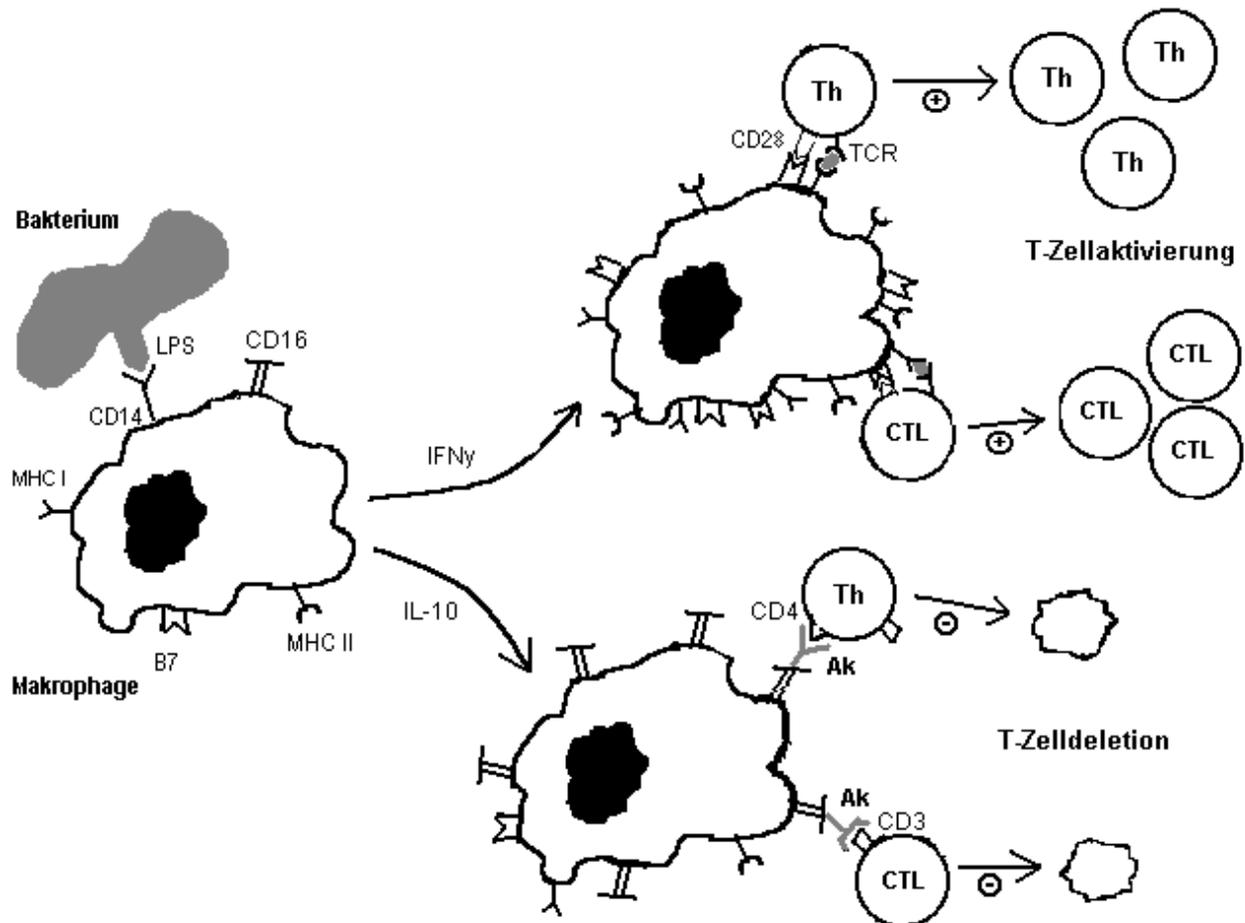
Makrophagen und T-Zellen interagieren miteinander sowohl über sezernierte Zytokine (Botenstoffe) als auch durch direkten (physikalischen) Zellkontakt über Membranmoleküle.

Die T-Zellen sind für eine Aktivierung auf diesen Zellkontakt mit antigenpräsentierenden Zellen (APC) angewiesen. Makrophagen präsentieren ihnen Antigene über ihre MHC-Moleküle und bieten ihnen außerdem kostimulatorische Moleküle wie CD86 und CD80 an, die die T-Zellen als zweites Signal zur vollständigen Aktivierung benötigen. Sie binden die Antigen-MHC-Komplexe über ihren T-Zellrezeptor und ihre Korezeptoren und exprimieren CD28 als Rezeptor für die kostimulatorischen Moleküle (siehe Abbildung 1.3). Fehlt das kostimulierende Signal wird die T-Zelle anergisch und beugt Apoptose (vergleiche 1.3) (Wang et al., 1998, Janeway & Bottomly, 1994).

Über die Bildung von Zellkonjugaten können Makrophagen T-Zellen aber nicht nur aktivieren, sondern auch zerstören. Mit ihren CD16-Molekülen können sie antikörperbeladene T-Zellen binden und in ihnen durch antikörperabhängige Zellzytotoxizität (ADCC) Apoptose induzieren (siehe 1.3.3 und Abbildung 1.3) (Janeway et al., 2001, Van de Winkel & Capel, 1993). Diese Makrophagenfunktion steht im Gegensatz zu der T-Zellaktivierung durch Antigenpräsentation und Kostimulation (siehe oben), so dass von einigen Autoren zwei Subpopulationen innerhalb der Makrophagen unterschieden werden: CD16-negative, B7-positive, MHC-Klasse II-positive Makrophagen, die vorwiegend aktivierend und kostimulatorisch wirken, und CD16-positive, B7-negative, MHC-Klasse II-negative Makrophagen, die mehr zytotoxisch wirken. Die Differenzierung der Makrophagen in eine der beiden Subpopulationen wird

durch Zytokine (v.a. IFN $\gamma$  und IL-10) bestimmt (Wang et al., 2001, Orlikowsky et al., 1996).

Somit dirigieren Makrophagen die T-Zellantwort über die Bildung von Zellkonjugaten, indem sie je nach Zytokinumgebung zur Aktivierung oder Zerstörung der T-Zelle führen (Koretzky & Peterson, 2001).



**Abbildung 1.3:** Wirkung der beiden Makrophagensubtypen auf die T-Zellen

Je nach Zytokinumgebung differenziert sich der Makrophage in eine der beiden folgenden Subtypen: IFN $\gamma$  führt zu CD16-negativen, B7-positiven, MHC-Klasse-II-positiven Makrophagen, die vorwiegend aktivierend und kostimulatorisch auf die T-Zellen wirken. IL-10 dagegen favorisiert die Differenzierung in CD16-positiven, B7-negativen, MHC-Klasse-II-negativen Makrophagen, die mehr zytotoxisch wirken und zur T-Zelldeletion führen.

Th = T-Helferzellen, CTL = zytotoxische T-Lymphozyten (engl. „cytotoxic T-lymphocytes“), Ak = Antikörper, TCR = T-Zellrezeptor (engl. „T cell receptor“)

### 1.5 Das Immunsystem des Neugeborenen

Neugeborene sind im Vergleich zu Erwachsenen stärker anfällig für Infektionen und entwickeln, wenn infiziert, mit größerer Wahrscheinlichkeit einen schweren Krankheitsverlauf bis hin zur Sepsis (Büscher et al., 2000). Sie sind besonders anfällig für Infektionen durch Pilze oder intrazelluläre Pathogene (Viren, intrazelluläre Bakterien), zu deren Abwehr die T-Zellaktivierung eine wichtige Rolle spielt (Wilson & Lewis, 1990, Maródi et al., 1994). Neonatale Immunzellen weisen signifikante Defizite in der Expression verschiedener Zellrezeptoren, der Zytokinsekretion und in der Reaktion auf bestimmte Zytokine oder andere Stimuli auf (Maródi et al., 2001b, Joyner et al., 2000, El-Mohandes et al., 1995, Wakasugi et al., 1985b). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass Makrophagen von Neugeborenen weniger effektiv Phagozytose betreiben, Zytokine produzieren, Antigene und kostimulierende Moleküle präsentieren oder T-Zellen aktivieren können als Makrophagen von Erwachsenen (Schibler et al., 1992, Rowen et al., 1995, Lee et al., 1996, Maródi, 2001a, Orlikowsky et al., 2003). Die neonatalen Lymphozyten unterscheiden sich in der Verteilung und dem Phänotyp ihrer Untergruppen, im Zytokinprofil, in ihrer Differenzierungsgeschwindigkeit und in der Effektivität der zytotoxischen Funktionen von erwachsenen Lymphozyten (Bryson et al., 1980, Wakasugi & Virelizier, 1985a, Kohl et al., 1988, Wilson & Lewis, 1990, Schibler et al., 1992, Giorgi et al., 1992, Chalmers et al., 1998).

## 1.6 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Wirkung des Pancaspase-Inhibitors zVAD-FMK auf das Apoptoseverhalten von Makrophagen und Lymphozyten genauer zu untersuchen. Zur Reaktion der Lymphozyten und diverser Lymphozytenzelllinien liegen in der Literatur bereits zahlreiche Ergebnisse vor (siehe unter 1.1.4). Die Wirkung auf Makrophagen jedoch scheint bisher nicht ausreichend untersucht. Da Makrophagen aber, wie oben dargestellt, essentielle Aufgaben im Immunsystem erfüllen und die Immunantwort der Lymphozyten, insbesondere der T-Zellen, mitbestimmen, scheint es für den zukünftigen In vivo-Einsatz von Caspase-Inhibitoren unerlässlich, ihre Wirkung auf das Verhalten und Überleben der Makrophagen zu kennen.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war, Unterschiede zwischen Immunzellen von Neugeborenen und Erwachsenen bezüglich ihrer Apoptoseaktivität und ihrer Reaktion auf zVAD-FMK aufzudecken.

Um der Fragestellung nachzugehen, wurden Makrophagen und Lymphozyten sowohl aus Blut von gesunden erwachsenen Spendern als auch aus Nabelschnurblut isoliert und mit zVAD-FMK inkubiert. Die Zellen wurden zusätzlich mit verschiedenen Substanzen stimuliert, um die Wirkung des Caspase-Inhibitors auf diverse Zellfunktionen untersuchen zu können. Nachfolgend wurden wichtige Oberflächenrezeptoren angefärbt und anhand ihrer Regulation das Verhalten der Immunzellen analysiert.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Patienten und Zellen

Die mononukleären Zellen (MNC) wurden aus peripherem Venenblut von freiwilligen, gesunden, nicht verwandten erwachsenen Spendern (PB) und aus Nabelschnurblut (NSB) von reifgeborenen Kindern ohne Anzeichen von Infektion oder mütterlicher Komplikation zum Zeitpunkt der Geburt gewonnen (siehe 3.1). Die Nabelschnur (Neugeborenenseite der Plazenta) wurde direkt nach Abnabelung mit einer sterilen Nadel punktiert; das Blut ohne Sog in einem sterilen, heparinisierten Röhrchen aufgefangen. Bei dieser Technik ist die Wahrscheinlichkeit einer Verunreinigung durch mütterliche Zellen minimal (Orlikowsky et al., 2003). Die Studie war von der Ethikkommission genehmigt. Vor Gewinnung des Nabelschnurbluts wurde die Einwilligung der Mütter eingeholt.

### 2.2 Chemikalien und Reagenzien

Annexin Binding Puffer (140mM NaCl, 2,5mM CaCl <sub>2</sub> , 10mM HEPES/NaOH, pH 7,4)	CALTAG, Hamburg
Ampuwa	FRESENIUS, Bad Homburg
Biocoll Separatine Solution, Lymphoprep (spezifische Dichte = 1,077g/ml)	BIOCHROM, Berlin
Caspase-Family Inhibitor Set (DEVD-, IETD-, VAD-, VEID- und YVAD-FMK)	CHEMICON, Temecula, Kalifornien
DMSO	SIGMA, Taufkirchen
Heparin-Natrium (100U/ml, 5000 I.E./0,5ml)	B.BRAUN, Melsungen
FACS Flow	BECTON DICKINSON, Heidelberg

---

FACS Lysing Solution	BECTON DICKINSON, Heidelberg
FCS (inaktiviert im 60°C Wasserbad für 45 min)	BIOCHROM, Berlin
IFN $\gamma$ (human, rekombinant, E.coli)	R&D SYSTEMS, Wiesbaden
LPS (entgiftet, E.coli Serotyp O55:B5)	SIGMA, Taufkirchen
Muromonab CD3 (Orthoclone® OKT3) (monoklonaler Antikörper (IgG <sub>2a</sub> ) der Maus gegen humanes CD3)	JANSSEN-CILAG, Neuss
NaCl (0,9%)	FRESENIUS, Bad Homburg
PBS-Dulbecco	BIOCHROM, Berlin
Trypanblau (0,5%)	BIOCHROM, Berlin
VLE RPMI 1640 Medium	BIOCHROM, Berlin
zVAD(OMe)-FMK	BACHEM, Heidelberg

ch412 (monoklonaler Antikörper gegen humanes CD4) wurde uns freundlicherweise von G. Riethmüller, Institut für Immunologie, München, zur Verfügung gestellt.

### 2.3 Material für die Durchflusszytometrie

Soweit nicht anders angegeben, wurden die monoklonalen Antikörper von BECTON DICKINSON, Heidelberg, bezogen.

FITC-konjugierte monoklonale Antikörper gegen:

- CD4 (Klon SK3, Maus, IgG<sub>1</sub>)
- CD8 (Klon SK1, Maus, IgG<sub>1</sub>)
- CD14 (Klon MΦP9, Maus, IgG<sub>2b</sub>)
- CD56 (Klon NCAM16.2, Maus, IgG<sub>2b</sub>)
- CD86 (Klon 2331(FUN-1), Maus, IgG<sub>1</sub>)

HLA-DR (Klon L243, Maus, IgG<sub>2a</sub>)  
 HLA-A,-B,-C (Klon G46-2.6, Maus, IgG<sub>1</sub>) SEROTEC, Eching

PE-konjugierte monoklonale Antikörper gegen:

CD3 (Klon SK7, Maus, IgG<sub>1</sub>)  
 CD8 (Klon SK1, Maus, IgG<sub>1</sub>)  
 CD14 (Klon MΦP9, Maus, IgG<sub>2b</sub>)  
 CD16 (Klon B73.1, Maus, IgG<sub>1</sub>)  
 CD19 (Klon 4G7, Maus, IgG<sub>1</sub>)  
 CD28 (Klon L293, Maus, IgG<sub>1</sub>)  
 CD80 (Klon L307.4, Maus, IgG<sub>1</sub>)  
 CD95 (Klon DX2, Maus, IgG<sub>1</sub>)  
 CD95Ligand (Klon NOK-1, Maus, IgG<sub>1</sub>) CALTAG, Hamburg

Simultest Control  $\gamma_1/\gamma_1$  (Klon X40, Maus, IgG<sub>1</sub>/ IgG<sub>1</sub>)

Annexin V, PE-konjugiert (rekombinant, Mensch) CALTAG, Hamburg  
 Polyglobin® (10%) (humanes IgG) BAYER, Leverkusen  
 Propidiumiodid SIGMA, Taufkirchen

## 2.4 Geräte

Begasungsbrutschrank HERAEUS, Fellbach  
 CellQuest-Software BECTON DICKINSON,  
 Heidelberg  
 FACSScan BECTON DICKINSON,  
 Heidelberg  
 Lichtmikroskop OLYMPUS, Hamburg  
 Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000 $\mu$ l) ABIMED, Langenfeld  
 Pipettierhilfe accu-jet BRAND, Wertheim  
 SigmaPlot-Software SPSS Inc., Chicago

Sterilbank	KENDRO, Hanau
Ultraschallbad transsonic T 420	ELMA, Singen
Vortex	HAEMACONT, Bad Homburg
Zentrifuge Rotanta 46 RS	HETTICH, Tuttlingen

### 2.5 Glas- und Plastikmaterial

Butterfly-21	ABBOTT, Sligo (Irland)
Einmalkanülen (Gr.1)	B.BRAUN, Melsungen
Einmalpipettenspitzen	GREINER, Frickenhausen
Einmalspritzen (30, 50ml)	BECTON DICKINSON, Heidelberg
Kulturplatte, 24 well	COSTAR, Bodenheim
Neubauer Zählkammer	HECHT-ASSISTENT, Sondheim
Probenröhrchen, 4,5ml	GREINER, Frickenhausen
Reaktionsgefäße, 1,5ml	EPPENDORF, Hamburg
Sterilpipetten, wattiert (1, 5, 10, 25ml)	GREINER, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (15, 50ml)	GREINER, Frickenhausen

### 3 METHODEN

#### 3.1 Gewinnung von mononukleären Zellen (MNC)

Die MNC wurden aus peripherem Vollblut bzw. Nabelschnurblut mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Bei dieser Technik wird die unterschiedliche Dichte der verschiedenen Zellarten im Blut genutzt, um sie mit Hilfe der Zentrifugation aufzutrennen und die gewünschten Zellen in Gradienten ihrer jeweiligen Dichte zu stabilisieren.

Die Isolierung erfolgte nach der von Bøyum (1974) beschriebenen Methode: Von klinisch gesunden Erwachsenen wurden 50ml Venenblut und von Neugeborenen direkt nach der Geburt ca. 40ml Nabelschnurblut gewonnen (siehe 2.1), heparinisiert und mindestens 1:1 mit PBS verdünnt. Je 35ml des verdünnten Blutes wurden auf 15ml Lymphoprep® (Gradient mit der spezifischen Dichte 1,077g/ml) in 50ml-Zentrifugenröhrchen geschichtet und bei 400g und 20°C für 25 min zentrifugiert. Bei der Zentrifugation reichern sich die mononukleären Zellen an der Phasengrenze ab und bilden die sog. Interphase. Sie besteht zu 97-99% aus Lymphozyten und Monozyten (Eckert, 1991), während rote Blutkörperchen sowie die meisten polymorphkernigen Leukozyten aufgrund ihrer größeren Dichte abgetrennt werden und sich als Sediment am Boden des Zentrifugenröhrchens ansammeln. Die Interphase wurde mit einer Pipette abgesaugt und in ein neues 50ml-Röhrchen gegeben. Die Zellen wurden zweimal mit PBS, angereichert mit 5% FCS, gewaschen (400g, 10 min, 10°C) und in VLE RPMI 1640-Medium mit 10% FCS resuspendiert.

#### 3.2 Zellzahlbestimmung

Von der Zellsuspension in VLE RPMI 1640-Medium (siehe oben) wurden 50µl entnommen, mit der gleichen Menge Trypanblau (0,5%) verdünnt, in eine Neubauer-Kammer gegeben und unter dem Mikroskop gezählt. Lebende Zellen

mit intakter Zellmembran heben sich bei dieser Färbung vom blauen Hintergrund ab, während tote Zellen den Farbstoff aufgrund ihrer durchlässigen Membran aufnehmen und dann vom Hintergrund nicht mehr abzugrenzen sind. Die Zellzahl in einem Großquadranten (= 16 kleine Quadrate) wurde mit dem Verdünnungsfaktor 2 sowie mit  $10^4$  multipliziert. Das Ergebnis entspricht der Zellzahl pro ml Zellsuspension.

### 3.3 Caspase-Inhibition

Verwendet wurde der zellgängige Breitspektrum-Caspase-Inhibitor zVAD(OMe)-FMK (Benzyloxycarbonyl-Valin-Alanin-Aspartat-Fluoromethylketon) (vergleiche 1.2.3). Die chemisch aktive Form zVAD-FMK hat in wässriger Lösung nur eine Halbwertszeit von weniger als einer Stunde. Daher wurde als stabile Vorform der O-Methylester zVAD(OMe)-FMK gewählt, der nach Aufnahme in die Zellen durch intrazelluläre Esterasen in die aktive Form zVAD-FMK umgewandelt wird (Komoriya et al., 2000). Im Folgenden wird der Inhibitor nach seiner aktiven Form zVAD-FMK genannt.

Das in Pulverform gelieferte zVAD-FMK wurde mit 10mM DMSO auf die Endkonzentration  $40\mu\text{M}$  verdünnt. Die Substanz löste sich nicht spontan in DMSO und wurde deshalb bis zur vollständigen Suspension im Ultraschallbad gehalten.

Die Auflösung von zVAD-FMK in 10mM DMSO und die verwendete Konzentration von  $40\mu\text{M}$  richteten sich nach in der Literatur beschriebenen Versuchen mit erfolgreichem Einsatz von zVAD-FMK (Nagahara et al., 2000, Ruckdeschel et al., 2002, Komoriya et al., 2000).

Vor den Versuchsreihen mit zVAD-FMK wurden einige Zellkulturen mit dem „Caspase-Family Inhibitor Set“ der Firma Chemicon angelegt. Es besteht aus fünf einzelnen Peptidinhibitoren (DEVD-, IETD-, VAD-, VEID, YVAD-FMK), die die Aktivitäten der Caspasen eins, drei, sechs und acht sowie die Aktivität einer vom Hersteller nicht näher bezeichneten Caspase irreversibel hemmen.

Letztere wird nach Herstellerangaben innerhalb der Reaktionskaskade vor den meisten anderen Caspasen aktiviert, so dass die Caspasefamilie umfassend gehemmt wird (Produktbeschreibung CASPASE-FAMILY INHIBITOR SET der Firma Chemicon, [www.chemicon.com](http://www.chemicon.com)).

Das Inhibitor-Set wurde, wie vom Hersteller empfohlen, in der Verdünnung 1:1000 verwendet, was einer Konzentration von 2µM pro Inhibitor entsprach. Sonstige Kulturbedingungen und Färbemethoden entsprachen den Versuchen mit zVAD-FMK.

### 3.4 Zellkultur und Stimulation

Die in VLE RPMI 1640-Medium aufgenommenen Zellen wurden nach der Zellzählung auf eine Dichte von  $2 \times 10^6$  Zellen / ml eingestellt und auf einer 24-Topf-Kulturplatte ausgesät.

Nach Zugabe von zVAD-FMK wurden die Zellen im Brutschrank bei gesättigter Wasserdampfatmosphäre, 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für eine Stunde vorinkubiert, um der Substanz ausreichend Zeit zu geben, in die Zellen zu diffundieren.

Danach erfolgte je nach Versuchsaufbau die Stimulation mit einem bzw. zwei der folgenden Faktoren (Lösung und Verdünnung in VLE RPMI 1640):

OKT3	5µg/ml	(Janssen-Cilag, Neuss)
ch412	1µg/ml	(G. Riethmüller, München)
LPS	0,1µg/ml	(Sigma, Taufkirchen)
LPS	1µg/ml	(Sigma, Taufkirchen)
IFN <sub>γ</sub>	500IE/ml	(R&D Systems, Wiesbaden)

Um die Wirkung der LPS-Stimulation zu verstärken, wurden einige Kulturen zuerst mit IFN<sub>γ</sub> (500IE/ml) für eine Stunde inkubiert (sog. „priming“), bevor LPS in der Konzentration 0,1µg/ml zugegeben wurde. Die Vorinkubation mit IFN<sub>γ</sub> und zVAD-FMK erfolgte dabei gleichzeitig.

Nach Zugabe der Stimulanzen wurden die Zellen für weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. In vitro-Bedingungen mit Kontakt der Monozyten zu

Fremdmaterial, z.B. Plastik, führt zu ihrer Ausreifung zu Makrophagen (Ziegler-Heitbrock & Ulevitch, 1993, Wang et al., 2001), wie sie in den folgenden Teilen dieser Arbeit bezeichnet werden.

### **3.5 Durchflusszytometrie**

#### **3.5.1 Prinzip der Durchflusszytometrie**

Mit der Durchflusszytometrie können Zellen gleichzeitig hinsichtlich ihrer relativen Zellgröße, ihrer Granularität und der Expression von angefärbten Oberflächenantigenen untersucht werden.

Bei der Messung werden die suspendierten Zellen samt Trägerflüssigkeit vom Durchflusszytometer mit Überdruck aus dem Proberöhrchen durch eine Messkapillare gesaugt und beschleunigt, wodurch ein laminarer Strom aus einzeln hintereinander gereihten Zellen entsteht. In diesen Flüssigkeitsstrom strahlt am Analysepunkt Argonlaser der Wellenlänge 488 nm ein, der durch die Zellen abgelenkt wird. Das Ausmaß der Lichtstreuung wird durch Photodetektoren erfasst. Diese messen zum einen den Anteil des parallel zum eingestrahlten Laser gestreuten Lichts, das sog. Vorwärtsstreulicht („Forward Light Scatter“, FSC). Es dient als Maß für die Zellgröße. Zum anderen werden rechtwinklig abgelenkte Lichtstrahlen erfasst, sog. Seitwärtsstreulicht („Side Light Scatter“, SSC), das die Morphologie und Granularität der Zelle widerspiegelt. Insgesamt gilt: Das Ausmaß der Lichtstreuung nimmt mit steigender Zellgröße bzw. Granularität zu. Die durch die Photodetektoren gesammelten Informationen werden in elektronische Signale umgewandelt, verstärkt und digitalisiert. Sie können daraufhin am zugehörigen Computer in Form unterschiedlicher Grafiken aufgerufen werden (siehe unter 3.5.3).

Oberflächenmoleküle der Zellen können mit Fluorochrom-konjugierten monoklonalen Antikörpern markiert werden. Durch den Laser werden die Fluorochrome angeregt und emittieren Licht bestimmter Wellenlänge.

Photodetektoren messen die Intensität des ausgestrahlten Lichts, die sogenannte Fluoreszenzintensität. Sie entspricht der Anzahl der gebundenen Antikörper und damit der Höhe der Antigenexpression.

Bei dieser Arbeit wurden die Fluorochrome Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) verwendet, deren Emissionsmaxima bei 520 nm und 575 nm liegen. Da die Fluoreszenzkanäle (FL1, FL2) des Durchflusszytometers Photodetektoren mit größter Empfindlichkeit für unterschiedliche Wellenlängen besitzen, können bei gleichzeitiger Färbung mit beiden fluoreszierenden Farbstoffen die zwei Wellenlängen unterschieden und die beiden Fluoreszenzintensitäten getrennt voneinander bestimmt werden. (Volk, 1991, Lewis & Rickman, 1992)

### **3.5.2 Immunfluoreszenzfärbung**

Die Zellen wurden nach Ablauf der Kulturzeit (siehe Abschnitt 3.4) resuspendiert, samt Kulturmedium von der Zellkulturplatte abgenommen und in 4,5ml-Proberöhrchen überführt. Die Kulturplatten wurden unter dem Mikroskop kontrolliert, um sicherzugehen, dass keine adhärenenten Zellen (Makrophagen) zurückgeblieben waren. Die Zellen selbst wurden mit je 2ml FACS Flow gewaschen (400g, 10°C, 5 min). Zu jeder Probe wurden 20µl Polyglobin gegeben (bei ca.  $2,3 \times 10^6$  Zellen / Probe), die Proben anschließend auf dem Vortex resuspendiert und für mindestens 10 min bei 4°C inkubiert. Polyglobin ist ein polyvalentes Immunglobulinpräparat, das die Fc-Rezeptoren der Makrophagen abdeckt. Diese könnten ansonsten die fluoreszierenden Antikörper unspezifisch binden, wodurch das Ergebnis verfälscht würde. Lymphozyten besitzen keine Fc-Rezeptoren, so dass eine unspezifische Bindung bei ihnen nicht zu erwarten ist.

Für die Färbung wurden je 5µl eines Fluorochrom-markierten monoklonalen Antikörpers allein oder in Kombination mit einem zweiten Antikörper in ein Proberöhrchen vorgelegt. Zu jedem Ansatz wurden  $0,8 - 1 \times 10^6$  Zellen in 50µl

Suspension (FACS Flow) pipettiert, die Proben auf dem Vortex gemischt und bei 4°C unter Lichtabschluß für 20 min inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde jeder Ansatz zweimal mit 4ml bzw. 2ml FACS Flow gewaschen (400g, 10°C, 5 min) und innerhalb der folgenden drei Stunden analysiert, wobei die Proben bis zur Messung lichtgeschützt auf Eis aufbewahrt wurden. Direkt vor der Messung wurde jede Probe nochmals sorgfältig resuspendiert (Vortex), um möglicherweise entstandene Zellkonjugate zu lösen.

### 3.5.3 Messung und Auswertung

Die gefärbten Zellen wurden mit dem FACSScan (Fluorescence-Activated Cell Sorter) der Firma Becton Dickinson analysiert. Messung und Auswertung erfolgte mit der Software CellQuest.

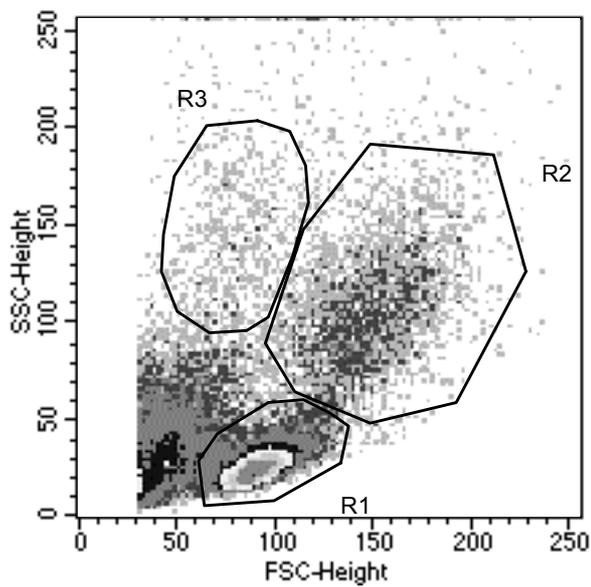
Die durch die Photodetektoren gesammelten Signale wurden als sogenanntes „Dot Plot“ (siehe Abbildung 3.1 (a)) dargestellt, einem Zweiachsenkoordinatensystem, bei dem jede Zelle als Punkt mit Bezug zu zwei der gewonnenen Informationen, aufgetragen auf Abszisse bzw. Ordinate, erscheint. Dabei können den Achsen in beliebiger Kombination Fluoreszenzintensität, Forward (FSC) und Side Light Scatter (SSC) zugeordnet werden, wodurch die Expressionsdichten der untersuchten Antigene zueinander und zu Zellgröße oder Granularität in Bezug gesetzt werden können.

Anhand Zellgröße und Granularität können Lymphozyten und Makrophagen sowie Zelltrümmer (linke untere Ecke) voneinander unterschieden werden (siehe Abbildung 3.1 (a), Lewis & Rickman, 1992). Die Geräteeinstellung für die Kontrolle (ohne Stimulanzen oder zVAD-FMK) wurde bei linearer Messskala von je 250 Einheiten für FSC und SSC so gewählt, dass die Population der Lymphozyten zwischen 70 und 140 auf der FSC-Achse sowie 10 und 50 auf der SSC-Achse, die Population der großen Makrophagen zwischen 100 und 200 auf der FSC- sowie 50 und 180 auf der SSC-Achse zum Liegen kamen. Lymphozyten und Makrophagen wurden jeweils eingegrenzt, wodurch

sogenannte „Gates“ (Auswertefenster) entstanden (Abbildung 3.1 (a)). Die Zellen innerhalb der verschiedenen Gates konnten daraufhin getrennt bezüglich ihrer Fluoreszenz, Zellgröße und Granularität analysiert werden.

Als weitere Darstellungsform wurden Histogramme verwendet, bei denen die Anzahl der Zellereignisse über dem Logarithmus der Fluoreszenzintensität, des Forward oder des Side Light Scatters aufgetragen ist (Abbildung 3.1 (b)).

(a)



(b)

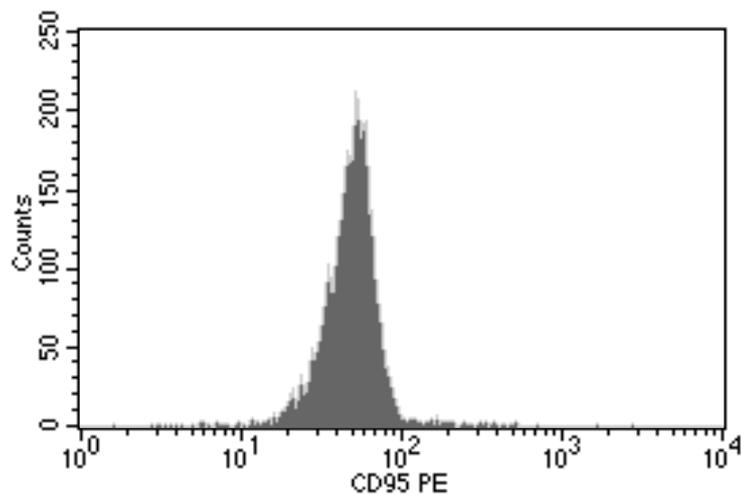
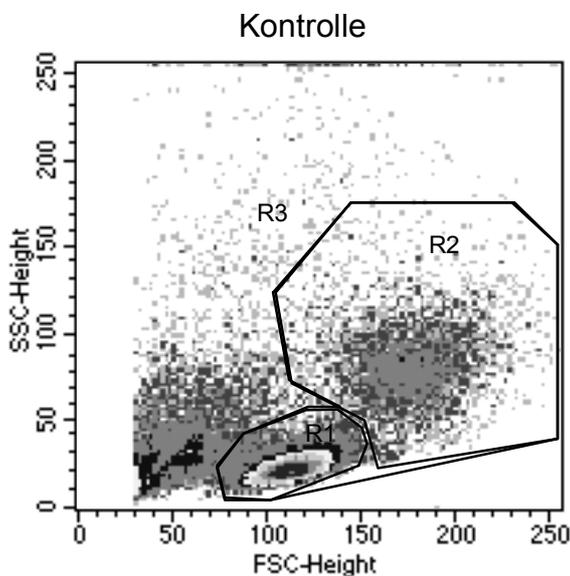


Abbildung 3.1: Verwendete Darstellungsformen der FACS-Analyse

(a) Dot Plot: Abgebildet ist eine Zelldichteverteilung mit FSC/ Zellgröße (x-Achse) versus SSC/ Granularität (y-Achse). R(egion)1 = Lymphozyten, R2 = große Makrophagen, R3 = kleine Makrophagen  
 (b) Histogramm: Gibt die Fluoreszenzintensität nach Färbung mit PE-konjugierten Antikörpern gegen CD95 (x-Achse) in Bezug zur Anzahl der gemessenen Zellereignisse (y-Achse) wider.

Um den relativen Anteil einer Zellpopulation an der Gesamtzellzahl zu bestimmen, wurde die Gesamtheit der mononukleären Zellen, d.h. die Summe aus Lymphozyten und Makrophagen, als 100% definiert und in der FSC-SSC-Darstellung mit einem großen Gate umfasst. Danach wurden Gates um jede der beiden Zellarten allein gesetzt (vergleiche Abbildung 3.2). Ihr jeweiliger Anteil am großen Gate, d.h. an 100%, konnte auf diese Weise berechnet werden.

Die Absolutzellzahlen der einzelnen Populationen ergaben sich durch Multiplikation des berechneten Prozentanteils mit der unter dem Mikroskop gezählten Gesamtzellzahl.

Abbildung 3.2: Zellregionen zur Bestimmung von relativen Anteilen

Abgebildet sind FSC/ Zellgröße (x-Achse) versus SSC/ Granularität (y-Achse) als Zelldichteverteilung. R(egion)1 = Lymphozyten, R2 = Makrophagen, R3 = beide = 100%

Zu Beginn jeder Analyse erfolgte die Geräteeinstellung mit Hilfe einer Negativkontrolle und mit Positivkontrollen in Form von einfach gefärbten Proben. Die Negativkontrolle wurde mit Simultest Control gefärbt und gab die Hintergrundfluoreszenz der Zellen, bestehend aus Autofluoreszenz und unspezifisch gebundenen Antikörpern, wider. Dabei wurden die Verstärkerspannungen für die Fluoreszenzkanäle (FL1, FL2) so gewählt, dass die Negativkontrolle im Dot Plot unterhalb  $10^1$  auf den beiden logarithmischen Achsen (vergleiche Abbildung 3.3 (a)) und die Populationen der Positivkontrollen im Bereich von  $10^3$  auf der zugehörigen Achse lagen (siehe Abbildung 3.3 (b)) (Lewis & Rickman, 1992).

Da sich die Emissionsspektren der beiden Farbstoffe leicht überlappen, kommen geringe Überstrahlungseffekte in den Bereich des jeweils anderen Photodetektors vor. Diese wurden mit Hilfe der einzeln gefärbten Positivkontrollen elektronisch kompensiert, indem die für nur eine Fluoreszenzachse positive Population unter  $10^1$  der anderen, also für diese Probe negative Achse, gedrückt wurde (vergleiche Abbildung 3.3 (b)) (Lewis & Rickman, 1992, Volk, 1991).

Durch die beschriebene Geräteeinstellung wurde das Dot Plot in Quadranten eingeteilt. Im linken unteren Quadranten wurden Zellen mit unspezifisch gebundenen Antikörpern abgebildet. Im linken oberen und im rechten unteren Quadranten fanden sich die einfach gefärbten, im rechten oberen Quadranten alle doppelt gefärbten Zellen (Abbildung 3.3 (c)).

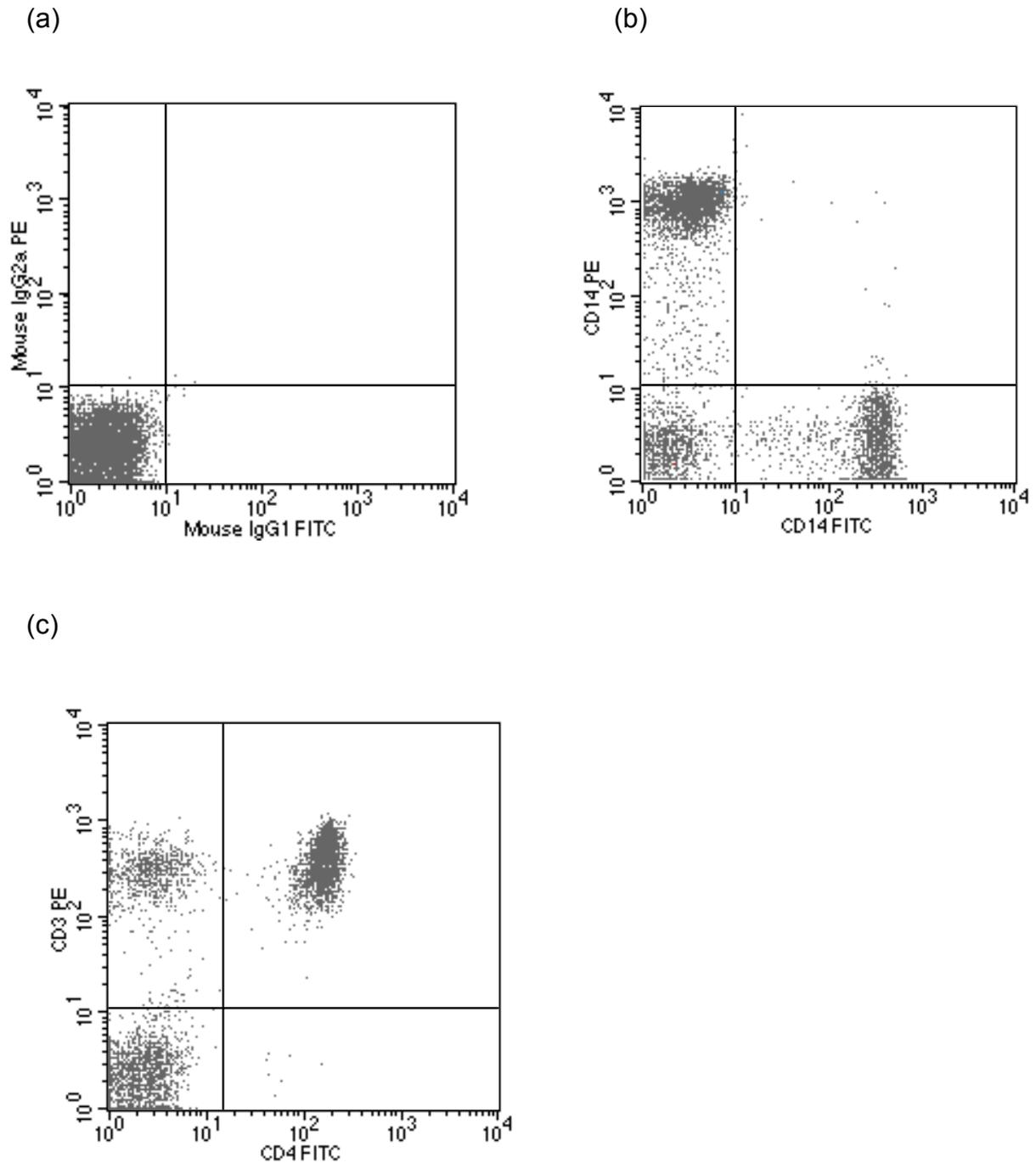


Abbildung 3.3: Geräteeinstellung

(a) Negativkontrolle: Die mit Simultest Control gefärbte Probe spiegelt die Hintergrundfluoreszenz wider und sollte unterhalb  $10^1$  auf x- und y-Achse liegen.

(b) Positivkontrollen: Die Proben wurden einzeln mit FITC- und PE-konjugierten Antikörpern gegen CD14 gefärbt und nach erfolgter Geräteeinstellung in einem gemeinsamen Dot Plot abgebildet. Die beiden Zellpopulationen sollten im Bereich von  $10^3$  auf der

zugehörigen Achse und nach Kompensation unter  $10^1$  der Gegenachse liegen.

(c) Quadranteneinteilung: Die Proben wurden mit FITC- und PE-konjugierten Antikörpern gegen CD4 bzw. CD3 gefärbt. Im rechten oberen Quadranten finden sich die Zellereignisse, die sowohl CD4 als auch CD3 exprimierten. Im linken oberen und rechten unteren Quadranten sind nur CD3- bzw. nur CD4-positive Zellen abgebildet. (Letztere waren in dieser Probe kaum vorhanden.) Im linken unteren Quadranten kommen Zellen mit unspezifisch gebundenen Antikörpern zur Darstellung.

Messeinstellung und Kompensation wurden für Lymphozyten- und Makrophagenfenster getrennt durchgeführt, da Makrophagen eine höhere Eigenfluoreszenz als Lymphozyten aufweisen und deswegen andere Verstärkerspannungen und Kompensationswerte benötigen. Die einzelnen Messungen erfolgten im gewünschten Gate mit zugehöriger Einstellung. Standardmäßig wurden pro Messung im untersuchten Gate 5.000 Zellereignisse gesammelt. Absolute und relative Häufigkeiten sowie mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für die einzelnen Quadranten konnten mit Hilfe der Software berechnet werden.

### **3.6 Apoptose-Detektion**

#### **3.6.1 Vorwärts-, Seitwärtsstreulicht (FSC, SSC) apoptotischer Zellen**

Zu Beginn der Apoptose nimmt das Zellvolumen ab (siehe 1.2.1). Entsprechend sinkt der FSC-Wert apoptotischer Zellen, während der SSC-Wert zunimmt (Dive et al., 1992). Im Dot Plot 'FSC versus SSC' erscheinen die apoptotischen Makrophagen als eigene Population links und leicht oberhalb der lebenden, großen Makrophagen (vergleiche Abbildung 3.4: R3 und R2).

Mit Bildung von Apoptose-Körperchen nehmen sowohl FSC- als auch SSC-Wert ab. Die Membranvesikel erscheinen dann im Bereich der Zelltrümmer im Dot Plot links unten.

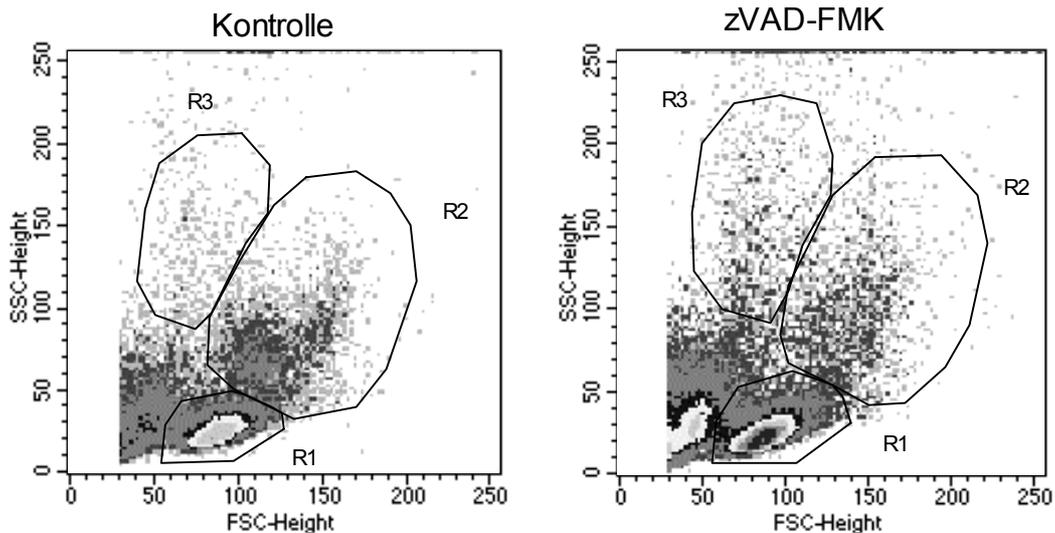


Abbildung 3.4: Apoptose Detektion durch FSC-SSC-Analyse

Dargestellt sind Zelldichteverteilungen mit FSC/ Zellgröße versus SSC/ Granularität von Kontrolle und zVAD-FMK nach 24 Stunden Zellkultur. R(egion)1 = Lymphozyten, R2 = große Makrophagen, R3 = kleine Makrophagen

Das Zellvolumen nekrotischer Zellen dagegen nimmt zu (siehe 1.2.1). Ihr FSC-Wert steigt sofort, der SSC-Wert nimmt ab (Vermes et al., 2000). Nekrotische Makrophagen würden rechts unterhalb der lebenden erscheinen. Sie wurden innerhalb der untersuchten 24 Stunden nicht beobachtet.

Zellkonjugate waren bei den Messungen nicht zu sehen. Sie können während der Aufbewahrung entstehen, wurden jedoch, falls entstanden, durch sorgfältige Resuspension der Proben vor jeder Messung wieder gelöst.

### 3.6.2 Färbung mit Annexin V

Annexin V wurde als gerinnungshemmendes Protein in der Wand von Blutgefäßen entdeckt (Reutelingsperger et al., 1985). Es gehört zur Familie der Annexine, die die gemeinsame Eigenschaft besitzen, in Anwesenheit von Calcium reversibel an Phospholipide zu binden (Andree et al., 1990). Annexin V bindet mit hoher Affinität an Phosphatidyl-Serin, an andere Phospholipide nur in minimalem Maß (Vermes et al., 1995). Phosphatidyl-Serin wird bereits früh in der Apoptose, d.h. mit Beginn der Chromatinkondensation (Vermes et al., 1995), auf die Außenseite der Zellmembran verlagert (siehe 1.2.2.4). Fluorochrom-markiertes Annexin V kann daher als Indikator für frühe Phasen der Apoptose verwendet werden. Verschiedene Studien zeigten eine hohe Spezifität und Sensitivität dieser Färbemethode (Vermes et al., 1995, Koopman et al., 1994).

Die Annexin V-Färbung erfolgte in Gegenwart eines Annexin-Bindungs-Puffers (Binding Buffer: 140mM NaCl, 2,5mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM HEPES/NaOH, pH 7,4). Er enthält eine ausreichend hohe Konzentration an Calcium, um die prinzipiell reversible Bindung von Annexin V an Phosphatidyl-Serin (siehe oben) zu stabilisieren. Nach Inkubation mit dem für Makrophagen typischen FITC-konjugierten Antikörper gegen CD14 bzw. mit einem für Lymphozyten typischen FITC-konjugierten Antikörper wurden die Zellen mit 2ml Annexin-Bindungs-Puffer gewaschen. Pro 1x10<sup>6</sup> Zellen wurden 5µl PE-konjugiertes Annexin V zugegeben, der Ansatz auf dem Vortex durchmischt und 20 min bei 4°C unter Lichtabschluß inkubiert. Danach folgte zweimaliges Waschen mit je 2ml Annexin-Bindungs-Puffer, bevor die Proben möglichst sofort gemessen wurden. In der Zwischenzeit wurden sie lichtgeschützt auf Eis gehalten. Durch die Vorfärbung mit makrophagen- bzw. lymphozytentypischen Antikörpern konnte der Anteil an Annexin V-positiven Zellen in den beiden Population getrennt bestimmt werden.

Um sicher zu gehen, dass Annexin V tatsächlich auf der Membranoberfläche gebunden hatte und nicht in eventuell nekrotische Zellen diffundiert war (Koopman et al., 1994), wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

kontrolliert. Abbildung 3.5 zeigt, dass nur die Membran der Zellen von außen angefärbt ist, wodurch diese als fluoreszierender Kreis erscheint.

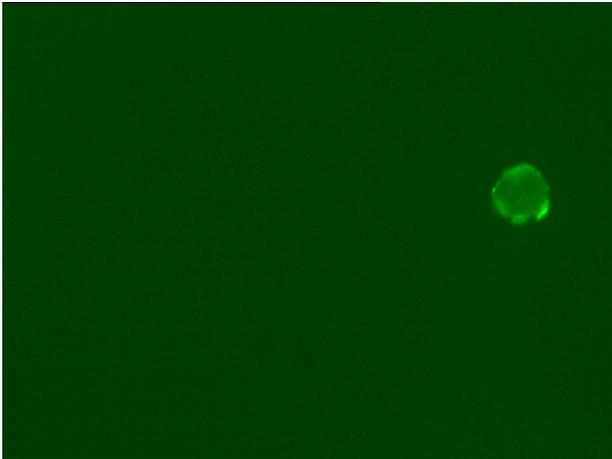


Abbildung 3.5 Fluoreszenzmikroskopie der Annexin V-Färbung  
Das PE-konjugiertes Annexin V bindet an Phosphatidyl-Serin auf der Außenseite der Zellmembran. Die Zelle erscheint als fluoreszierender Kreis.

### 3.6.3 Färbung mit Propidiumiodid

Propidiumiodid (PI) ist ein fluoreszierender DNA-Farbstoff, der nicht durch intakte Zellmembranen diffundieren kann. Sobald die Zellmembran permeabel wird (z.B. durch direkte Schädigung oder durch Energiemangel), färbt PI das Zellinnere an, indem es sich in die DNA-Doppelhelix einlagert (Interkalierung) (Shapiro, 1995). Während sich die Apoptose dadurch auszeichnet, daß die Zellmembran über einen langen Zeitraum intakt bleibt (siehe 1.2.1), verlieren nekrotische Zellen sehr früh ihre Membranintegrität und färben sich deshalb bereits zu Beginn der Nekrose mit PI an. Apoptotische Zellen bzw. apoptotische Körperchen werden dagegen erst in einem späten Stadium durch PI gefärbt.

Um die Ergebnisse zu den makrophagen- bzw. lymphozytentypischen Oberflächenmolekülen und zu den Ergebnissen der Annexin V-Färbung in Bezug setzen zu können, wurden die Zellen vorher, entsprechend der Annexin

V-Färbung (siehe unter 3.6.2), mit FITC-konjugierten Antikörpern markiert. Das in PBS gelöste Propidiumiodid selbst wurde erst 5-10 min vor der Messung in der Endkonzentration von 0,2µg/ml zugegeben, die Probe auf dem Vortex resuspendiert und bis zur Messung bei Zimmertemperatur gehalten.

### 3.7 Zellfunktionstests

#### 3.7.1 Makrophagenstimulation mit LPS

Lipopolysaccharid (LPS), auch Endotoxin genannt, ist Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien (Kayser et al., 1998). Während einer Infektion wird abgespaltenes / freies oder in der Bakterienwand verankertes LPS im Blut durch das Lipopolysaccharid-bindende-Protein (LBP) gebunden. Makrophagen exprimieren Rezeptoren für den entstandenen LPS-LBP-Komplex: CD14-Moleküle (siehe 1.1.3). Durch das gebundene LPS werden die Makrophagen aktiviert sowie zur Bildung und Sekretion von Zytokinen, v.a. TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 angeregt (Wright et al., 1990). Übermäßige Freisetzung von LPS und darauf folgende Sekretion der genannten Mediatoren in großer Menge werden für die Entstehung des septischen („endotoxischen“) Schocks durch gramnegative Bakterien mitverantwortlich gemacht (Lazaron & Dunn, 2002).

Vorinkubation der Zellen mit dem makrophagenstimulierenden Zytokin IFN- $\gamma$  verstärkt die Antwort auf LPS um das zehnfache bis hundertfache (sogenanntes „priming“). Grund hierfür ist die Aufregulation des „Toll-Like“-Rezeptors 4 (TLR4), eines Signaltransduktionsmoleküls innerhalb der Reaktionskaskade, die durch die LPS-Bindung ausgelöst wird (Bosisio et al., 2002).

Aktivierung der Makrophagen mit LPS oder anderen stimulierenden Faktoren (z.B. TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , GM-CSF) schützt sie nachweislich vor der Apoptose durch z.B. CD95-CD95-Ligand-Interaktion, Stickstoffmonoxid (NO), radioaktive Bestrahlung oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Perera & Waldmann, 1998, Mangan et al., 1991a, Mangan & Wahl, 1991b).

CD14 wird durch LPS je nach zusätzlich in der Kultur enthaltenen Zellen, Kulturbedingung, LPS-Konzentration und Messzeitpunkt unterschiedlich reguliert (Maliszewski & Wright, 1991, Bazil & Strominger, 1991, Marchant et al., 1992, Ziegler-Heitbrock & Ulevitch, 1993, Landmann et al., 1991, Landmann et al., 1996). Bei vergleichbaren Kulturbedingungen beschrieb Landmann et al., 1996, dass CD14 durch LPS in den ersten Stunden herabreguliert (um max. 50% bei 15 Stunden), später wieder aufreguliert wird, um nach 24 Stunden knapp den Ausgangswert zu erreichen und ihn in den folgenden Tagen zu überschreiten.

Interferon- $\gamma$  dagegen reguliert CD14 stark, schnell (bereits nach 15 min nachweisbar) und dauerhaft herab (Marwitz et al., 1988, Landmann et al., 1991, Bazil & Strominger, 1991, Ziegler-Heitbrock & Ulevitch, 1993).

Mit der LPS-Stimulation wurde untersucht, ob eine Aktivierung der Makrophagen Einfluss auf ihr Apoptoseverhalten und ihre CD14-Regulation durch zVAD-FMK hat (siehe Ergebnisteil 4.9). Es wurden folgende LPS-Konzentrationen verwendet:

LPS 0,1 $\mu$ g/ml, LPS 1 $\mu$ g/ml und IFN $\gamma$  500IE/ml (Vorinkubation für eine Stunde) plus LPS 0,1 $\mu$ g/ml (vergleiche 3.4).

### 3.7.2 T-Zelldeletion und –stimulation mit OKT3

OKT3 ist ein mäuselicher monoklonaler Antikörper gegen das CD3-Molekül menschlicher T-Lymphozyten (siehe 1.1.3). Es ist als erster monoklonaler Antikörper gegen CD3 (Kung et al., 1979) seit 1984 kommerziell erhältlich. Neben dem Einsatz in der Forschung werden antiCD3-Antikörper therapeutisch als Immunsuppressiva v.a. zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen oder bei Autoimmunkrankheiten verwendet (Cruse & Lewis, 1999, Chatenoud, 2003). OKT3 bindet reife T-Lymphozyten im peripheren Blut (Kung et al., 1979), deren Anzahl bereits kurze Zeit später abfällt. Die T-Zellzerstörung basiert auf vier Mechanismen (Chatenoud, 2003): Komplement-vermittelte Zerstörung opsonierter T-Zellen; antikörper-abhängige

Zellzytotoxizität (ADCC) durch NK-Zellen oder Makrophagen; direkte Signaltransduktion durch die Antikörper mit nachfolgender Apoptose v.a. von aktivierten T-Zellen und schließlich umgeleitete Zytotoxizität zwischen den T-Zellen selbst, wenn ihre CD3-Antigene durch die Antikörper miteinander verbunden wurden. Verbleibende T-Zellen internalisieren (reversibel) ihre CD3-Komplexe, wodurch sie selbst „blind“ für andere Antigene werden (Chatenoud, 2003). Insgesamt hemmt OKT3 die antigen-spezifischen Antwort aktivierter T-Zellen und blockiert die Effektorfunktionen zytotoxischer T-Zellen (Chang & Gingras, 1981, Cruse & Lewis, 1999).

AntiCD3-Antikörper mit Fc-Regionen wie OKT3 zeigen einen zusätzlichen Effekt: Sie wirken als potente Mitogene auf ruhende T-Zellen (Van Wauwe et al., 1980) und stimulieren sie zu T-Zellproliferation und Zytokinproduktion. Diese mitogene Wirkung ist makrophagenabhängig (Chatenoud, 2003, Papadogiannakis et al., 1986). Letztere binden die antiCD3-Antikörper über ihre Fc-Rezeptoren und bilden Zellkonjugate mit den T-Zellen. Diese werden dadurch entweder zerstört (ADCC, siehe oben) oder aktiviert und zur Proliferation angeregt werden (mitogene Wirkung) (Orlikowsky et al., 1996, Wang et al., 1998). Die Art der T-Zellantwort wird durch den Aktivierungsgrad der Makrophagen und die Anzahl der exprimierten kostimulatorischen Signale (B7-Moleküle, siehe 4.6.2) bestimmt (Orlikowsky et al., 1999, Orlikowsky et al., 2003, Dudhane et al., 1996a). Die Makrophagen selbst begehen, nachdem sie die OKT3-Wirkung auf die T-Zellen vermittelt haben, „Activation induced Cell Death“ (AICD) (Wang et al., 1998).

Die beschriebene doppelte Wirkung von OKT3 führt zu einer biphasischen T-Zellantwort: In den ersten 24 Stunden nach OKT3-Stimulation nimmt die T-Zellzahl in Kultur ab (T-Zellzerstörung), um in den folgenden Tagen durch Blastenbildung wieder zuzunehmen und die Ausgangszellzahl schließlich zu überschreiten (Orlikowsky et al., 1996).

Zur Stimulation wurde OKT3 in der Konzentration 5µg/ml zur Zellkultur gegeben (siehe 3.4).

OKT3 und der durchflusszytometrische antiCD3-Färbeantikörper hemmen sich kompetitiv in ihrer Bindung von CD3. Zur Bestimmung der T-Zellzahl wurden die

Zellen deshalb mit Antikörpern gegen CD4 und CD8 gefärbt. Die Summe aus CD4-positiven und CD8-hochpositiven Lymphozyten entspricht der Anzahl an CD3 T-Zellen insgesamt (Lewis & Jackson, 1992, Chatenoud, 2003).

Da T-Zellblasten größer als ruhende T-Zellen sind (Orlikowsky et al., 1996), können sie durchflusszytometrisch aufgrund höherer FSC-Werte abgegrenzt werden. Ihr Anteil an den Gesamt-T-Zellen lässt sich auf diese Weise berechnen.

### **3.7.3 Deletion der CD4 T-Zellen mit ch412**

Wie bereits beschrieben (3.7.2 und 1.4) bilden Makrophagen Zellkonjugate mit T-Zellen, indem sie antilymphozytäre Antikörper durch ihre Fc-Rezeptoren binden. Immunglobuline gegen Bestandteile des T-Zellrezeptorkomplexes (z.B. gegen CD3) können sowohl zur Zerstörung als auch zur Aktivierung und Proliferation von T-Zellen führen (vergleiche 3.7.2). Dagegen verursachen Antikörper, die die Korezeptoren CD4 oder CD8 ohne vorausgehende Stimulierung des T-Zellrezeptors binden, nur eine T-Zelldeletion und keine T-Zellaktivierung (Orlikowsky et al., 1998, Wang et al., 1998, Koretzky & Peterson, 2001).

ch412 ist ein monoklonaler Antikörper gegen das CD4-Molekül menschlicher T-Lymphozyten. Makrophagen erkennen das an CD4 gebundene ch412 oder „bewaffnen“ ihre Fc-Rezeptoren mit den antiCD4-Antikörpern. Die folgende Zellkonjugatbildung führt über antikörperabhängige Zellzytotoxizität (ADCC) zur Zerstörung der CD4 T-Zelle, die zumindest teilweise auf CD95-getriggert Apoptoseinduktion in den CD4-Zellen basiert (Choy et al., 1993, Wang et al., 1994a, Oyaizu et al., 1997, Orlikowsky et al., 1997a, Oyaizu et al., 1994, Wang et al., 1998, Tateyama et al., 2000).

Im Gegensatz zur Stimulation mit antiCD3-Antikörpern (3.7.2) haben antiCD4-Antikörper keinen Einfluss auf das Überleben der Makrophagen (Choy et al., 1993, Rep et al., 1997).

Deletion und fortschreitender Schwund der CD4 T-Zellen ist auch Kennzeichen einer HIV-Infektion, bei der die antiCD4-Antikörper durch Komplexe aus dem Protein gp120 der Virushülle und gp120-spezifischen Immunglobulinen nachgeahmt werden (Dudhane et al., 1996b, Wang et al., 1994b). Der antiCD4-Antikörper ch412 wurde in der Konzentration 1µg/ml verwendet (vergleiche 3.4). ch412 und der antiCD4-Färbeantikörper für die Durchflusszytometrie (Klon SK3) binden an unterschiedliche Epitope des CD4-Moleküls, wodurch eine Kreuzreaktion und kompetitive Bindungshemmung vermieden wurde.

### 3.8 Überprüfung einer möglichen DMSO-Wirkung

DMSO (Dimethylsulfoxid) wurde zum Auflösen von zVAD-FMK verwendet (siehe unter 3.3).

Um DMSO-induzierte Effekte auszuschließen, wurden drei Experimente mit 10mM DMSO-Lösung (ohne zVAD-FMK) durchgeführt. Die untersuchten Rezeptoren CD14, CD4, CD8 und die für sie positiven Zellpopulationen wurden durch DMSO nicht verändert (vergleiche Tabelle 3.1).

	PB– Kontrolle	PB– DMSO	NSB– Kontrolle	NSB- DMSO
CD14-MFI	1569 ± 387	1474 ± 603	1197 ± 356	1393 ± 665
CD4-MFI	121 ± 10	107 ± 10	181 ± 11	169 ± 10
CD8-MFI	1403 ± 384	1254 ± 413	2485 ± 249	2325 ± 267
% CD14+	93 ± 1	92 ± 0,3	78 ± 5	78 ± 6
% CD4+	45 ± 10	45 ± 7	47 ± 9	52 ± 4
% CD8+	23 ± 4	23 ± 5	10 ± 4	10 ± 4

**Tabelle 3.1:** Vergleich von Kontrolle (= kein DMSO) und 10mM DMSO nach 24h  
Die Färbung wurde mit FITC-konjugierten Antikörpern gegen CD4 und PE-konjugierten Antikörpern gegen CD14 und CD8 nach 24 Stunden Inkubation der Zellen mit bzw. ohne DMSO durchgeführt. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung von drei Versuchen.

### 3.9 Statistik

Alle Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Unterschiede zwischen den Meßwerten wurden mit dem Student's *t*-Test für unverbundene Meßreihen auf Signifikanz überprüft, wobei das Signifikanzniveau auf  $p \leq 0,05$  gesetzt wurde. Die statistische Analyse wurde mit der Software SigmaPlot 2000 für Windows, Version 6.0 durchgeführt.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Abnahme des Makrophagenanteils durch zVAD-FMK

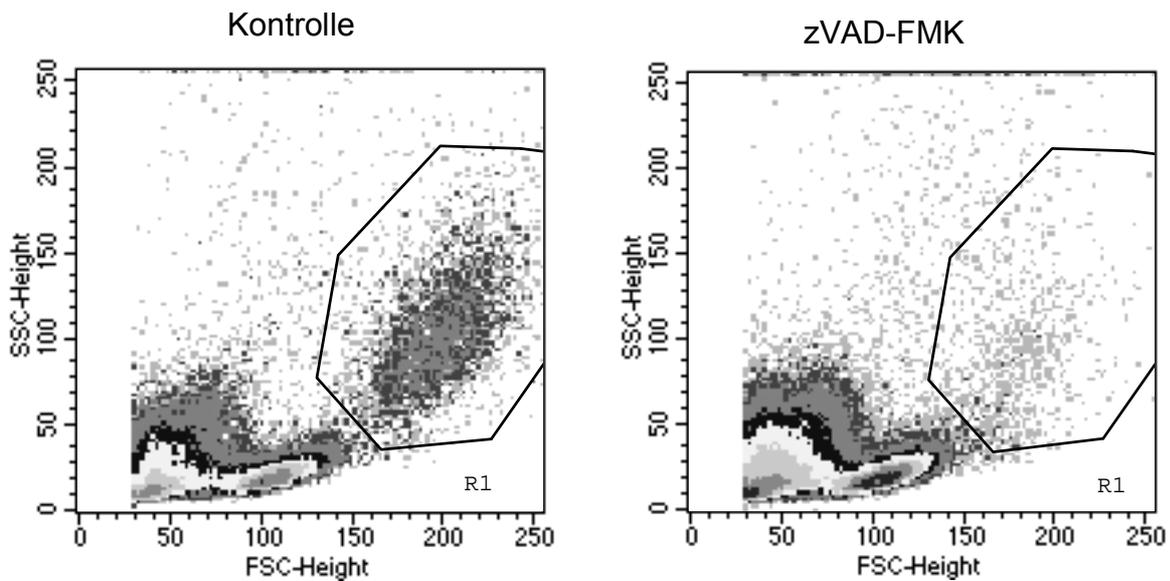
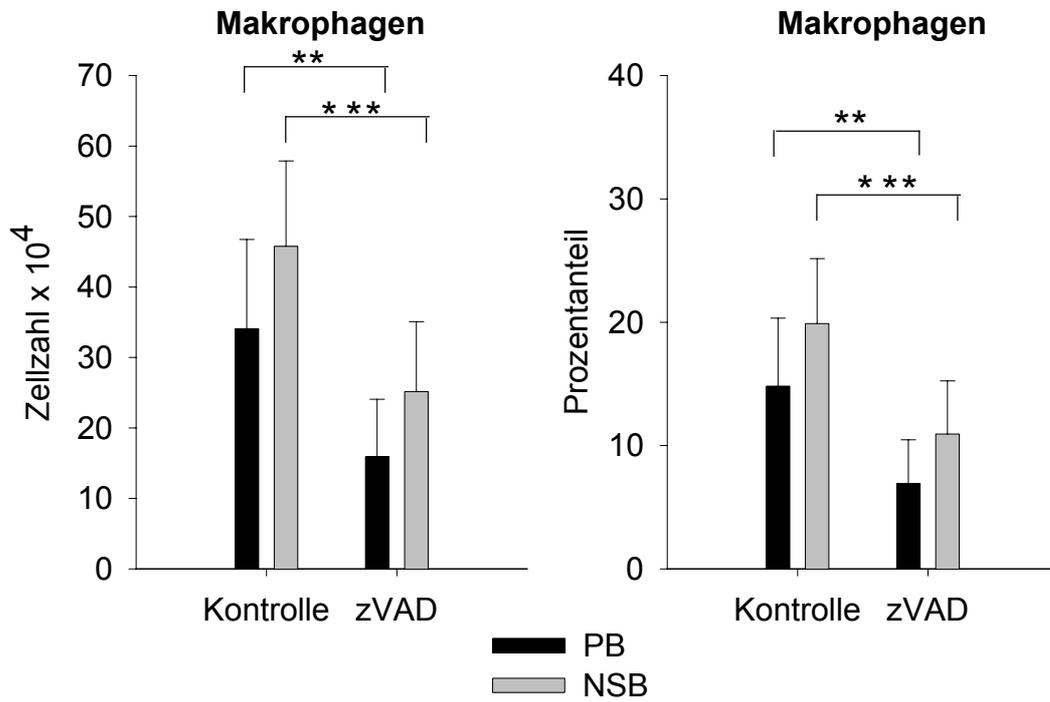


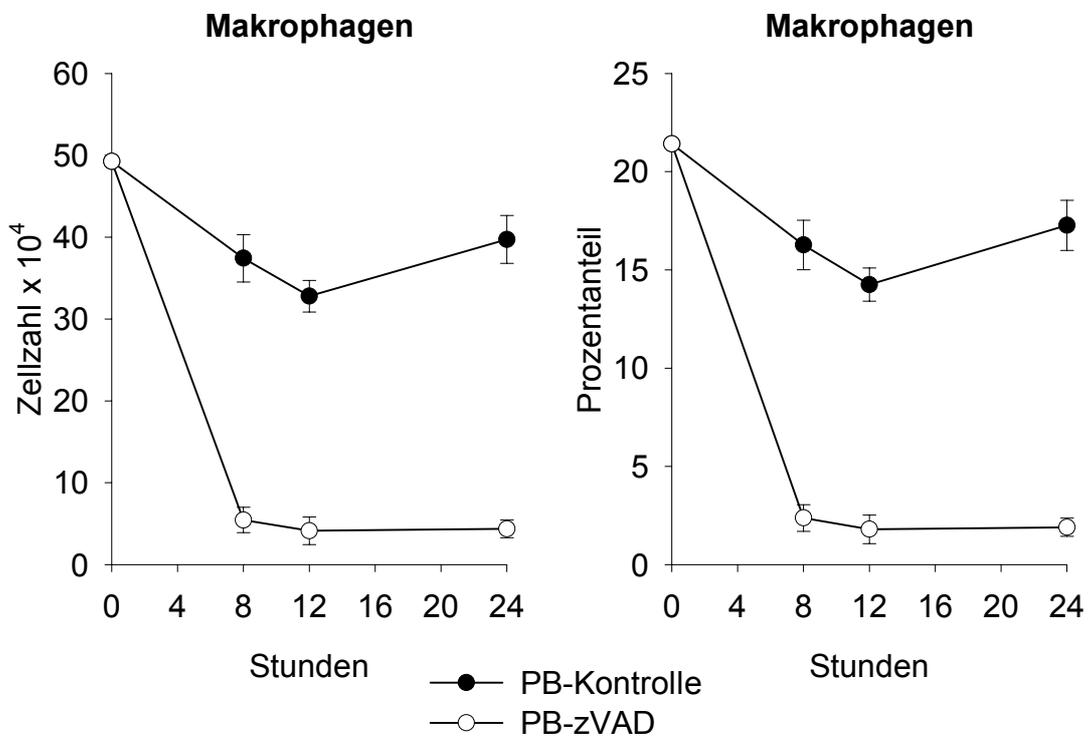
Abbildung 4.1: Zelldichteverteilung von Kontrolle und zVAD-FMK (FACS-Darstellung) ‚Forward Light Scatter‘ (FSC) versus ‚Side Light Scatter‘ (SSC) nach 24-stündiger Zellkultur der mononukleären Zellen ohne bzw. mit zVAD-FMK. R(egion) 1 = Makrophagen.

Durch Inkubation mit zVAD-FMK (40 $\mu$ M) halbierte sich der Makrophagenanteil innerhalb von 24 Stunden. Im Erwachsenenblut (PB) sank er von 15% auf 7%, bei den Zellen aus Nabelschnurblut (NSB) von 20% auf 11% (PB:  $p=0,007$ , NSB:  $p=0,0003$ , siehe Abbildungen 4.1 und 4.2 (a)). Der beschriebene Makrophagenschwund vollzog sich zum größten Teil bereits in den ersten acht Stunden (Abbildung 4.2 (b)).

(a)



(b)



**Abbildung 4.2: Absolutzahl und relativer Anteil an Makrophagen**

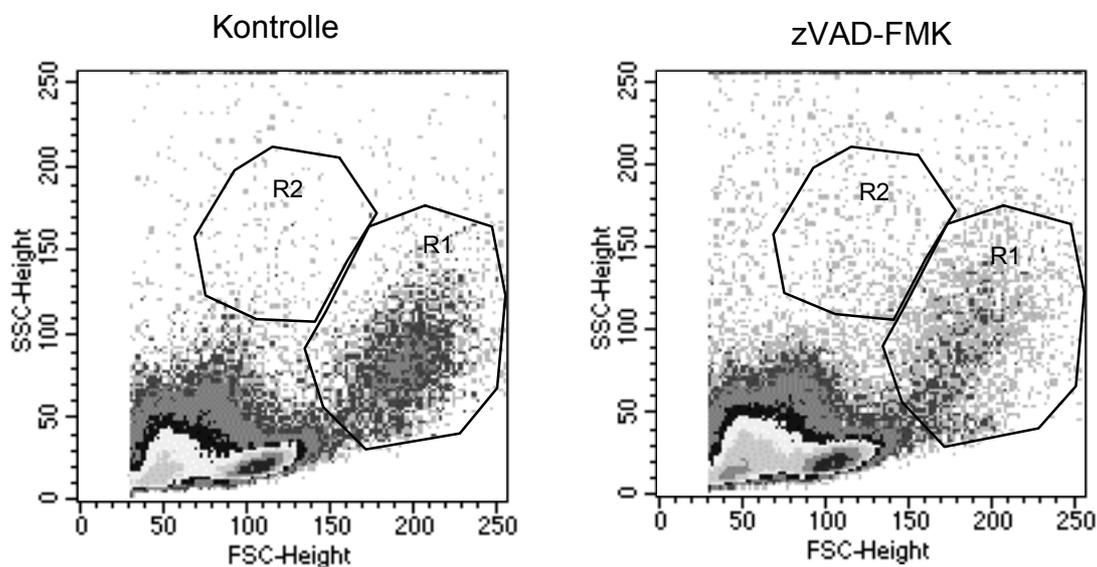
Das Makrophagenfenster wurde in der FSC-SSC-Darstellung gesetzt und der Makrophagenanteil an den Gesamtzellen bestimmt (Lymphozyten + Makrophagen = 100%, siehe 3.5.3). Multiplikation des Prozentanteils mit der unter dem Mikroskop gezählten Gesamtzahl ergab die Absolutzahl an Makrophagen. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,0005$

(a) Absolutzahl und relativer Anteil an Makrophagen nach 24 Stunden, Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von elf Versuchen

(b) Kinetik über 24 Stunden, Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von zwei Versuchen mit peripherem Erwachsenenblut bei vergleichbaren Ergebnissen im Nabelschnurblut

**4.2 Änderung von Makrophagengröße und -granularität**

Im durchflusszytometrischen Bild stellte sich nach Inkubation mit zVAD-FMK eine Population kleinerer und stärker granulierter Zellen links oberhalb der Makrophagen dar, die in der Kontrolle nicht vorhanden oder zumindest deutlich geringer war (siehe Abbildung 4.3).

**Abbildung 4.3: Population geschrumpfter Zellen (FACS-Darstellung)**

‚Forward Light Scatter‘ (FSC) versus ‚Side Light Scatter‘ (SSC) nach 24-stündiger Zellkultur der mononukleären Zellen ohne bzw. mit zVAD-FMK. R(egion)1 = Makrophagen, R(egion)2 = kleine Zellen.

Ein großer Teil der kleinen Zellen exprimierte CD14. Der Anteil an Zellen mit für Lymphozyten typischen Oberflächenantigenen (CD4, CD8, CD3, CD28, CD19, CD56) war dagegen gering (siehe Tabelle 4.1).

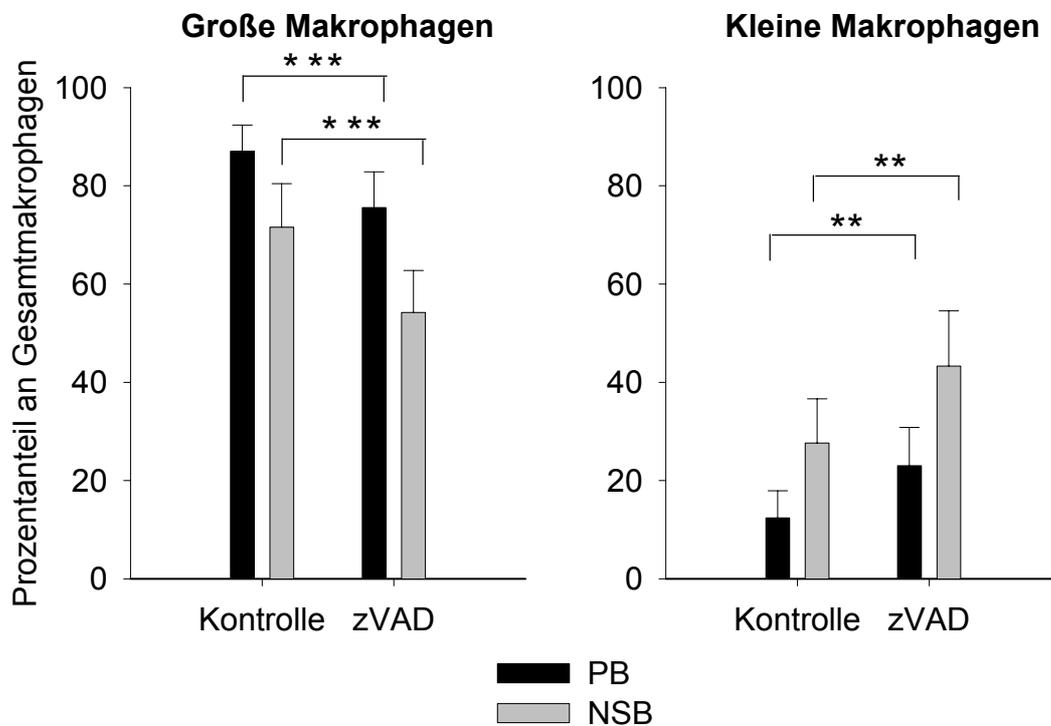
Anteil an	<u>PB</u> : Große Makrophagen	<u>PB</u> : Kleine Makrophagen	<u>NSB</u> : Große Makrophagen	<u>NSB</u> : Kleine Makrophagen
%CD14+ Kontrolle	95 ± 2	59 ± 4	82 ± 5	49 ± 12
%CD14+ zVAD	37 ± 7	52 ± 5	42 ± 5	50 ± 5
Kontrolle & zVAD:				
%CD4+	<3	<1,2	<3	<2
%CD8+	<2,5	<2	<2	<1,2
%CD3+	<3	<1,3	<3	<1,8
%CD28+	<3	<2	<3	<2
%CD19+	<1,5	<0,5	<1	<0,5
%CD56+	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5

Tabelle 4.1: Anteile an gefärbten Zellen der großen und kleinen Makrophagen  
Die Färbung erfolgte mit FITC-konjugierten Antikörpern gegen CD4, CD56 und PE-konjugierten Antikörpern gegen CD14, CD8, CD19, CD28 nach 24 Stunden Inkubation der Zellen ohne und mit zVAD-FMK. Angegeben sind Mittelwerte (und Standardabweichung) von fünf (CD14-, CD4-, CD8-positive Zellen) bzw. drei (CD3-, CD19-, CD28-, CD56-positive Zellen) Versuchen.

Die bisher dargestellten Ergebnisse zusammengefasst, nahmen die normal großen Makrophagen durch die Wirkung von zVAD-FMK ab, während sich gleichzeitig eine neue Population kleinerer, stärker granulierter, aber ebenfalls CD14-positiver Zellen abgrenzte. Dies führte zu der Hypothese, daß es sich bei den kleinen Zellen um geschrumpfte Makrophagen handelte.

Betrachtete man beiden Populationen nebeneinander, zeigte sich eine signifikante Verschiebung ( $p < 0,005$ ) von normal großen Makrophagen (im weiteren Verlauf „große Makrophagen“ genannt) hin zu geschrumpften (im Folgenden als „kleine Makrophagen“ bezeichnet) (vergleiche Abbildung 4.4).

(Signifikanzen in der Abnahme an großen Makrophagen: PB:  $p = 0,0004$ , NSB:  $p = 0,0001$  und in der Zunahme der kleinen Makrophagen: PB:  $p = 0,001$ , NSB:  $p = 0,002$ ).



**Abbildung 4.4: Veränderungen in den Anteilen an großen und kleinen Makrophagen**  
 Nach 24-stündiger Kultur mit bzw. ohne zVAD-FMK wurden die beiden Makrophagenfenster in der FSC-SSC-Darstellung der FACS-Messung gesetzt (siehe Abb. 4.3) und ihr jeweiliger Anteil an den Gesamtmakrophagen bestimmt. Dazu wurde ein großes Gate um beide Makrophagenpopulationen als 100% definiert (vergleiche auch 3.5.3). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von elf Versuchen. \*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,0005$

Wurden beide Makrophagenpopulationen zusammengezählt, ergab sich, dass zVAD-FMK nicht nur zu einer Abnahme der großen Makrophagen, sondern auch der Gesamtmakrophagen führte: Im Erwachsenenblut sank ihr Anteil an den Gesamtzellen (kleine Makrophagen in 100% miteinbezogen) von 16,9% auf 11,2% und ihre absolute Zellzahl von  $38,9 \times 10^4$  auf  $25,8 \times 10^4$ , im Nabelschnurblut von 23,8% auf 18,9% bzw. von  $54,7 \times 10^4$  auf  $43,4 \times 10^4$  (Werte von je elf Versuchen, Messung nach 24 Stunden).

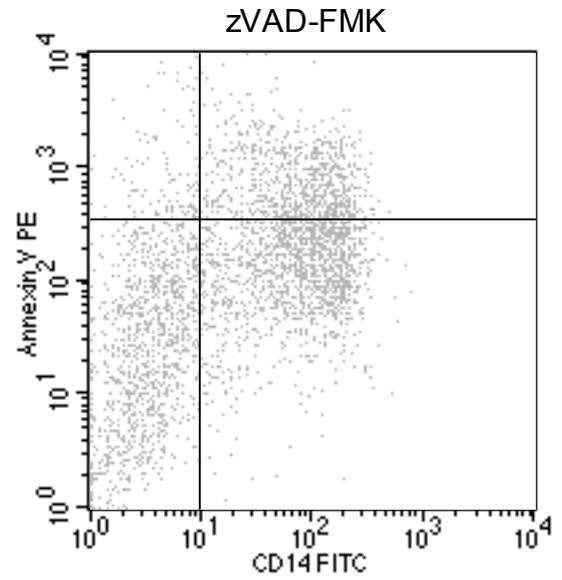
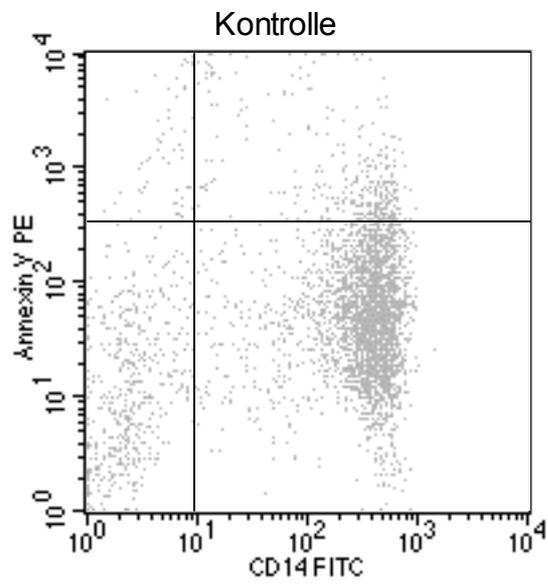
### 4.3 Färbung mit Annexin V und Propidiumiodid

Basierend auf der beobachteten Abnahme der Makrophagenzahl mit begleitender Zellschrumpfung entstand die Vermutung, daß zVAD-FMK in den Makrophagen Apoptose induziert hatte.

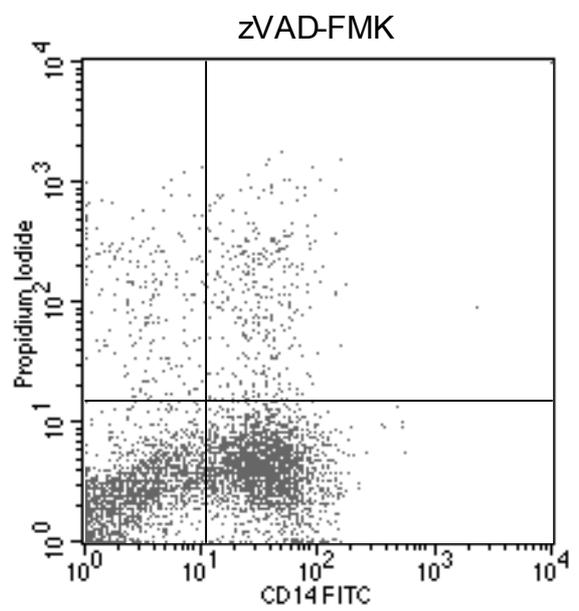
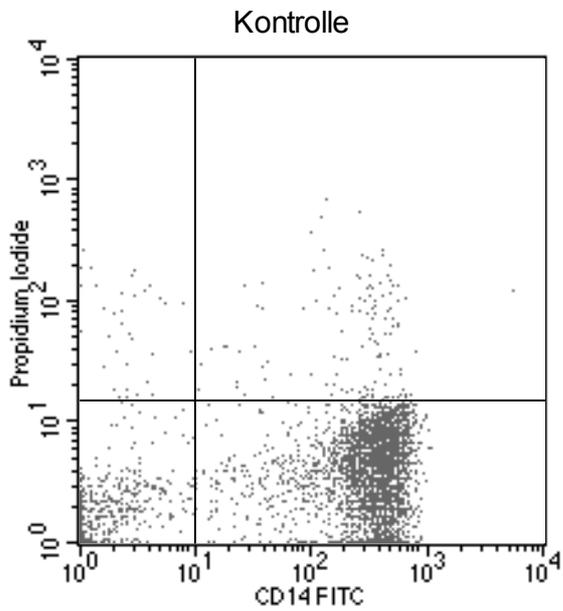
Zur Bestätigung wurden Färbungen mit Annexin V als Indikator für frühe Phasen der Apoptose und mit Propidiumiodid, das erst spätere Apoptosestadien anfärbt, durchgeführt (siehe Methodenteil 3.6).

Folgende Daten zu den Annexin- und Propidiumiodid-Färbungen beziehen sich nur auf die großen Makrophagen. Die wenigen kleinen Makrophagen, die in der Kontrolle vorhanden waren, waren bereits zu  $60\% \pm 19\%$  (PB, n=3) Annexin V- und zu  $62\% \pm 6\%$  (PB, n=3) Propidiumiodid-positiv. Die Annexin V-positiven Makrophagen nahmen durch zVAD-FMK in 24 Stunden von durchschnittlich 8% auf 22% (PB) bzw. 15% (NSB) zu (Abbildungen 4.5 (a) und (c), PB:  $p=0,002$ , NSB:  $p=0,02$ ). Das Ergebnis der Propidiumiodid-Färbung stimmte damit überein: Der Anteil an Propidiumiodid-positiven Makrophagen verdoppelte sich von ca. 2% auf 4% (Abbildungen 4.5 (b) und (c), PB:  $p=0,01$ , NSB:  $p=0,007$ ).

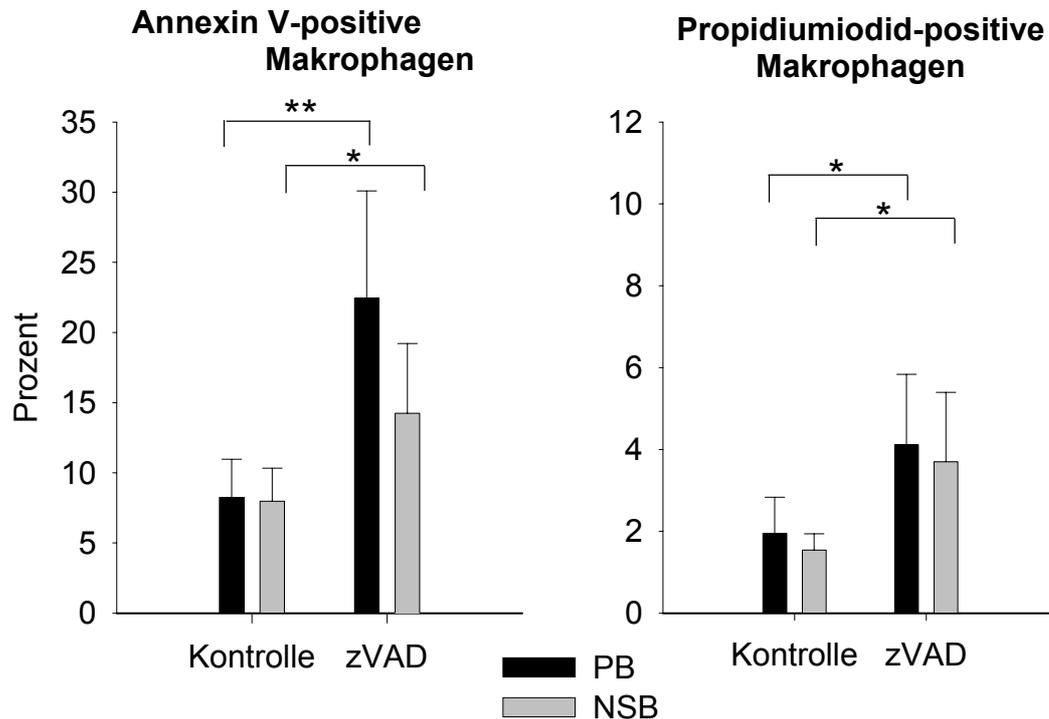
(a)



(b)



(c)



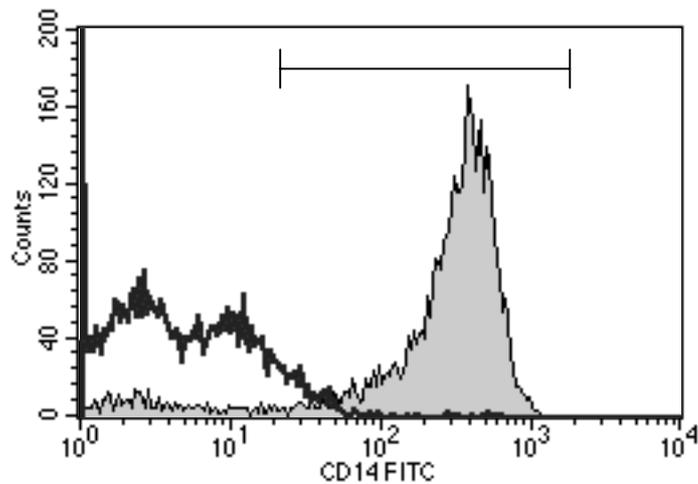
**Abbildung 4.5:** Annexin V- und Propidiumiodid-positive Makrophagen nach 24h  
 Die Färbung wurde mit FITC-konjugierten Antikörpern gegen CD14 und/ oder PE-konjugiertem Annexin V oder Propidiumiodid nach 24 Stunden Inkubation der Zellen ohne bzw. mit zVAD-FMK durchgeführt.  
 (a) Färbung der Makrophagen mit CD14 und Annexin V (Dot Plot): Repräsentative Darstellung für insgesamt elf Färbungen  
 (b) Färbung der Makrophagen mit CD14 und Propidiumiodid (Dot Plot): Repräsentative Darstellung für insgesamt elf Färbungen  
 (c) Annexin V- und Propidiumiodid-positive Makrophagen: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von sechs (Annexin V-pos.) bzw. sieben (Propidiumiodid-pos.) Versuchen, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$

#### 4.4 Regulation des CD14-Oberflächenmoleküls

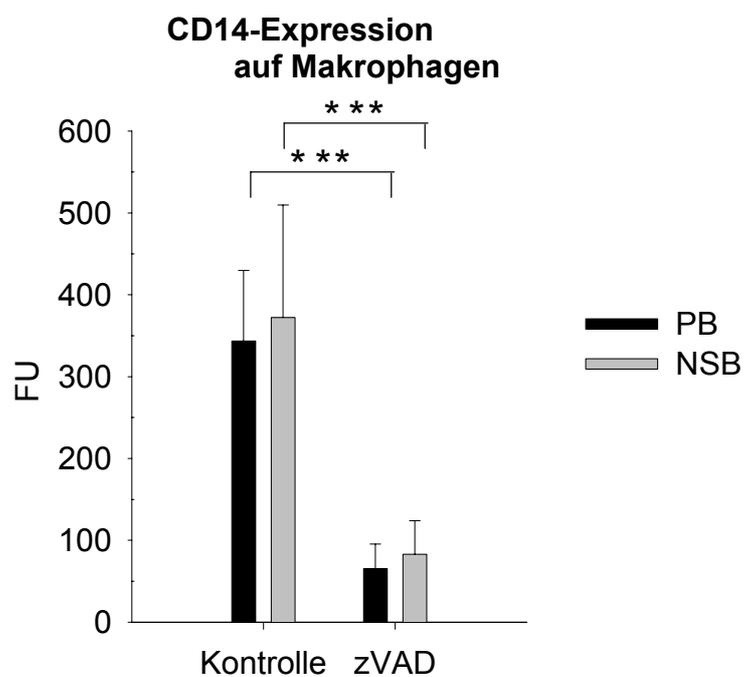
zVAD-FMK bewirkte innerhalb von 24 Stunden eine hochsignifikante Herabregulation des CD14-Moleküls um ca. 80% im Vergleich zu den Kontrollmakrophagen (PB:  $p = 0,00000009$ , NSB:  $p = 0,00002$ ). Dabei exprimierten Erwachsene und kindliche Makrophagen CD14 in vergleichbarer Dichte (siehe Abbildung 4.6).

Die dargestellten Werte beziehen sich auf die Gesamtpopulation der Makrophagen, d.h. auf große und kleine Makrophagen zusammen. Das gilt in gleicher Weise für die folgenden Ergebnisse unter 4.6 und 4.7.

(a)



(b)



**Abbildung 4.6: CD14-Expression der Makrophagen**

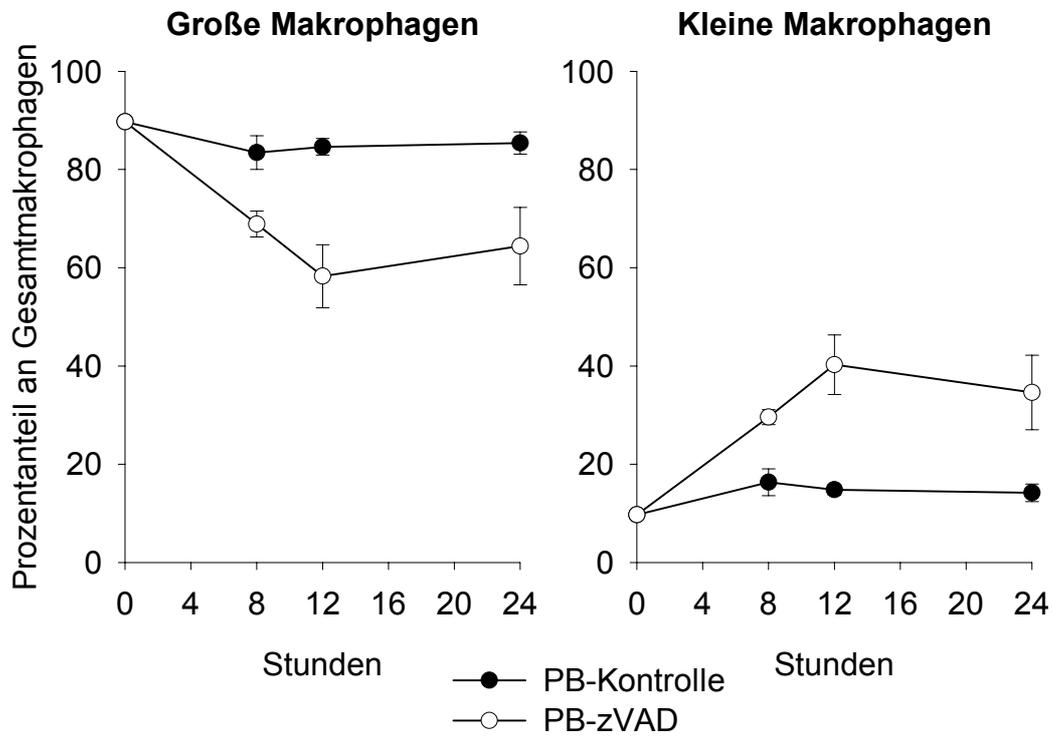
Die Färbung erfolgte mit FITC-konjugierten Antikörpern gegen CD14 nach 24 Stunden Inkubation der Zellen ohne bzw. mit zVAD-FMK. (a) Histogramm der CD14-Färbung (FACS-Darstellung): graue Fläche = Kontrolle, (dicke) schwarze Linie = zVAD-FMK, repräsentative Abbildung für insgesamt vierzehn Färbungen  
(b) CD14-Expression nach 24 Stunden: Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von neun Versuchen. \*\*\*  $p < 0,00005$

**4.5 Zeitliche Abfolge der geschilderten Ergebnisse**

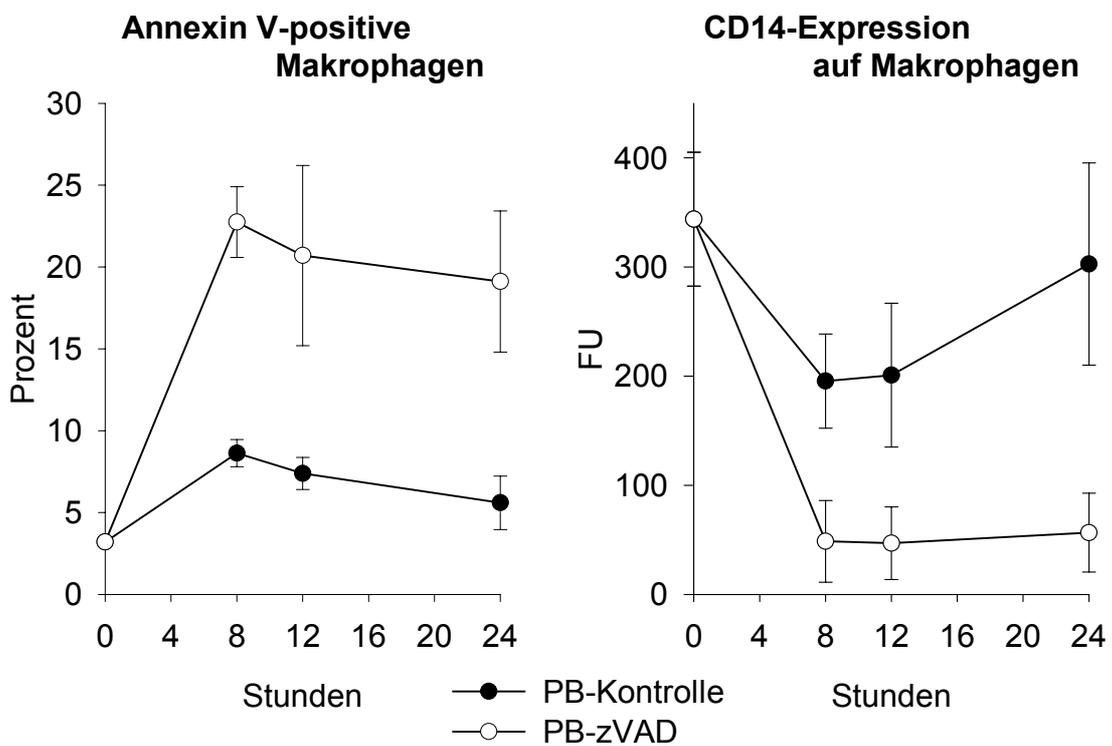
Der Schrumpfungprozess der Makrophagen und die dadurch bedingte Zunahme an kleinen Makrophagen waren bereits nach acht Stunden deutlich zu sehen mit einem Maximum nach zwölf Stunden (siehe Abbildung 4.7 (a)). Herabregulation des CD14-Moleküls und der Anstieg an Annexin V-positiven Makrophagen verliefen parallel zueinander. Sie erreichten bereits nach acht Stunden ihren Höchst- bzw. Tiefstwert (Abbildung 4.7 (b)). Zeitlich versetzt zur Annexin V-Färbung lag das Maximum der Propidiumiodid-positiven Makrophagen bei zwölf Stunden (siehe Abbildung 4.7 (c)).

Bedingt durch die Herabregulation des CD14-Moleküls (Abbildung 4.6) nahm auch der Anteil an CD14-positiven Makrophagen stetig ab (siehe Abbildung 4.8). In der Kontrolle waren nach 24 Stunden  $86\% \pm 4\%$  der Makrophagen im Erwachsenenblut und  $64\% \pm 9\%$  im Nabelschnurblut CD14-positiv. Ihr Anteil halbierte sich im Erwachsenenblut durch die Zugabe von zVAD-FMK und betrug  $39\% \pm 11\%$  ( $p=0,00000002$ ,  $n=8$ ). Im Nabelschnurblut sank er ebenfalls signifikant um 20% auf  $42\% \pm 6\%$  ( $p=0,000034$ ,  $n=8$ ).

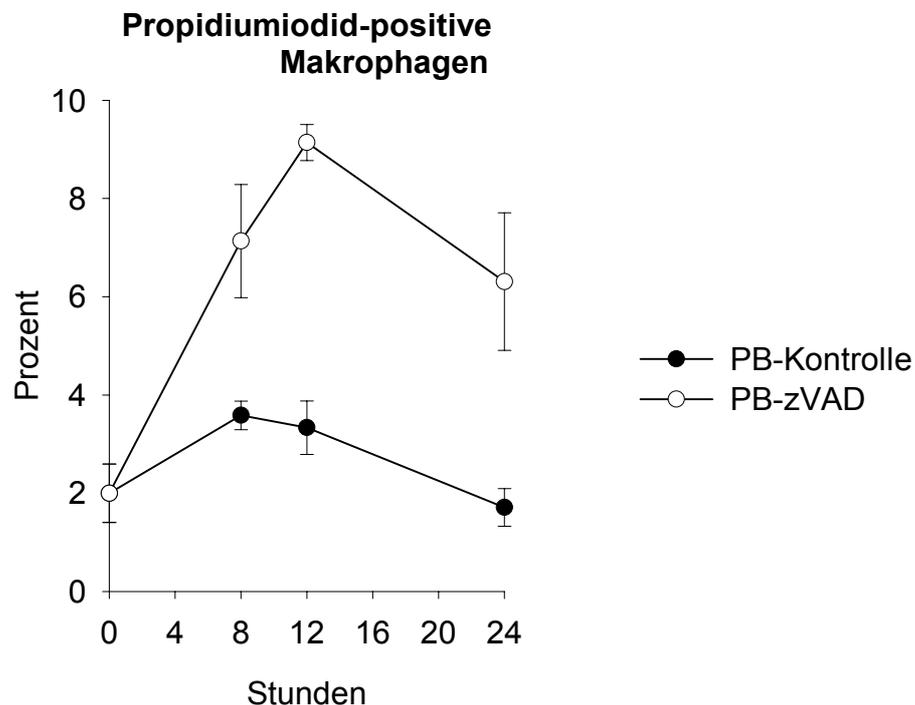
(a)



(b)



(c)



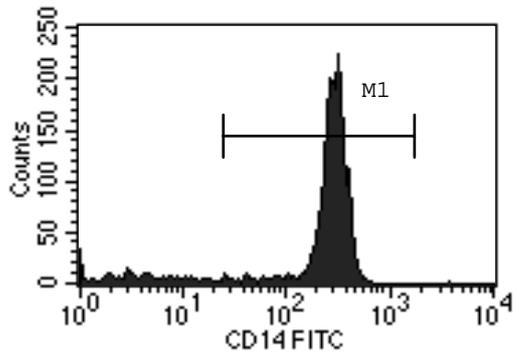
**Abbildung 4.7: Zeitliche Abfolge (24-Stunden-Kinetik)**

Dargestellt sind kinetische Verläufe von je drei Versuchen mit peripherem Erwachsenenblut bei vergleichbaren Ergebnissen im Nabelschnurblut. Die Färbungen erfolgten nach 24 Stunden Inkubation der Zellen ohne bzw. mit zVAD-FMK.

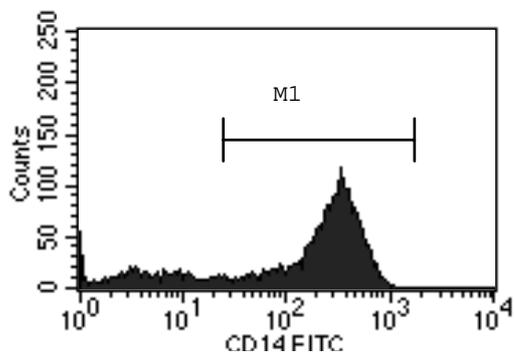
(a) Veränderung der Anteile an großen und kleinen Makrophagen: Die beiden Makrophagenfenster wurden in der FSC-SSC-Darstellung gesetzt (vergleiche Abb. 4.3) und ihr jeweiliger Anteil an den Gesamtmakrophagen bestimmt. Dazu wurde ein großes Gate um beide Makrophagenpopulationen als 100% definiert (siehe auch 3.5.3).

(b) Annexin V-positive Makrophagen und CD14-Expression: Färbung mit PE-konjugiertem Annexin V und FITC-konjugierten Antikörpern gegen CD14

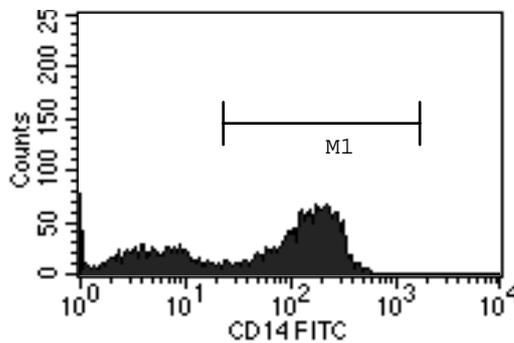
(c) Propidiumiodid-positive Makrophagen: Färbung mit Propidiumiodid



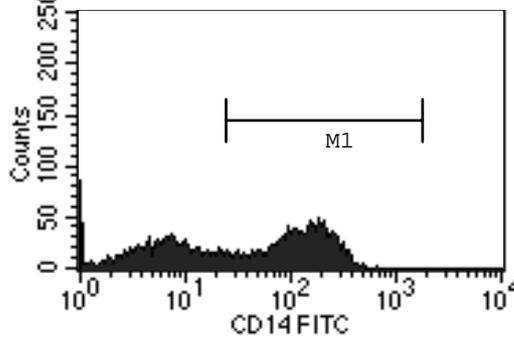
0h (Kontrolle), M1 = 75%



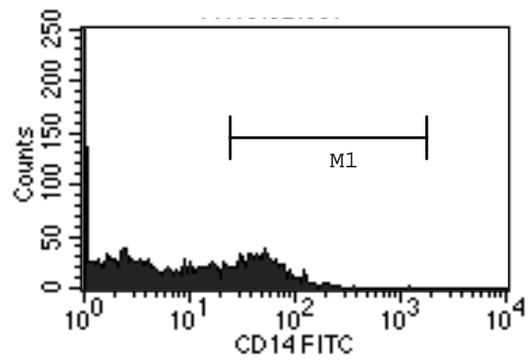
3h mit zVAD-FMK, M1 = 74%



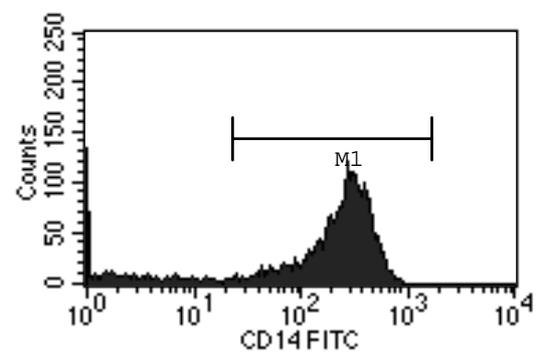
6h mit zVAD-FMK, M1 = 64%



12h mit zVAD-FMK; M1 = 54%



24h mit zVAD-FMK, M1 = 31%



24h Kontrolle, M1 = 85%

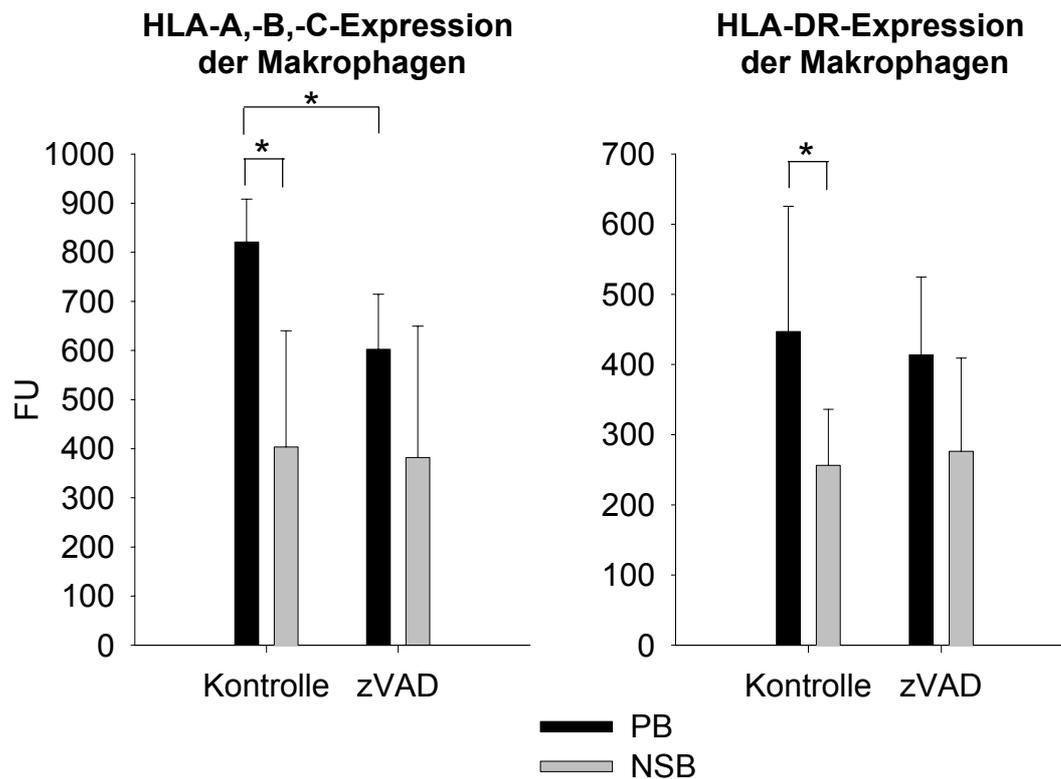
**Abbildung 4.8: CD14-positive Makrophagen bei 0, 3, 6, 12 und 24 Stunden**

Die Färbung wurde mit FITC-konjugierten Antikörpern gegen CD14 nach 24 Stunden Inkubation der Zellen ohne bzw. mit zVAD-FMK durchgeführt. Repräsentative Darstellung für insgesamt vierzehn Färbungen.

**4.6 Wirkung von zVAD-FMK auf andere Oberflächenmoleküle der Makrophagen****4.6.1 MHC Klasse I- (HLA-A,-B,-C) und MHC-Klasse II-Moleküle (HLA-DR)**

Bei den durchgeführten Versuchen exprimierte die Mehrheit der erwachsenen und kindlichen Makrophagen HLA-A,-B,-C (PB:  $98 \pm 1\%$ , NSB:  $94 \pm 3\%$ ). HLA-DR wurde auf  $96 \pm 2\%$  der Makrophagen im Erwachsenenblut und  $69 \pm 5\%$  der Makrophagen im Nabelschnurblut gefunden ( $p=0,00005$ ). zVAD-FMK veränderte weder den Anteil an HLA-A,-B,-C- noch an HLA-DR-positiven Makrophagen (Ergebnis von vier Versuchen. Daten nicht gezeigt.)

Die Dichte der exprimierten HLA-A,-B,-C- und HLA-DR-Moleküle war im Erwachsenenblut signifikant höher als im kindlichen (für die Kontrollen: je  $p=0,02$ ). Abbildung 4.9 zeigt, daß die HLA-A,-B,-C-Expression im peripheren Erwachsenenblut durch zVAD-FMK herabreguliert wurde ( $p=0,02$ ; Messung nach 24 Stunden), während die HLA-DR-Expression sich nicht veränderte. Im Nabelschnurblut wurden weder HLA-A,-B,-C-, noch HLA-DR-Expression durch zVAD-FMK beeinflusst.



**Abbildung 4.9:** HLA-A,-B,-C- und HLA-DR-Expression der Makrophagen

Die Färbung erfolgte mit FITC-konjugierten Antikörpern gegen HLA-A,-B,-C und HLA-DR nach 24 Stunden Inkubation der Zellen ohne bzw. mit zVAD-FMK. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung von vier (HLA-A,-B,-C-MFI) bzw. sieben (HLA-DR-MFI) Versuchen.

\*  $p < 0,05$

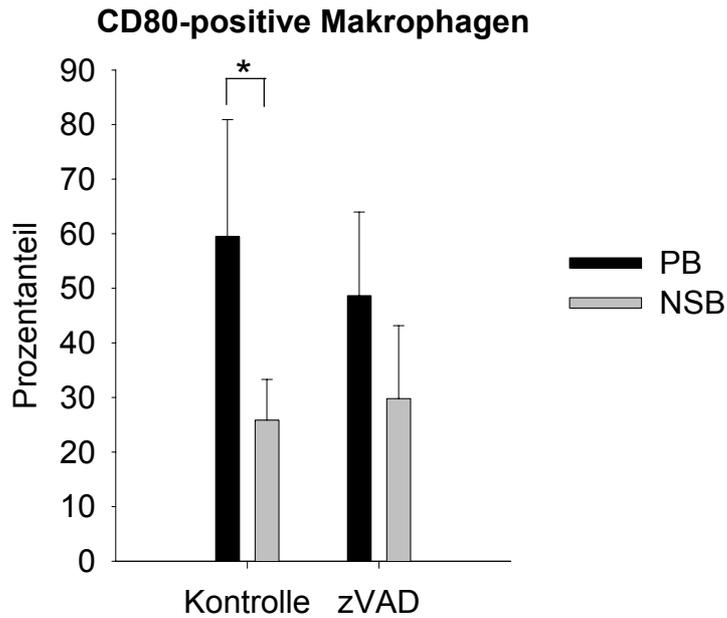
#### 4.6.2 Moleküle der B7-Familie (CD86, CD80)

Bei den Färbungen wurde CD86 von allen Makrophagen im Erwachsenen- und im Nabelschnurblut exprimiert. zVAD-FMK änderte daran nichts. (Werte von vier Versuchen. Daten nicht gezeigt.)

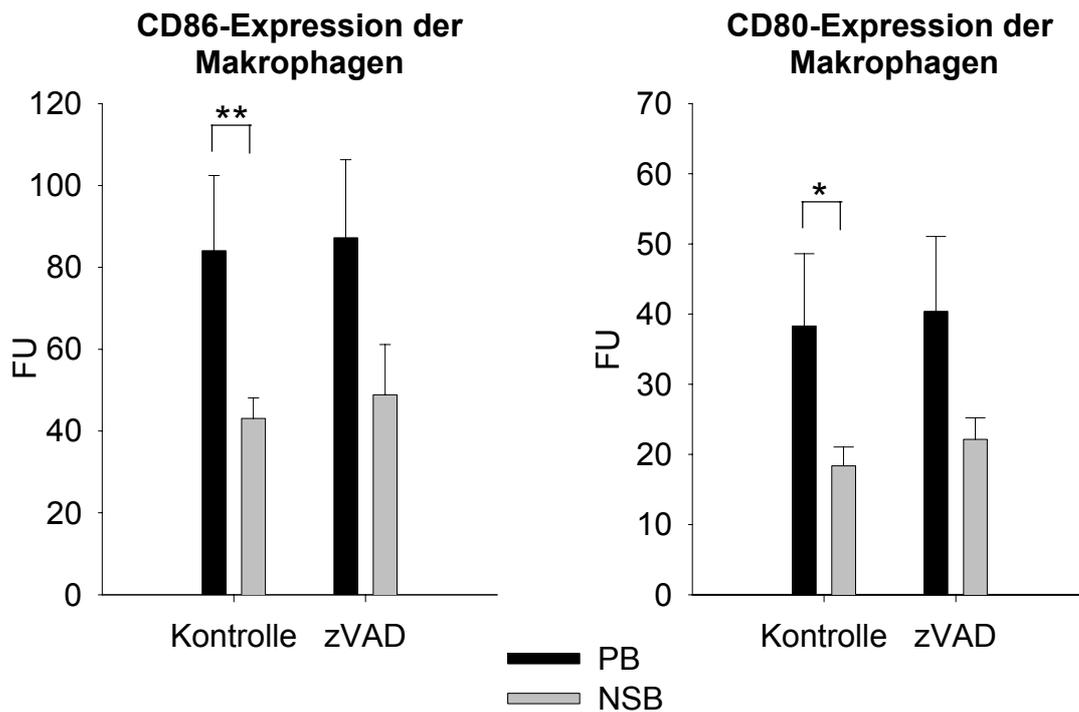
CD80 fand sich nach 24 Stunden Kultur (und Aktivierung der Makrophagen durch Plastikkontakt) auf 60% der adulten, aber nur auf 26% der neonatalen Makrophagen ( $p=0,03$ ). Durch zVAD-FMK nahm der Anteil an erwachsenen CD80-positiven Makrophagen um 10% ab (nicht signifikant,  $p=0,49$ ). Im Nabelschnurblut blieb er etwa gleich (siehe Abbildung 4.10 (a)).

Sowohl die CD86- als auch die CD80-Expression der Makrophagen waren im Erwachsenenblut signifikant höher als im Nabelschnurblut. (CD86:  $p=0,005$ , CD80:  $p=0,01$ ). Beide wurden durch zVAD-FMK nicht verändert (Abbildung 4.10 (b)).

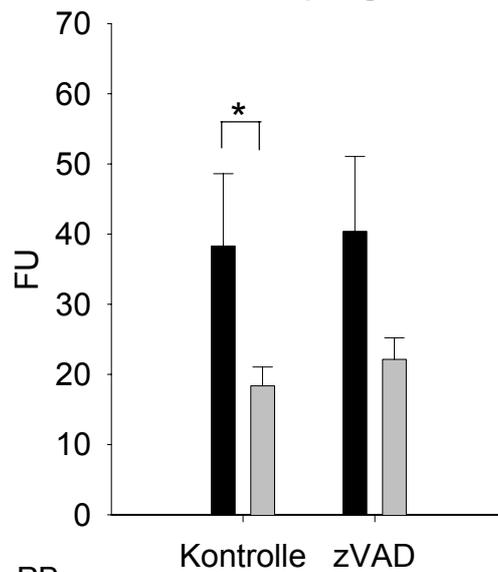
(a)



(b)



**CD80-Expression der Makrophagen**



**Abbildung 4.10: CD86- und CD80-Expression der Makrophagen**

Die Färbung wurde mit FITC-konjugierten Antikörpern gegen CD86 und PE-konjugierten Antikörpern gegen CD80 nach 24 Stunden Inkubation der Zellen ohne bzw. mit zVAD-FMK durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von jeweils vier Versuchen. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,005$

(a) Anteile an CD80-positiven Makrophagen

(b) Intensität der CD86- und CD80-Expression auf den Makrophagen

**4.6.3 Das CD16-Oberflächenmolekül (Fc $\gamma$ -Rezeptor-III)**

Im Nabelschnurblut waren signifikant mehr CD16-positive Makrophagen enthalten als im Erwachsenenblut ( $p=0,01$ ). Die kindlichen Makrophagen exprimierten CD16 jedoch in geringerer Dichte im Vergleich zu den erwachsenen Zellen ( $p=0,05$ ).

zVAD-FMK führte zu einer signifikanten Abnahme der CD16-positiven Makrophagen (PB:  $p=0,005$ , NSB:  $p=0,02$ ). Die Höhe der CD16-Expression auf den verbleibenden CD16-positiven Makrophagen wurde aber nicht beeinflusst (siehe Abbildung 4.11).

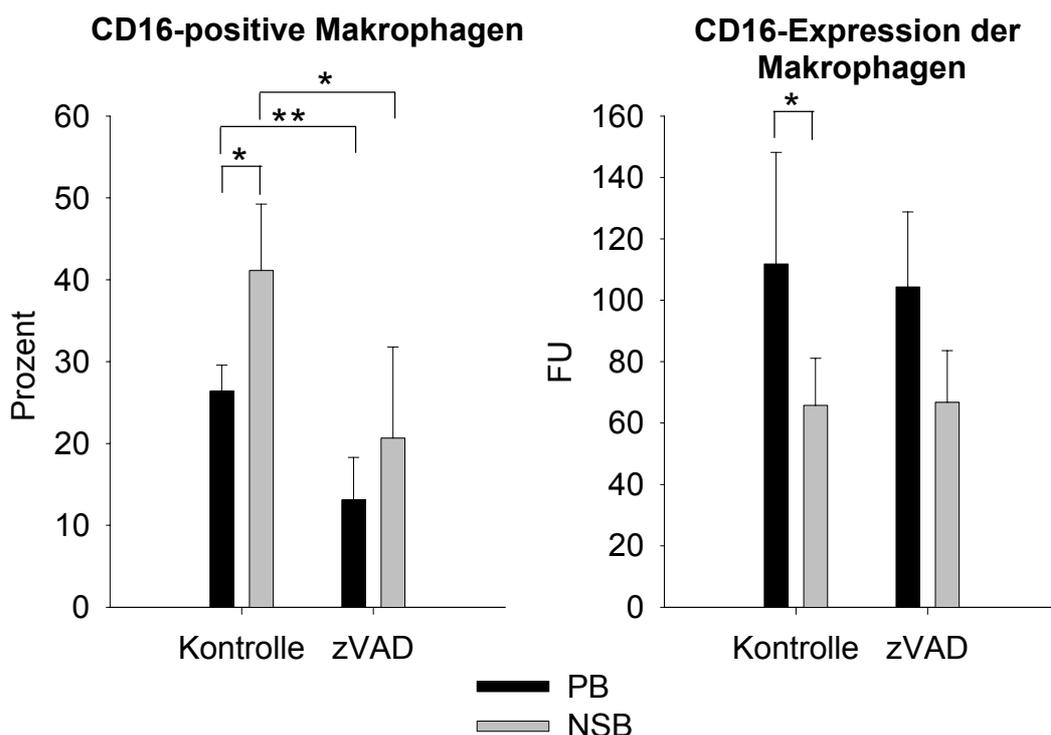


Abbildung 4.11: Anteil der CD16-positiven Makrophagen und deren CD16-Expression  
Die Zellen wurden mit PE-konjugierten Antikörpern gegen CD16 nach 24 Stunden Inkubation mit bzw. ohne zVAD-FMK gefärbt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von vier Versuchen.

\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,005$

#### 4.7 Wirkung von zVAD-FMK auf Lymphozyten

##### 4.7.1 Absolute Lymphozytenzahl und Prozentanteile einzelner Lymphozytensubpopulationen

zVAD-FMK schien die Lymphozyten nicht zu beeinträchtigen. Ihre absolute Zahl war mit dem Caspase-Inhibitor gleichbleibend bis leicht zunehmend (siehe Tabelle 4.2).

Durch Anfärbung der jeweils typischen Oberflächenmoleküle wurden die Prozentanteile der CD4 und CD8 T-Zellen, der B-Lymphozyten sowie der Natürlichen Killer-Zellen im Lymphozytenfenster bestimmt. (Für weitere Information zu den Oberflächenmolekülen siehe 1.1.3.) Alle untersuchten Anteile wurden durch zVAD-FMK in den ersten 24 Stunden nicht verändert (Tabelle 4.2).

	<u>PB-Kontrolle</u>	<u>PB – zVAD</u>	<u>NSB-Kontrolle</u>	<u>NSB - zVAD</u>
<u>Ly-zahl x 10<sup>4</sup></u>	19,7 $\pm$ 1,2	21,3 $\pm$ 0,8	17,3 $\pm$ 1,3	19,1 $\pm$ 1,1
<u>% CD4+</u>	46,1 $\pm$ 5,1	46,4 $\pm$ 6,6	51,2 $\pm$ 6,3	50,4 $\pm$ 5,5
<u>% CD8+</u>	22,5 $\pm$ 5,7	24,4 $\pm$ 6,6	8,3 $\pm$ 3,0 *	8,6 $\pm$ 2,9
<u>% CD19+</u>	6,0 $\pm$ 2,2	6,4 $\pm$ 3,2	2,9 $\pm$ 0,6 *	3,3 $\pm$ 1,5
<u>% HLA-DR+</u>	6,8 $\pm$ 3,0	6,6 $\pm$ 2,9	3,8 $\pm$ 1,6 *	4,4 $\pm$ 1,5
<u>% CD56+</u>	18,6 $\pm$ 6,2	18,7 $\pm$ 6,0	15,0 $\pm$ 7,0	16,2 $\pm$ 6,7
<u>% CD16+</u>	11,2 $\pm$ 2,8	10,2 $\pm$ 2,9	9,5 $\pm$ 6,3	9,3 $\pm$ 6,4

Tabelle 4.2: Lymphozytenzahl und Anteile einiger Lymphozytensubpopulationen

Der Lymphozytenanteil an den Gesamtzellen wurde bestimmt (siehe 3.5.3). Multiplikation des Prozentanteils mit der unter dem Mikroskop gezählten Gesamtzahl ergab die Absolutzahl an Lymphozyten. Die Zellen wurden mit FITC-konjugierten Antikörpern gegen CD4, CD56 und HLA-DR sowie PE-konjugierten Antikörpern gegen CD8, CD16 und CD19 nach 24 Stunden Inkubation mit bzw. ohne zVAD-FMK gefärbt. Die Prozentanteile der jeweils angefärbten Zellen im Lymphozytenfenster wurden bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei (%CD4+, %CD8+, %CD19+, %CD56+), vier (%CD16+) bzw. sieben (%HLA-DR+) Versuchen. Ly-zahl = absolute Lymphozytenzahl.

\*  $p < 0,05$  versus PB-Kontrolle

#### 4.7.2 Regulation des CD4-Moleküls

Im Gegensatz zu anderen Oberflächenmolekülen der Lymphozyten (siehe unter 4.7.3) wurde CD4 durch zVAD-FMK signifikant herabreguliert, im Erwachsenenblut stärker als im Nabelschnurblut (PB:  $p=0,002$ , NSB:  $p=0,04$ ) (Abbildung 4.12). Die CD4-Dichte auf kindlichen und erwachsenen Lymphozyten lagen bei den Kontrollen in vergleichbarer Höhe.

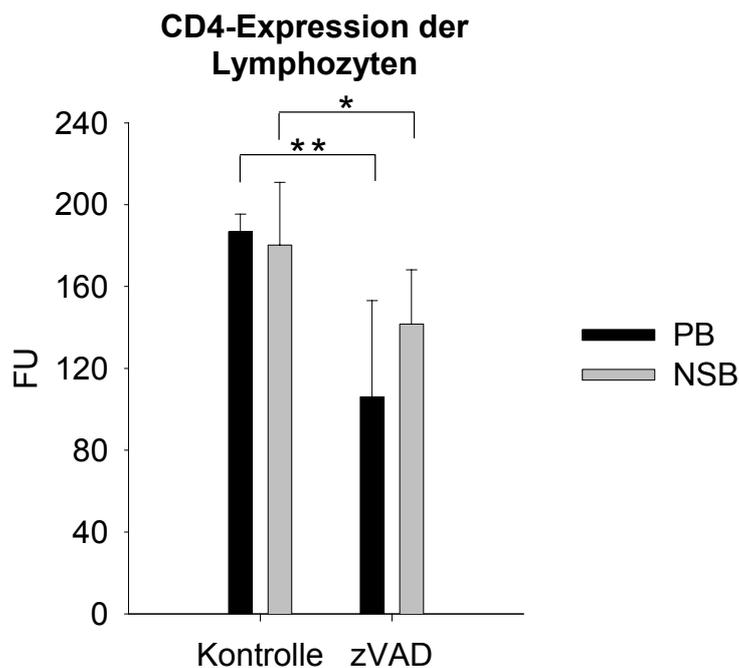


Abbildung 4.12: CD4-Expression der Lymphozyten: \* p<0,05, \*\* p<0,005

Die Zellen wurden mit FITC-konjugierten Antikörpern gegen CD4 nach 24 Stunden Inkubation mit bzw. ohne zVAD-FMK gefärbt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von sechs Versuchen.

#### 4.7.3 Expression von anderen lymphozytentypischen Oberflächenmolekülen

Mit Ausnahme des CD4-Moleküls (vergleiche 4.7.2) führte zVAD-FMK zu keiner signifikanten Veränderung in der Expression der untersuchten Lymphozytenrezeptoren. Analysiert wurden zum einem CD3 und CD28 der T-Zellen. Die Fluoreszenzintensitäten beider CD-Antigene wurden für CD4 und CD8 T-Zellen getrennt bestimmt. Zum anderen wurde die Expression der MHC-Moleküle HLA-A,-B,-C und HLA-DR sowie die Expression von CD8 untersucht (siehe Tabelle 4.3).

Fluoreszenzintensität	<u>PB-Kontrolle</u>	<u>PB – zVAD</u>	<u>NSB-Kontrolle</u>	<u>NSB - zVAD</u>
<u>CD3-MFI CD4+</u>	627 $\pm$ 121	598 $\pm$ 80	634 $\pm$ 154	605 $\pm$ 144
<u>CD3-MFI CD8+</u>	436 $\pm$ 35	360 $\pm$ 86	384 $\pm$ 47	365 $\pm$ 108
<u>CD28-MFI CD4+</u>	190 $\pm$ 42	190 $\pm$ 41	169 $\pm$ 39	156 $\pm$ 28
<u>CD28-MFI CD8+</u>	115 $\pm$ 14	106 $\pm$ 19	80 $\pm$ 22 *	77 $\pm$ 13
<u>HLA-A,-B,-C-MFI</u>	363 $\pm$ 59	304 $\pm$ 86	315 $\pm$ 165	332 $\pm$ 177
<u>HLA-DR-MFI</u>	320 $\pm$ 97	318 $\pm$ 90	375 $\pm$ 110	331 $\pm$ 143
<u>CD8-MFI</u>	2516 $\pm$ 891	2572 $\pm$ 830	1882 $\pm$ 583	1600 $\pm$ 395

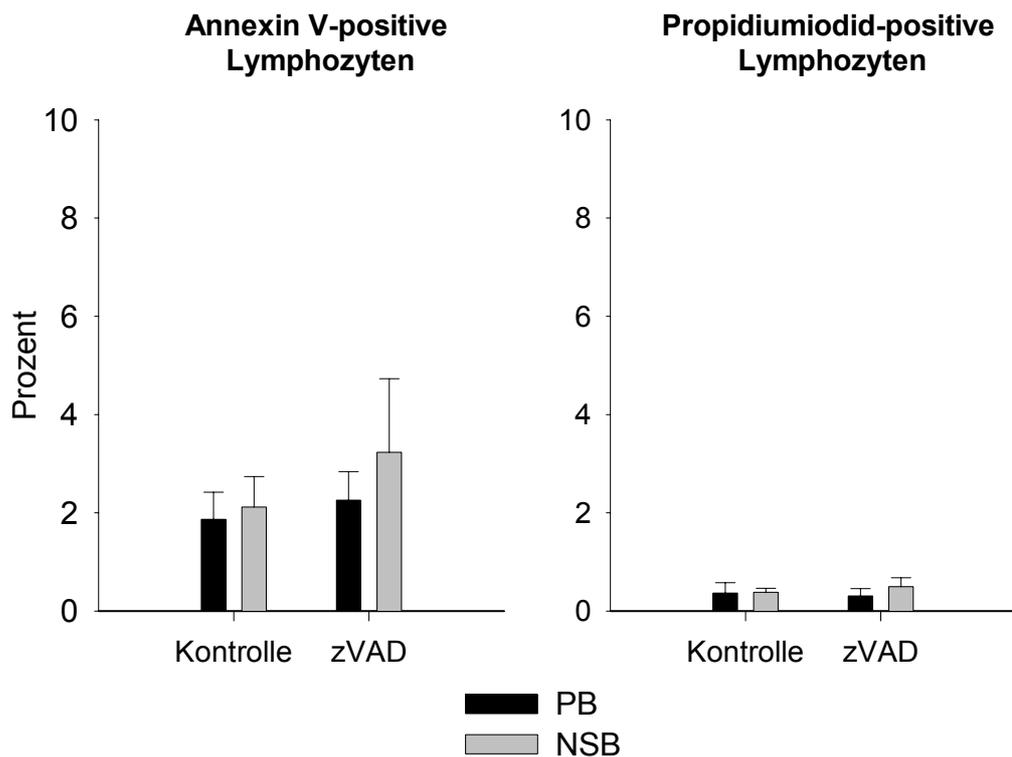
Tabelle 4.3: Expression der Lymphozytenoberflächenmoleküle

Die Färbung wurde mit FITC-konjugierten Antikörpern gegen HLA-DR und HLA-A,-B,-C sowie PE-konjugierten Antikörpern gegen CD3, CD28 und CD8 nach 24 Stunden Inkubation der Zellen mit bzw. ohne zVAD-FMK durchgeführt. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei (CD3-MFI CD8+), vier (HLA-A,-B,-C-MFI), sechs (CD8-MFI, CD28-MFI CD8+), sieben (HLA-DR-MFI), acht (CD3-MFI CD4+) bzw. neun (CD28-MFI CD4+) Versuchen. MFI = mittlere Fluoreszenzintensität, \* p<0,05 versus PB-Kontrolle

#### 4.7.4 Färbung der Lymphozyten mit Annexin V und Propidiumiodid

Der Anteil an Annexin V-positiven Lymphozyten lag in den beobachteten 24 Stunden sowohl ohne als auch mit zVAD-FMK unter 4% im peripheren Erwachsenenblut und unter 5% im Nabelschnurblut. Der Anteil an Propidiumiodid-positiven Lymphozyten war bei beiden kleiner als 1,5% (Abbildung 4.13). Die leichte Zunahme der Annexin V-positiven Lymphozyten im Nabelschnurblut durch zVAD-FMK war nicht signifikant ( $p=0,10$ ).

Während der Kinetik über 24 Stunden blieb der Anteil an Annexin V-positiven Lymphozyten unter 5%, der an Propidiumiodid-positiven unter 1%. (Werte von drei Versuchen. Daten nicht gezeigt.)



**Abbildung 4.13: Annexin V- und Propidiumiodid-positiv Lymphozyten**

Die Färbung wurde mit PE-konjugiertem Annexin V und mit Propidiumiodid nach 24 Stunden Inkubation der Zellen mit bzw. ohne zVAD-FMK durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von sieben Versuchen.

#### 4.8 Untersuchung der CD95- und CD95Ligand-Expression

CD95 war sowohl in der Kontrolle als auch mit zVAD-FMK auf  $98\% \pm 1\%$  der Makrophagen zu finden (PB und NSB). Die Intensität der CD95-Expression veränderte sich durch Inkubation mit zVAD-FMK nicht signifikant. Tendenziell nahm sie in den ersten 24 Stunden leicht ab (siehe Tabelle 4.4).

Der CD95-Ligand wurde von ca. 4% der Makrophagen im Erwachsenenblut und ca. 2,5% im Nabelschnurblut exprimiert (Tabelle 4.4). zVAD-FMK beeinflusste diesen Anteil nicht ( $p > 0,3$ ).

Bei den Lymphozyten wurde CD95 auf 45% im peripheren Erwachsenenblut und auf 3% im Nabelschnurblut beobachtet. Den CD95-Liganden exprimierten nur ca. 1% der Lymphozyten (sowohl PB als auch NSB). zVAD-FMK hatte weder auf die CD95- noch auf die CD95L-Expression der Lymphozyten einen Einfluss (vergleiche Tabelle 4.4).

	PB-Kontrolle	PB - zVAD	NSB-Kontrolle	NSB - zVAD
<u>Makrophagen</u>				
CD95-MFI	66,5 ± 10,8	52,6 ± 7,2	60,3 ± 19,3	53,8 ± 18,3
%CD95L-pos.	3,7 ± 1,1	4,1 ± 0,9	2,0 ± 0,4	2,7 ± 1,1
<u>Lymphozyten</u>				
%CD95-pos.	45,9 ± 17,7	41,5 ± 16,5	3,22 ± 0,6 *	3,01 ± 0,5
%CD95L-pos.	0,95 ± 0,3	0,91 ± 0,3	1,09 ± 0,5	1,20 ± 0,5

Tabelle 4.4: CD95-Expression und CD95Ligand-positive Zellen

Die Färbung wurde mit PE-konjugierten Antikörpern gegen CD95 und CD95L nach 24 Stunden Inkubation mit bzw. ohne zVAD-FMK durchgeführt. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung von vier Versuchen. PB = peripheres Erwachsenenblut, NSB = Nabelschnurblut, MFI = mittlere Fluoreszenzintensität, \*  $p < 0,05$  versus PB-Kontrolle

#### 4.9 Einfluss von Lipopolysaccharid auf die Makrophagenapoptose durch zVAD-FMK

Die Makrophagen wurden mit LPS in den Konzentrationen 0,1µg/ml und 1,0µg/ml aktiviert und mit zVAD-FMK inkubiert (vergleiche auch 3.4). Der Anteil an normalgroßen Makrophagen nahm durch zVAD-FMK trotz der gleichzeitigen Stimulation mit LPS und unabhängig von dessen Konzentration innerhalb von 24 Stunden um ca. 60% (PB) bzw. 50% (NSB) signifikant ab ( $p < 0,05$ , siehe Tabelle 4.5).

Vorinkubation mit Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) für eine Stunde (vergleiche 3.4) erbrachte dasselbe Ergebnis: Das Absterben der Makrophagen konnte nicht verhindert werden. Die Abnahme der Makrophagenzahl wurde im Erwachsenenblut tendenziell eher noch verstärkt (Tabelle 4.5).

Die LPS-Stimulation selbst (ohne zVAD-FMK) führte zu einer Zunahme der Makrophagen im Erwachsenenblut und gleichbleibender Makrophagenfraktion im Nabelschnurblut (Tabelle 4.5).

Parallel zur sinkenden Makrophagenzahl durch zVAD-FMK nahm der Anteil an Propidiumiodid-positiven Makrophagen (trotz LPS-Stimulation) signifikant zu ( $p < 0,05$ , PB und NSB; Tabelle 4.5). (Äquivalent zu 4.3 wurden bei der Auswertung der Propidiumiodid- und der Annexin V-Färbung (siehe unten) nur die großen Makrophagen berücksichtigt.)

Die Annexin V-Färbung bei LPS-Stimulation wurde ohne Färbepuffer durchgeführt. Die Ergebnisse sind deshalb weder im absoluten Wert noch in der relativen Veränderung mit den bisher dargestellten Ergebnissen (siehe bei 4.3) vergleichbar. Die Zunahme der Annexin V-positiven Makrophagen durch zVAD-FMK war aber auch ohne Färbepuffer zu beobachten (Tabellen 4.5).

Wie in früheren Studien gezeigt, wird die Expression des CD14-Moleküls auf den Makrophagen durch LPS in den ersten Stunden herab-, später dann aufreguliert und erreicht nach 24 Stunden in etwa wieder den Ausgangswert (siehe 3.7.1). Bei dieser Arbeit entsprach der Wert der mittleren CD14-

Fluoreszenzintensität mit LPS 0,1µg/ml nach 24 Stunden (wieder) dem Wert der Kontrolle. Stimulation mit LPS 1,0µg/ml zeigte das CD14-Oberflächenmolekül (noch) signifikant herabreguliert (PB: p=0,03, NSB: p=0,001).

Unabhängig von der LPS-Konzentration führte gleichzeitige Inkubation mit zVAD-FMK jedoch zu einer hochsignifikanten Abnahme der CD14-Moleküle – vergleichbar den unter 4.4 dargestellten Ergebnissen.

IFN $\gamma$  reguliert CD14 stark und schnell herab, wie in der Literatur mehrfach beschrieben wurde (siehe 3.7.1). Entsprechend führte das 'Priming' mit IFN $\gamma$  auch hier zu einer hochsignifikanten Abnahme der CD14-Expression (PB: p=0,000002, NSB: p=0,0000006). Die durch IFN $\gamma$  bereits herabregulierte Expressionsdichte sank durch zusätzliche Gabe von zVAD-FMK weiter ab.

Tabelle 4.5: Makrophagenanteil sowie Ergebnisse der Propidiumiodid-, Annexin V- und CD14-Färbung bei LPS-Stimulation

Die Färbungen wurden mit Propidiumiodid, PE-konjugiertem Annexin V und PE-konjugierten Antikörpern gegen CD14 nach 24 Stunden Inkubation mit bzw. ohne zVAD-FMK durchgeführt. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei (Annexin V-Färbung), vier (Anteil an großen Makrophagen) bzw. fünf (Propidiumiodid- und CD14-Färbung) Versuchen. M $\phi$  = Makrophagen, PB = peripheres Erwachsenenblut, NSB = Nabelschnurblut, MFI = mittlere Fluoreszenzintensität, \* p<0,05 versus Stimulation ohne zVAD, \*\* p<0,05 versus Kontrolle

<b><u>PB</u></b>	Anteil großer Mφ (%)	davon: <u>Propidiumiodid-</u> <u>pos.</u> Mφ (%)	(davon: <u>Annexin V-pos.</u> Mφ) (%)	<u>CD14-MFI</u> (alle Mφ) (FU)
Kontrolle	17 ± 3	2,0 ± 0,4	(1,9 ± 1,1)	361 ± 47
LPS 0,1µg/ml	21 ± 7	2,7 ± 0,8	(1,8 ± 1,2)	319 ± 79
LPS 1,0µg/ml	19 ± 5	2,9 ± 0,9	(2,1 ± 1,3)	244 ± 91 **
IFNγ+LPS 0,1µg/ml	20 ± 5	3,1 ± 1,8	(1,7 ± 1,0)	75 ± 24 **
zVAD	8 ± 1 *	5,6 ± 1,6 *	(3,6 ± 1,0)	73 ± 41 *
zVAD+LPS 0,1µg/ml	7 ± 4 *	6,5 ± 1,9 *	(4,0 ± 1,4)	65 ± 31 *
zVAD+LPS 1,0µg/ml	7 ± 4 *	8,9 ± 1,8 *	(3,7 ± 1,5)	45 ± 10 *
zVAD+IFNγ+ LPS 0,1µg/ml	4 ± 2 *	9,7 ± 1,8 *	(2,5 ± 1,2)	48 ± 22

<b><u>NSB</u></b>	Anteil großer Mφ (%)	davon: <u>Propidiumiodid-</u> <u>pos.</u> Mφ (%)	(davon: <u>Annexin V-pos.</u> Mφ) (%)	<u>CD14-MFI</u> (alle Mφ) (FU)
Kontrolle	22 ± 2	1,9 ± 0,3	(1,4 ± 0,2)	383 ± 47
LPS 0,1µg/ml	23 ± 1	2,4 ± 0,9	(1,8 ± 0,6)	349 ± 54
LPS 1,0µg/ml	22 ± 4	2,7 ± 0,4	(1,9 ± 0,9)	194 ± 72 **
IFNγ+LPS 0,1µg/ml	22 ± 4	2,6 ± 0,3	(1,9 ± 0,4)	54 ± 20 **
zVAD	11 ± 3 *	4,9 ± 0,9 *	(3,6 ± 1,6)	80 ± 43 *
zVAD+LPS 0,1µg/ml	13 ± 3 *	6,2 ± 1,9 *	(3,6 ± 1,8)	72 ± 30 *
zVAD+LPS 1,0µg/ml	9 ± 6 *	6,7 ± 1,7 *	(3,6 ± 1,9)	43 ± 11 *
zVAD+IFNγ+ LPS 0,1µg/ml	10 ± 7 *	6,3 ± 2,0 *	(3,9 ± 1,9)	43 ± 6 *

Untersuchung der Lymphozyten bei LPS-Stimulation:

Die Prozentanteile der CD4 und CD8 T-Zellen wurden durch LPS weder mit noch ohne zVAD-FMK verändert (siehe Tabelle 4.6).

Genauso blieben die Anteile an Annexin- und Propidiumiodid-positiven Lymphozyten sowohl bei Stimulation mit beiden LPS-Konzentrationen (0,1µg/ml und 1,0µg/ml), nach 'Priming' mit IFN $\gamma$  als auch bei zusätzlicher Zugabe von zVAD-FMK unter 1% bzw. 1,5% (n=3; Daten nicht gezeigt.).

	<b>PB:</b> CD4 T-Zellen (in %)	CD8 T-Zellen (in %)	<b>NSB:</b> CD4 T-Zellen (in %)	CD8 T-Zellen (in %)
Kontrolle	49 $\pm$ 5	22 $\pm$ 3	44 $\pm$ 5	10 $\pm$ 3
LPS 0,1µg/ml	50 $\pm$ 5	23 $\pm$ 3	49 $\pm$ 11	11 $\pm$ 4
LPS 1,0µg/ml	49 $\pm$ 4	22 $\pm$ 4	45 $\pm$ 12	12 $\pm$ 4
IFN $\gamma$ +LPS 0,1µg/ml	52 $\pm$ 6	22 $\pm$ 3	41 $\pm$ 8	11 $\pm$ 4
zVAD	50 $\pm$ 5	21 $\pm$ 4	45 $\pm$ 11	11 $\pm$ 4
zVAD+LPS 0,1µg/ml	50 $\pm$ 6	22 $\pm$ 3	45 $\pm$ 10	11 $\pm$ 4
zVAD+LPS 1,0µg/ml	51 $\pm$ 5	22 $\pm$ 3	45 $\pm$ 10	11 $\pm$ 3
zVAD+IFN $\gamma$ + LPS 0,1µg/ml	50 $\pm$ 5	22 $\pm$ 3	42 $\pm$ 7	11 $\pm$ 4

Tabelle 4.6: Anteile an CD4 und CD8 T-Zellen bei LPS-Stimulation

Die Färbung wurde mit FITC-konjugierten Antikörpern gegen CD4 und PE-konjugierten Antikörpern gegen CD8 nach 24 Stunden Inkubation mit bzw. ohne zVAD-FMK durchgeführt. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von fünf Versuchen.

#### **4.10 Keine verstärkte Interferon- $\gamma$ -Produktion durch zVAD-FMK**

Wie unter 3.7.1 beschrieben führt Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) zu einer starken und schnellen Herabregulation der CD14-Expression. Es stellte sich die Frage, ob zVAD-FMK möglicherweise eine erhöhte IFN $\gamma$ -Produktion bzw. -Sekretion in den Lymphozyten induziert hatte und die dargestellte CD14-Herabregulation durch zVAD-FMK (siehe unter 4.4) durch induziertes IFN $\gamma$  verursacht worden war. Um der Frage nachzugehen, wurde der Kulturüberstand nach 24 Stunden abpipettiert und die IFN $\gamma$ -Konzentration darin per ELISA bestimmt. Weder bei der Kontrolle noch nach Inkubation mit zVAD-FMK war IFN $\gamma$  im Überstand nachweisbar. Die CD14-Herabregulation durch zVAD-FMK ist demnach nicht durch eine vermehrte IFN $\gamma$ -Produktion erklärbar. (Werte von zwei Versuchen. Daten nicht gezeigt.)

#### 4.11 zVAD-FMK und das T-Zellmitogen OKT3 (antiCD3-Antikörper)

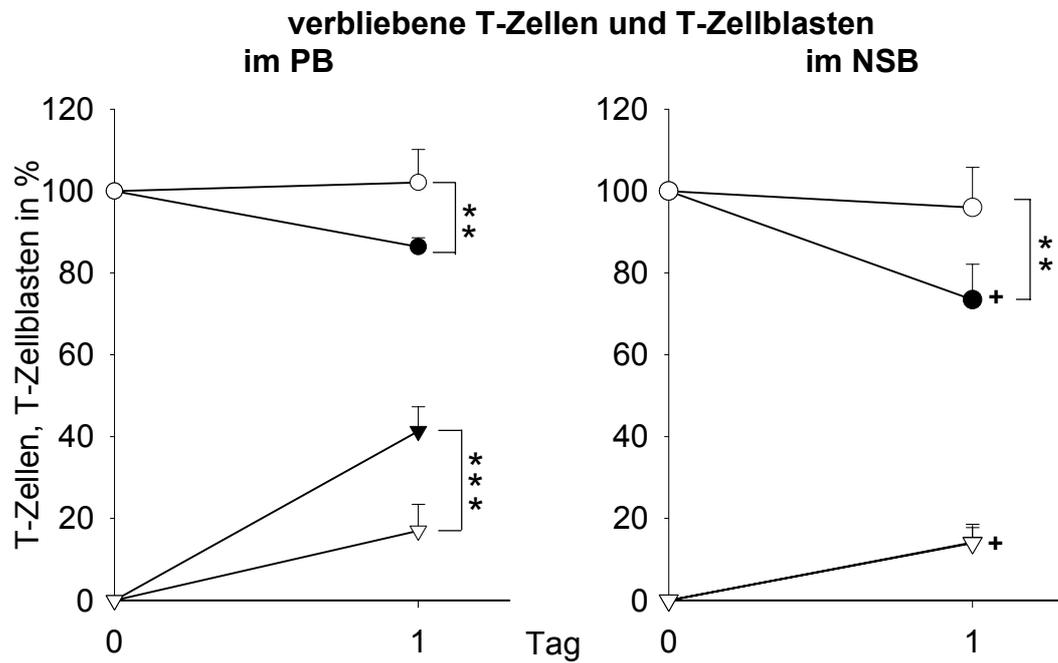
##### 4.11.1 Einfluss von zVAD-FMK auf T-Zelldeletion und -proliferation durch OKT3

Durch Inkubation der mononukleären Zellen mit OKT3 (5µg/ml) über 24 Stunden nahm die T-Zellzahl auf 86% des Ausgangswerts im Erwachsenenblut und auf 73% im Nabelschnurblut ab (Abbildung 4.14 (a)). Gleichzeitig wurde ein Teil der T-Zellen zur Proliferation aktiviert: Der Blastenanteil stieg im PB auf 41%, im NSB auf nur 14% (Abbildung 4.14 (a)). Damit reagierte das Nabelschnurblut auf OKT3 mit einer im Vergleich zum Erwachsenenblut signifikant stärkeren T-Zellelimination ( $p=0,006$ ) und verminderten Blastenbildung ( $p=0,002$ ).

Die T-Zelldeletion durch OKT3 wurde mit zVAD-FMK vollständig aufgehoben ( $p<0,005$ , Abbildung 4.14 (a)). Sowohl im Erwachsenenblut als auch im Nabelschnurblut waren nach 24 Stunden weiterhin ca. 100% der Ausgangs-T-Zellzahl vorhanden. zVAD-FMK hemmte aber nicht nur die Deletion, sondern auch die Proliferation der erwachsenen T-Zellen. Es fanden sich nur 17% Blasten im Vergleich zu 41% bei Stimulation mit OKT3 ohne zVAD-FMK ( $p=0,0005$ ). Im Nabelschnurblut blieb die Blastenbildung unverändert auf niedrigem Niveau von 14% bzw. 13% (vergleiche Abbildung 4.14 (a)).

Die in Gegenwart von zVAD-FMK gehemmte T-Zelldeletion wurde durch Färbungen mit Annexin V und Propidiumiodid bestätigt: Durch Inkubation mit OKT3 nahmen die Annexin V- und Propidiumiodid-positiven Lymphozyten signifikant von 2% auf ca. 5% (Annexin V) bzw. von 0,5% auf ca. 3% (Propidiumiodid) zu ( $p$  je  $<0,0005$ ). Caspase-Inhibition mit zVAD-FMK verhinderte diesen Anstieg sowohl an Annexin V- als auch an Propidiumiodid-positiven Lymphozyten ( $p<0,05$ ) (siehe Abbildung 4.14 (b)).

(a)



(b)

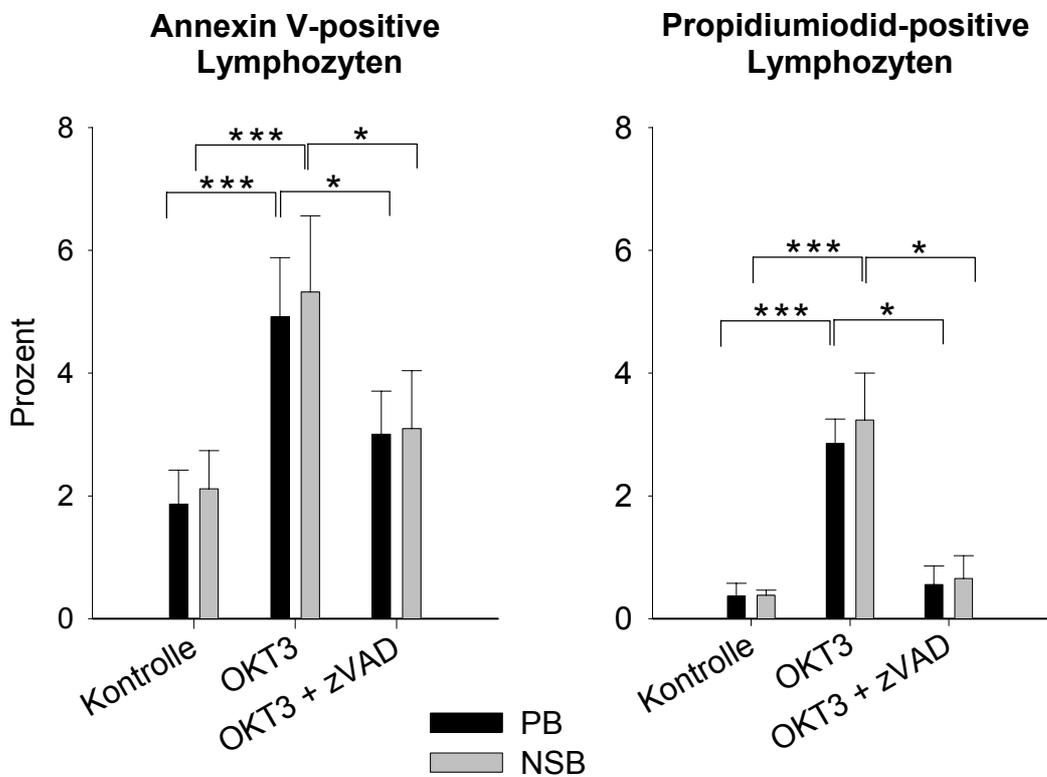


Abbildung 4.14: Hemmung von T-Zelldeletion und –proliferation durch zVAD-FMK

- T-Zellen: OKT3, ○ T-Zellen: OKT3+zVAD-FMK,
  - ▲ T-Zellblasten: OKT3, △ T-Zellblasten: OKT3+zVAD-FMK
- Die Zellen wurden über 24 Stunden mit OKT3 bzw. OKT3 plus zVAD-FMK inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von jeweils sechs Versuchen. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p \leq 0,0005$ , +  $p < 0,01$  für NSB-OKT3 versus PB-OKT3
- (a) T-Zellzahl und T-Zellblasten: Der Anteil der Lymphozyten an den Gesamtzellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt (vergleiche 3.5.3) und mit der unter dem Mikroskop gezählten Gesamtzellzahl multipliziert. Aus der errechneten absoluten Lymphozytenzahl und dem durch CD4- und CD8-Färbung bestimmten T-Zellanteil konnte die Absolutzahl der T-Zellen berechnet werden. Die T-Zellzahl am Tag 0, d.h. zu Beginn der Kulturzeit, wurde als 100% definiert und die T-Zellzahlen (Kreise) am Tag 1 zu ihr in Bezug gesetzt. Die T-Zellblasten (Dreiecke) wurden von den ruhenden T-Zellen (Kontrolle) abgegrenzt (siehe 3.7.2) und ihr Anteil an den Gesamt-T-Zellen bestimmt.
- (b) Annexin V- und Propidiumiodid-positive Lymphozyten: Färbung mit PE-konjugiertem Annexin V bzw. Propidiumiodid

#### 4.11.2 Regulation von CD28

Ohne zusätzliche Stimulation verursachte zVAD-FMK keine Veränderung der CD28-Expression (vergleiche 4.7.2). Stimulation mit OKT3 führte zu einer signifikanten Aufregulation des an der Kostimulation beteiligten CD28 auf CD4 und CD8 T-Zellen (beide  $p < 0,05$ ). zVAD-FMK verhinderte die CD28-Heraufregulation durch OKT3 ( $p < 0,05$ ). Die Dichte der exprimierten CD28-Moleküle mit OKT3 plus zVAD-FMK entsprach der Expressionsdichte in der Kontrolle, d.h. ohne OKT3-Stimulation (siehe Tabelle 4.7).

	PB		NSB	
	<u>CD28-MFI</u> auf CD4 T-Zellen	<u>CD28-MFI</u> auf CD8 T-Zellen	<u>CD28-MFI</u> auf CD4 T-Zellen	<u>CD28-MFI</u> auf CD8 T-Zellen
Kontrolle (FU)	190 $\pm$ 42	115 $\pm$ 14	169 $\pm$ 39	80 $\pm$ 22
OKT3 (FU)	290 $\pm$ 69 *	194 $\pm$ 8 *	252 $\pm$ 40 *	130 $\pm$ 10 *
OKT3+zVAD (FU)	173 $\pm$ 37 **	117 $\pm$ 5 **	179 $\pm$ 27 **	95 $\pm$ 7 **

Tabelle 4.7: CD28-Expression der T-Zellen nach OKT3-Stimulation

Die Färbung wurde mit FITC-konjugierten Antikörpern gegen CD4 und PE-konjugierten Antikörpern gegen CD28 und CD8 nach 24 Stunden Inkubation mit OKT3 bzw. OKT3 plus zVAD-FMK durchgeführt. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei (CD28 auf CD8 T-Zellen) bzw. sechs (CD28 auf CD4 T-Zellen) Versuchen. MFI = mittlere Fluoreszenzintensität, \*  $p < 0,05$  versus Kontrolle, \*\*  $p < 0,05$  versus OKT3

#### 4.11.3 Wirkung von OKT3 und zVAD-FMK auf die Makrophagen

Wie unter 3.7.2 beschrieben, begehen die Makrophagen nach Vermittlung der OKT3-Wirkung auf die T-Zellen AICD. Folglich nahmen die normalgroßen Makrophagen bei Inkubation mit OKT3 signifikant auf 82% des Ausgangswerts im Erwachsenenblut und auf 90% im Nabelschnurblut ab ( $p$  je  $< 0,005$ ). Wurde zusätzlich zVAD-FMK zugegeben, halbierte sich die Makrophagenzahl im Erwachsenenblut im Vergleich zur Kontrolle auf 43% und sank im Nabelschnurblut um weitere 20% auf 69% ( $p$  je  $< 0,005$ ).

Passend zu diesen Ergebnissen verdreifachte OKT3 (allein) die Anteile an Annexin V- und Propidiumiodid-positiven Makrophagen ( $p < 0,005$ , siehe Tabelle 4.8). Zusätzliche Gabe von zVAD-FMK ließ die Werte weiter steigen: Die Propidiumiodid-positiven Makrophagen verdoppelten sich knapp im Vergleich zur OKT3-Stimulation allein ( $p < 0,05$ ). Der Anteil an Annexin V-positiven Makrophagen stieg um weitere 10% (PB) bzw. 6% (NSB) (nicht signifikant; Tabelle 4.8). (Äquivalent zu 4.3 wurden bei der Auswertung der Propidiumiodid- und der Annexin V-Färbung nur die großen Makrophagen berücksichtigt.)

Die Expression von CD14 auf Makrophagen wurde bereits durch OKT3 stark herabreguliert auf 21% (PB) bzw. 49% (NSB) des Kontrollwertes ( $p < 0,005$ ). Bei Inkubation mit OKT3 plus zVAD-FMK fiel diese Herabregulation noch stärker aus: Abnahme auf 9% der Kontrolle im Erwachsenenblut und auf 12% der Kontrolle im Nabelschnurblut ( $p$  je  $< 0,005$ , siehe Tabelle 4.8).

<b><u>PB</u></b>	Verbliebene (große) Mφ (%)	davon: <u>Propidiumiodid-</u> <u>pos. Mφ (%)</u>	davon: <u>Annexin V-pos.</u> Mφ (%)	<u>CD14-MFI</u> (alle Mφ) (FU)
Kontrolle (Tag 0)	100 ± 0			
Kontrolle (Tag 1)	96,3 ± 1,4	2,0 ± 0,8	8,3 ± 2,7	343 ± 87
OKT3	82,5 ± 8,6 *	7,8 ± 2,4 *	25,6 ± 6,5 *	71 ± 33 *
OKT3 + zVAD	42,9 ± 10,1**	12,2 ± 3,1 **	35,1 ± 5,2 *	31 ± 16 **

<b><u>NSB</u></b>	Verbliebene (große) Mφ (%)	davon: <u>Propidiumiodid-</u> <u>pos. Mφ (%)</u>	davon: <u>Annexin V-pos.</u> Mφ (%)	<u>CD14-MFI</u> (alle Mφ) (FU)
Kontrolle (Tag 0)	100 ± 0			
Kontrolle (Tag 1)	97,5 ± 1,6	1,5 ± 0,4	8,0 ± 2,3	372 ± 137
OKT3	90,8 ± 4,8 *	3,9 ± 1,0 *	22,7 ± 10,3 *	184 ± 82 *
OKT3 + zVAD	69,5 ± 10,0**	7,3 ± 3,4 **	28,7 ± 11,6 *	45 ± 22 **

**Tabelle 4.8: Makrophagenanteil und Ergebnisse der Propidiumiodid-, Annexin V- und CD14-Färbung nach OKT3-Stimulation**

Die Zellen wurden über 24 Stunden mit OKT3 bzw. OKT3 plus zVAD-FMK inkubiert, von der Kulturplatte abgenommen und gezählt. Der Anteil der Makrophagen an den Gesamtzellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt (siehe unter 3.5.3) und mit der unter dem Mikroskop gezählten Gesamtzellzahl multipliziert. Die Makrophagenzahl am Tag 0, d.h. zu Beginn der Kulturzeit, wurde als 100% definiert und die Makrophagenzahlen am Tag 1 zu ihr in Bezug gesetzt.

Färbungen wurden mit Propidiumiodid, PE-konjugiertem Annexin V und FITC-konjugierten Antikörpern gegen CD14 durchgeführt. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung von fünf (Annexin V-Färbung), sechs (Anteil an großen Makrophagen), sieben (Propidiumiodid-Färbung) bzw. neun (CD14-Färbung) Versuchen. Mφ = Makrophagen, MFI = mittlere Fluoreszenz-intensität, \* p<0,005 versus Kontrolle, \*\* p<0,05 versus OKT3

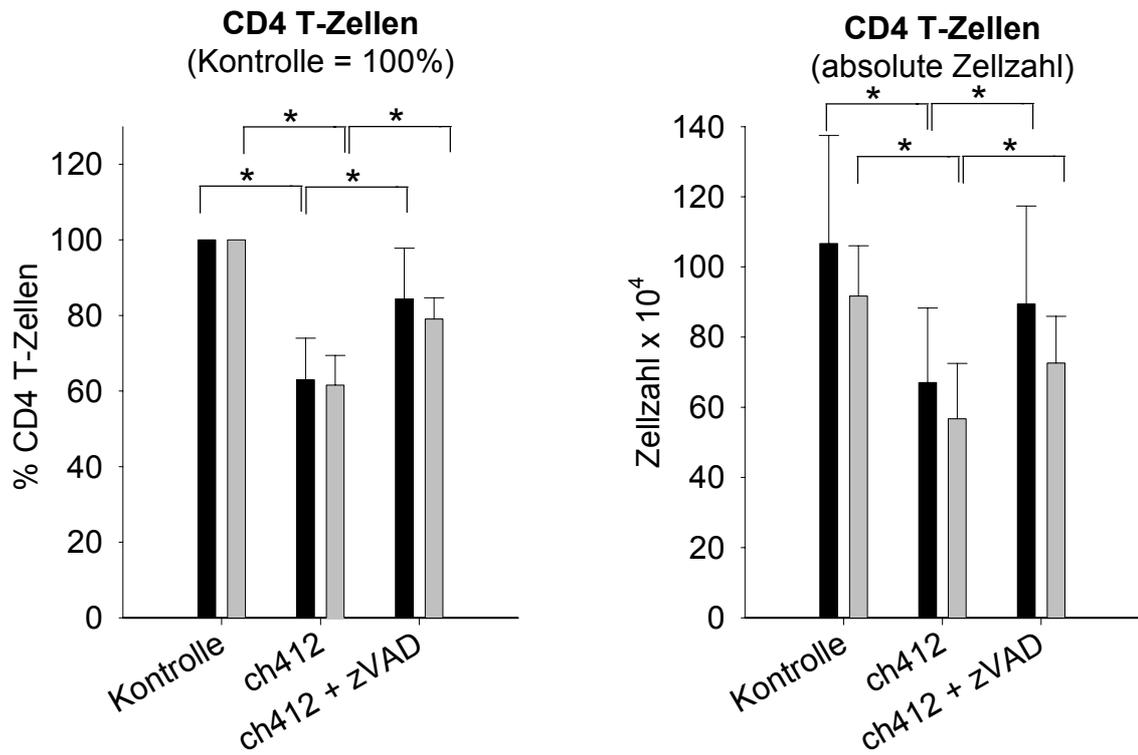
#### **4.12 Wirkung von zVAD-FMK auf die CD4 T-Zelldeletion durch ch412 (monoklonaler Antikörper gegen CD4)**

##### **4.12.1 Hemmung der ch412-induzierten CD4 T-Zellapoptose**

24-stündige Inkubation der mononukleären Zellen mit ch412 (1µg/ml) ließ die Zahl der CD4 T-Zellen im Erwachsenenblut auf 63%, im Nabelschnurblut auf 62% der Kontrolle absinken (jeweils  $p=0,007$ ; siehe Abbildung 4.15 (a)). Vorinkubation mit zVAD-FMK über eine Stunde verminderte die T-Zelldeletion durch ch412 um etwa die Hälfte: Die T-Zellzahl sank auf nur 84% (PB) bzw. 79% (NSB) der Kontrolle (jeweils  $p=0,05$ ; Abbildung 4.15 (a)).

Die ch412-getriggerten Apoptose der CD4 T-Zellen und ihre Hemmung durch zVAD-FMK wurden durch Färbungen mit Annexin V und Propidiumiodid bestätigt. ch412 ließ den Prozentanteil an Annexin V- und Propidiumiodid-positiven Lymphozyten von 2% auf ca. 5,5% (Annexin V) bzw. 0,5% auf 4% (Propidiumiodid) steigen ( $p$  je  $< 0,00005$ , Abbildung 4.15 (b)). zVAD-FMK konnte diese Apoptoserate signifikant reduzieren auf 3,5% (PB) bzw. 4% (NSB) Annexin V- und ca. 2% Propidiumiodid-positive Lymphozyten ( $p$  je  $< 0,05$ , vergleiche Abbildung 4.15 (b)). Ihr Anteil war zwar signifikant kleiner als mit ch412 allein, lag aber immer noch signifikant über den Werten der Kontrolle ( $p<0,005$ ).

(a)



(b)

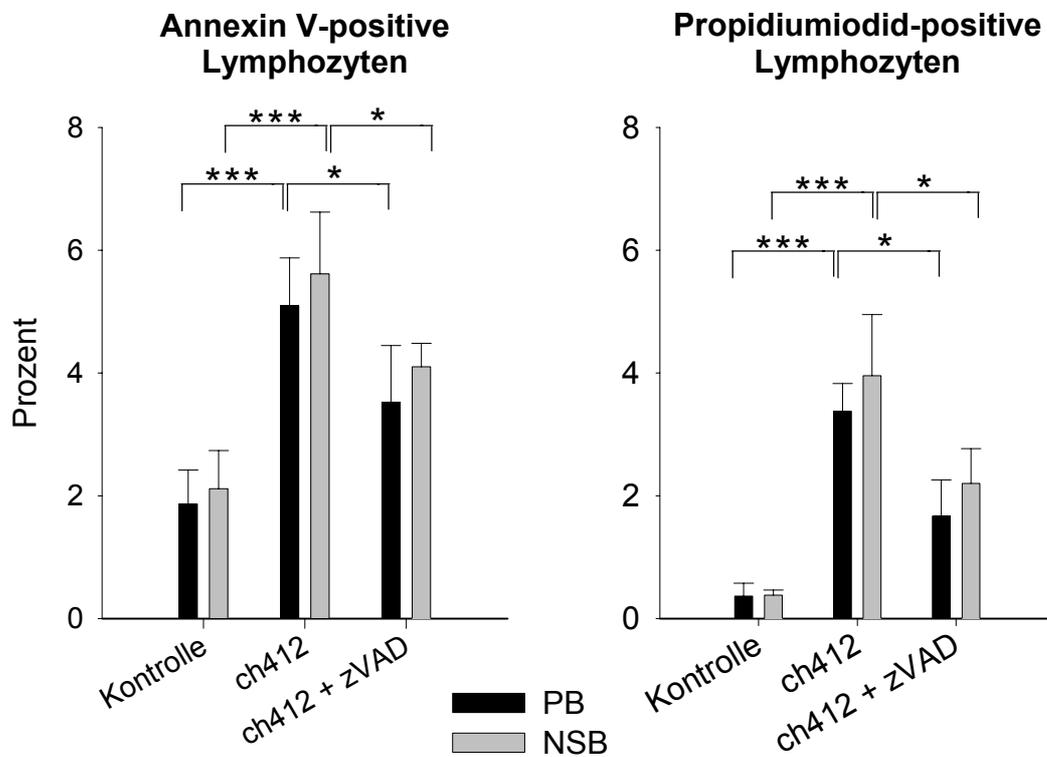


Abbildung 4.15: Hemmung der CD4 T-Zellapoptose durch zVAD-FMK

Die Zellen wurden über 24 Stunden mit ch412 bzw. ch412 plus zVAD-FMK inkubiert. \*\*\*  $p < 0,0005$ , \*  $p < 0,05$ , +  $p < 0,005$  versus Kontrolle

(a) CD4 T-Zellzahl nach Inkubation mit ch412: Der Lymphozytenanteil an den Gesamtzellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt (siehe 3.5.3) und mit der unter dem Mikroskop gezählten Gesamtzellzahl multipliziert. Aus der daraus resultierenden absoluten Lymphozytenzahl und dem Anteil der CD4 T-Zellen an den Lymphozyten, bestimmt durch CD4-Färbung, konnte die Absolutzahl der CD4 T-Zellen (rechtes Schaubild) errechnet werden. Die CD4 T-Zellzahl der Kontrolle wurde als 100% definiert und die Zellzahlen bei ch412-Gabe mit bzw. ohne zVAD-FMK zu ihr in Bezug gesetzt (linkes Schaubild). Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von acht Versuchen.

(b) Annexin V- und Propidiumiodid-positive Lymphozyten: Färbungen mit PE-konjugiertem Annexin V und mit Propidiumiodid, Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei (Propidiumiodid) bzw. fünf (Annexin V) Versuchen

Der relative Anteil der CD4 T-Zellen an den Lymphozyten insgesamt nahm entsprechend ihrer Absolutzahl (siehe oben) durch ch412 ab: Er sank von 48% auf 36% (PB) bzw. 51% auf 42% (NSB). Kompensatorisch stiegen die relativen Anteile an CD8 T-Zellen und an CD4-/CD8-negativen Lymphozyten. zVAD-FMK verringerte die Abnahme der CD4 T-Zellen und damit auch die kompensatorische Zunahme der CD4-negativen Lymphozyten (vergleiche Tabelle 4.9).

Prinzipiell könnte die Abnahme der CD4 T-Zellen durch ch412 auf einer reinen Herabregulation der CD4-Expression basieren. In diesem Fall hätte die Absolutzahl der doppeltnegativen (d.h. CD4- und CD8-negativen) Lymphozyten ansteigen müssen. Trotz der kompensatorischen Zunahme ihrer relativen Anteile (siehe oben) veränderte sich weder die Absolutzahl der doppeltnegativen noch die der CD8 T-Zellen (Tabelle 4.9). Demnach führte ch412 tatsächlich zu einer Abnahme in der absoluten CD4 T-Zellzahl.

zVAD-FMK schützte nicht nur die CD4 T-Zellen, sondern auch die CD8 T-Zellen und die doppeltnegativen Lymphozyten, was sich in einer höheren Absolutzellzahl im Vergleich zur Kontrolle widerspiegelt (vergleiche Tabelle 4.9).

<b>PB</b>	Kontrolle	ch412	ch412 + zVAD
%CD4 T-Zellen im Ly-fenster	48,3 ± 10,7	35,6 ± 13,9*	44,4 ± 14,2**
Absolutzahl CD4 T-Zellen x 10 <sup>3</sup>	1067 ± 308	670 ± 213 *	894 ± 279 **
%CD8 T-Zellen im Ly-fenster	17,5 ± 3,4	21,6 ± 6,0	19,5 ± 4,5
Absolutzahl CD8 T-Zellen x 10 <sup>3</sup>	367 ± 85	371 ± 108	407 ± 106
%CD4-CD8- im Ly-fenster	34,2 ± 6,3	42,8 ± 12,1	36,1 ± 8,9
Absolutzahl CD4-CD8- x 10 <sup>3</sup>	707 ± 142	717 ± 215	749 ± 196

<b>NSB</b>	Kontrolle	ch412	ch412 + zVAD
%CD4 T-Zellen im Ly-fenster	51,0 ± 5,9	42,3 ± 8,2 *	46,9 ± 6,3 **
Absolutzahl CD4 T-Zellen x 10 <sup>3</sup>	917 ± 143	567 ± 158*	726 ± 133**
%CD8 T-Zellen im Ly-fenster	8,3 ± 0,7	11,8 ± 1,9	9,5 ± 1,3
Absolutzahl CD8 T-Zellen x 10 <sup>3</sup>	158 ± 24	162 ± 22	169 ± 16
%CD4-CD8- im Ly-fenster	40,7 ± 3,8	45,9 ± 8,2	44,3 ± 5,8
Absolutzahl CD4-CD8- x 10 <sup>3</sup>	750 ± 47	742 ± 67	786 ± 97

Tabelle 4.9: Relative Anteile, Absolutzahlen an CD4 / CD8 T-Zellen und CD4-CD8-Lymphozyten

Färbungen mit FITC-konjugierten Antikörpern gegen CD4 und PE-konjugierten Antikörpern gegen CD8 nach 24 Stunden Inkubation der Zellen mit ch412 bzw. ch412 plus zVAD-FMK; angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung von sechs (CD8+, CD4-CD8-) bzw. acht (CD4+) Versuchen. Ly-fenster = Lymphozytenfenster im Dot Plot, \* p<0,05 versus Kontrolle, \* p<0,05 versus ch412

#### 4.12.2 Regulation der CD4-, CD3- und CD28-Expression von CD4 T-Zellen

Im Erwachsenenblut führte ch412 zu einer signifikanten Herabregulation sowohl der Expression von CD4 selbst als auch von CD3 auf den CD4 T-Zellen: Im Vergleich zur Kontrolle sank die CD4-Expression um 72% (p=0,004), die CD3-Expression um 33% (p=0,03) (siehe Tabelle 4.10). Durch zVAD-FMK wurde die Herabregulation beider Rezeptoren um ca. 40% gehemmt.

Auch im Nabelschnurblut konnte tendenziell eine Abnahme der CD4- und CD3-Expression auf den CD4 T-Zellen um 25% bzw. 20% beobachtet werden. Sie war jedoch nicht signifikant (bei beiden  $p=0,19$ ) (Tabelle 4.10). Mit zVAD-FMK nahmen beide Rezeptordichten tendenziell weiter ab (nicht signifikant:  $p=0,26$ ) (siehe Tabelle 4.10).

Der kostimulatorische Rezeptor CD28 wurde durch ch412 auf den CD4 T-Zellen signifikant um 58% (PB) bzw. 36% (NSB) herabreguliert ( $p<0,005$ ). zVAD-FMK konnte diese Herabregulation weder verhindern noch vermindern (siehe Tabelle 4.10).

<b>PB</b>	Kontrolle	ch412	ch412 + zVAD
CD4-MFI (FU)	174 ± 26	49 ± 24 *	98 ± 41
CD3-MFI der CD4 T (FU)	627 ± 120	421 ± 123 *	508 ± 99
CD28-MFI der CD4 T (FU)	190 ± 42	79 ± 21 *	83 ± 24

<b>NSB</b>	Kontrolle	ch412	ch412 + zVAD
CD4-MFI (FU)	191 ± 33	159 ± 30	135 ± 19
CD3-MFI der CD4 T (FU)	634 ± 154	506 ± 40	462 ± 72
CD28-MFI der CD4 T (FU)	170 ± 39	108 ± 16 *	101 ± 25

**Tabelle 4.10:** CD4 T-Zellexpression von CD4, CD3 und CD28 mit ch412

Die Färbung wurde mit FITC-konjugierten Antikörpern gegen CD4 und PE-konjugierten Antikörpern gegen CD3 und CD28 nach 24 Stunden Inkubation der Zellen mit ch412 bzw. ch412 plus zVAD-FMK durchgeführt. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung von fünf (CD4-, CD3-MFI auf CD4 T-Zellen) bzw. sechs (CD28-MFI auf CD4 T-Zellen) Versuchen. MFI = mittlere Fluoreszenzintensität, \*  $p<0,05$  versus Kontrolle

### 4.12.3 Einfluss von ch412 auf die Makrophagen

ch412 hatte weder auf die Absolutzahl noch auf die Anteile an Annexin V- oder Propidiumiodid-positiven Makrophagen einen Einfluss. Von den untersuchten Parametern wurde nur die Expression des CD14-Oberflächenmoleküls im Erwachsenenblut verändert: Sie nahm signifikant auf die Hälfte ab ( $p=0,004$ ). Im Nabelschnurblut zeigte sich keine Veränderung (siehe Tabelle 4.11). (Entsprechend dem Abschnitt 4.3 wurden bei der Auswertung der Propidiumiodid- und der Annexin V-Färbung nur die großen Makrophagen berücksichtigt.)

Durch Vorinkubation mit zVAD-FMK halbierte sich die Makrophagenzahl ( $p<0,05$ ). Die Annexin V- und Propidiumiodid-positiven Makrophagen nahmen signifikant auf etwa das Doppelte der Kontrollwerte zu ( $p$  je  $< 0,05$ ). Die CD14-Expression wurde durch zVAD-FMK stark herabreguliert auf ca. 20% der Kontrolle ( $p<0,05$ ) (vergleiche Tabelle 4.11). Diese Ergebnisse stimmen mit den Darstellungen der Abschnitte 4.1 bis 4.4 überein. Die Stimulation mit ch412 plus zVAD-FMK führte bezüglich der Makrophagen zu den gleichen Ergebnissen wie die Inkubation mit zVAD-FMK allein.

<b>PB</b>	Große Mφ Zellzahl x 10 <sup>3</sup>	davon: <u>Annexin V-pos.</u> Mφ (%)	davon: <u>Propidiumiodid-</u> <u>pos. Mφ (%)</u>	<u>CD14-MFI</u> (alle Mφ) (FU)
Kontrolle	325 ± 70	8,3 ± 2,7	1,9 ± 0,6	343 ± 87
ch412	332 ± 66	6,6 ± 3,3	2,2 ± 0,7	174 ± 47 **
ch412 + zVAD	171 ± 49 *	20,3 ± 2,8 *	4,5 ± 0,6 *	67 ± 10 *

<b>NSB</b>	Große Mφ Zellzahl x 10 <sup>3</sup>	davon: <u>Annexin V-pos.</u> Mφ (%)	davon: <u>Propidiumiodid-</u> <u>pos. Mφ (%)</u>	<u>CD14-MFI</u> (alle Mφ) (FU)
Kontrolle	472 ± 181	8,0 ± 2,3	1,5 ± 0,4	372 ± 137
ch412	460 ± 109	9,1 ± 3,1	1,9 ± 0,4	367 ± 104
ch412 + zVAD	245 ± 80 *	15,4 ± 4,9 *	4,2 ± 0,9 *	72 ± 23 *

Tabelle 4.11: Makrophagenzahl und Ergebnisse der Propidiumiodid-, Annexin V-, CD14-Färbung der Makrophagen mit ch412

Die Färbungen wurden mit Propidiumiodid, PE-konjugiertem Annexin V und FITC-konjugierten Antikörpern gegen CD14 nach 24 Stunden Zellkultur mit ch412 bzw. ch412 plus zVAD-FMK durchgeführt. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von je vier (Annexin V-, Propidiumiodid-Färbung, CD14-Färbung) bzw. fünf (Makrophagenzahl) Versuchen. M $\phi$  = Makrophagen, MFI = mittlere Fluoreszenzintensität, \*\*  $p < 0,005$  versus Kontrolle, \*  $p < 0,05$  versus Kontrolle

#### 4.13 Ergebnisse der Zellkulturen mit dem Caspase-Family Inhibitor Set

Inkubation mit dem Caspase-Family Inhibitor Set aus fünf einzelnen Peptidinhibitoren (vergleiche Methoden 3.3) führte wie die Inkubation mit zVAD-FMK innerhalb von 24 Stunden zu einer signifikanten Abnahme der Makrophagenzahl um ca. 50% ( $p = 0,02$ ) und einer starken Herabregulation der CD14-Expression auf 20% des Kontrollwerts ( $p = 0,01$ ). Der relative Lymphozytenanteil nahm kompensatorisch zu; die absolute Lymphozytenzahl wurde durch die Inhibitor-Kombination jedoch nicht verändert (vergleiche Tabelle 4.12).

<b>PB</b>	Kontrolle	Caspase-Inhibitor-Set
Anteil große Makrophagen (%)	16 $\pm$ 3	7 $\pm$ 3 *
Absolutzahl Makrophagen x 10 <sup>3</sup>	373 $\pm$ 72	155 $\pm$ 63 *
Lymphozytenanteil (%)	84 $\pm$ 4	93 $\pm$ 3
Absolutzahl Lymphozyten x 10 <sup>3</sup>	1927 $\pm$ 83	1948 $\pm$ 117
CD14-MFI (FU)	310 $\pm$ 42	65 $\pm$ 8 *

Tabelle 4.12: Anteile bzw. Absolutzahlen der Makrophagen und Lymphozyten sowie CD14-Expression mit dem Caspase-Family Inhibitor Set

Die Zellen wurden über 24 Stunden mit bzw. ohne dem Caspase-Inhibitor-Set inkubiert, von der Kulturplatte abgenommen und gezählt. Der Lymphozyten- bzw. Makrophagenanteil an den Gesamtzellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt (siehe unter 3.5.3) und mit der unter dem Mikroskop gezählten Gesamtzellzahl multipliziert, woraus die absolute Lymphozyten- bzw. Makrophagenzahl resultierte. Färbung mit FITC-konjugierten Antikörpern gegen CD14. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei Versuchen. MFI = mittlere Fluoreszenzintensität, \*  $p < 0,05$  versus Kontrolle

#### 4.14 Zusammenfassung der Ergebnisse

Der in der Forschung häufig als Apoptosehemmstoff verwendete Caspase-Inhibitor zVAD-FMK führte in einer Kultur aus mononukleären Zellen zum Absterben der Makrophagen. Ihre Absolutzahl und ihr relativer Anteil sanken signifikant innerhalb 24-stündiger Inkubation mit 40 $\mu$ M zVAD-FMK. Die Makrophagen nahmen an Größe ab, an Granularität zu und erschienen im durchflusszytometrischen Bild als eine Population kleiner, geschrumpfter Zellen. Dieser „Schrumpfungszelltod“ wurde durch Färbungen mit Annexin V und Propidiumiodid als Apoptose bestätigt. Die Kinetiken ergaben, dass 50% der Makrophagen innerhalb der ersten 24 Stunden unter gleichzeitiger Herabregulation von CD14 apoptotisch wurden. Parallel zum Anteil der CD14-positiven Makrophagen nahm auch der Anteil an CD16-positiven Makrophagen ab. Die Expression anderer untersuchter Rezeptoren für Antigenpräsentation und Kostimulation wurde nicht richtungsweisend verändert. Eine Aktivierung der Makrophagen mit Lipopolysaccharid konnte die Makrophagenapoptose nicht verhindern.

Im Gegensatz zum Verhalten der Makrophagen konnte die T-Zellapoptose durch Antikörper gegen CD3 und CD4 mit zVAD-FMK gehemmt werden. Gleichzeitig verminderte der Caspase-Hemmstoff aber auch die T-Zellblastenbildung und verhinderte die CD28-Aufregulation durch OKT3.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Zur Methodik

#### 5.1.1 Zellkultur und Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine etablierte Methode, um Zellen hinsichtlich ihrer relativen Zellgröße, ihrer Granularität und der Expression von angefärbten Oberflächenantigenen zu untersuchen (Volk, 1991). Bei der Verwendung von humanen Blutzellen sind folgende Bedingungen zu beachten:

**1) Rasche Verarbeitung der Zellen unter gleichbleibenden Bedingungen:**

Eine Aufbewahrung von mehr als vier Stunden vor der Zellisolierung oder bei folgenden Arbeitsschritten führt vor allem im Nabelschnurblut zu einer signifikant verringerten Überlebensrate von T-Zellen und Makrophagen. Daher wurden alle Versuche mit frischem, allenfalls kurzzeitig gekühltem Vollblut und vergleichbaren Konzentrationen von Heparin durchgeführt. Um sicherzugehen, dass bei der Zellisolierung (vgl. 3.1) keine signifikanten Anteile an mononukleären Zellen verloren gingen und das Verhältnis von Makrophagen zu Lymphozyten nicht verschoben war, wurden anfangs Vergleichsmessungen mit Vollblut und frisch isolierten Zellen durchgeführt.

Insbesondere bei den Messungen mit Apoptosefarbstoffen (siehe unter 5.1.2) ist eine zu lange Aufbewahrung der Zellen zu vermeiden, da das Ergebnis ansonsten verfälscht werden kann. Mit Annexin V-gefärbte Zellen wurden innerhalb von 30 min nach dem letzten Waschvorgang analysiert und bis zur Messung auf Eis aufbewahrt (vgl. 3.6.2). Propidiumiodid wurde erst 5 min vor der Messung zu den Proben gegeben; die Zellen davor maximal 30 min auf Eis aufbewahrt (vgl. 3.6.3).

**2) Möglichst einheitliche Populationen:** Bei Erwachsenen und Neugeborenen wurde darauf geachtet, die Patientenkollektive möglichst

homogen zu gestalten. Neugeborene mit Infektionen und Frühgeborene wurden ausgeschlossen. Akut kranke Erwachsene und Erwachsene mit chronischen Erkrankungen, die das Verhältnis der Immunzellen beeinflussen können (z.B. Asthma bronchiale), wurden ebenfalls nicht einbezogen.

**3) Bestimmung der absoluten Zellzahl:** Die Identifikation der lebenden Zellen unter dem Mikroskop (Trypanblau, vgl. 3.2) und die anschließende Multiplikation der Gesamtzellzahl mit dem Prozentanteil eines bestimmten Phänotyps ist bei ungenauem Pipettieren und / oder inhomogener Zellsuspension störanfällig. Sie setzt sorgfältiges Arbeiten voraus. Jeder Versuch wurde mindestens dreimal, bei starken Ergebnisabweichungen häufiger wiederholt.

Diese Art der Zellzahlbestimmung war v.a. bei der Berechnung der Deletion von CD4 T-Zellen vorteilhaft: Der Prozentanteil an CD4 T-Zellen nahm nach Behandlung mit ch412 ab; kompensatorisch stieg der relative Anteil an CD4-negativen Lymphozyten (CD8 T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen) in der durchflusszytometrischen Messung an (vgl. Tabelle 4.9). Da die absolute Lymphozytenzahl durch die Deletion der CD4 T-Zellen jedoch abnahm, änderte sich die absolute Zellzahl der CD4-negativen Lymphozyten nicht.

**4) Identifikation von Makrophagen und Lymphozyten:** Die Identifikation der Makrophagen und Lymphozyten erfolgte nach durchflusszytometrischen Standards durch die Bestimmung von Zellgröße und –granularität (Abb. 3.1) sowie über die Expression von charakteristischen Oberflächenmolekülen. Für die Lymphozyten wurden als Marker CD3, CD4 und CD8 (T-Zellmarker), CD19 (B-Zellen) und CD16 bzw. CD56 (NK-Zellen) verwendet (vergleiche auch 1.1.3). Als allgemeiner Makrophagenmarker gilt das CD14-Molekül. In den Kontrollen waren in der gewählten durchflusszytometrischen Zielregion für die Makrophagen  $95\% \pm 2\%$  (PB) bzw.  $82\% \pm 5\%$  der Zellen CD14-positiv (siehe Tabelle 4.1). Da zVAD-FMK zu einer starken Herabregulation von CD14 führte, konnte es in dieser Arbeit jedoch nicht als valider Makrophagenmarker für alle Proben verwendet werden. Zwar wurde das Makrophagenfenster für die

Kontrollen weiterhin unter Beachtung der CD14-Expression gesetzt. In anderen Proben, insbesondere nach Behandlung mit zVAD-FMK oder IFN $\gamma$ , wurden die Makrophagen aber primär durch ihre Zellgröße und Granularität und zusätzlich durch den trotz Herabregulation vergleichsweise hohen Anteil an CD14-positiven Zellen bei nur wenigen Zellen mit anderen Zellmarkern (v.a. Lymphozytenmarkern) identifiziert (vergleiche dazu Tabelle 4.1).

Eine weitere Differenzierung der Makrophagen in Bezug auf andere Oberflächenmoleküle erfolgte nicht. Versuchweise wurden CD64 und CD11b verwendet. Sie wurden jedoch wieder verworfen, da ihre Expression durch zVAD-FMK ebenfalls verändert wurde (Ergebnisse nicht dargestellt).

Da Zellen während des Apoptosevorgangs schrumpfen und verdichten, muss die Zielregion entsprechend der verminderten Zellgröße und einer erhöhten Granularität im Vergleich zu „gesunden“ Zellen nachreguliert oder ein zweites Fenster für apoptotisch geschrumpfte Zellen eingefügt werden (Abb. 4.3).

T-Zellblasten sind größer als ruhende T-Zellen und können von ihnen durchflusszytometrisch aufgrund ihrer höheren FSC-Werte abgegrenzt werden (vgl. 3.7.2). Von den Makrophagen lassen sich die T-Zellblasten durch ihre hohe CD4- bzw. CD8-Expression unterscheiden. Die CD4-Expression der Makrophagen ist deutlich geringer als die der CD4 T-Zellen (Sell & Max, 2001). Eine weitere Gefahr besteht in der Verwechslung mit Zellkonglomeraten. Im Vergleich zu ihnen haben Blasten jedoch ein signifikant verschiedenes Muster mit geringerer Größe, leicht erhöhter Grundfluoreszenz und niedrigerer Granularität.

**5) Spezifität der Färbeantikörper:** Die durchflusszytometrische Untersuchung von Makrophagen wird durch ihre Expression von Fc-Rezeptoren erschwert. Letztere wurden in dieser Arbeit durch Inkubation mit Polyglobin (einem polyvalenten Immunglobulinpräparat) blockiert, um eine unspezifische Bindung der Färbeantikörper zu verhindern (siehe 3.5.2). Außerdem wurden standardisiert bei jedem Versuch Isotyp- / Negativkontrollen gemessen, um die Hintergrundfluoreszenz der Zellen zu erfassen. Die Negativkontrollen wurden auf weniger als  $10^1$  Fluoreszenzeinheiten auf den beiden logarithmischen

Achsen eingestellt, wodurch die Vergleichbarkeit der Gruppen gesichert wurde (vgl. 3.5.3).

OKT3 und der durchflusszytometrische antiCD3-Färbeantikörper hemmen sich kompetitiv in ihrer Bindung an CD3. Deshalb wurde die T-Zellzahl, wie bereits in der Literatur beschrieben (Lewis & Jackson, 1992, Chatenoud, 2003), durch die Summe aus CD4 und CD8 T-Zellen bestimmt.

ch412 und der antiCD4-Färbeantikörper (Klon SK3) binden dagegen an unterschiedliche Epitope des CD4-Moleküls, wodurch eine kompetitive Bindungshemmung ausgeschlossen wurde.

6) **Geräteeinstellung:** Makrophagen und Lymphozyten haben unterschiedliche Eigenfluoreszenzen. Daher ist eine getrennte Geräteeinstellung für beide Zellarten nötig (siehe 3.5.3). Innerhalb einer Messreihe wurde dann ein und dieselbe Einstellung beibehalten, um die Vergleichbarkeit der verschiedenen Proben zu gewährleisten. Während einer Kinetik wurde die anfängliche Einstellung gespeichert und bei folgenden Messzeitpunkten allenfalls die Kompensation von Isotyp und / oder Positivkontrollen angepasst. Die Verstärkerspannung wurde nicht verändert, um die Messwerte der verschiedenen Zeitpunkte miteinander vergleichen zu können.

### 5.1.2 Apoptose-Detektion

Zur Apoptose-Detektion wurden drei verschiedene Methoden verwendet. Apoptotische Zellen können durchflusszytometrisch durch einen verminderten FSC- und einen erhöhten SSC-Wert sowohl von lebenden als auch von nekrotischen Zellen abgegrenzt werden, was Dive et al. 1992 bzw. Vermes et al. 2000 beschrieben haben (vgl. 3.6.1).

Die Anfärbung von Phosphatidyl-Serin durch Annexin V gilt als sensitiver und spezifischer Marker für apoptotische Zellen (Vermes et al., 1995, Koopman et al., 1994). Vorteile ergeben sich durch die frühe und universelle Verlagerung

von Phosphatidyl-Serin während der Apoptose, wodurch die apoptotischen Zellen früh und unabhängig von Zellart oder Apoptosetrigger erfasst werden können (Vermes et al., 1995, Vermes et al., 2000, Fadok et al., 1992, Verhoven et al., 1999, Martin et al., 1995, Heidenreich et al., 1997). Nachteil dieser Färbung ist die zwar spezifische, aber nur in Gegenwart von ausreichend Calcium stabile Bindung von Annexin V an Phosphatidyl-Serin (Andree et al., 1990, Vermes et al., 2000). Die Färbung muss daher mit einem Calciumhaltigen Färbepuffer (2,5mM CaCl<sub>2</sub>, vergleiche 3.6.2) durchgeführt werden. Auch nach erfolgter Färbung dürfen die Zellen nur mit diesem Färbepuffer gewaschen werden, da jede Verminderung der Calcium-Konzentration zu einer Abnahme der Bindungsfähigkeit von Annexin V führt. Zur Validierung der Annexin V-Färbung wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert, dass Annexin V tatsächlich auf der Membranoberfläche der apoptotischen Zellen gebunden hatte und nicht in eventuell vorhandene nekrotische Zelltrümmer diffundiert war (siehe 3.6.2).

Problematisch war die im Vergleich zu Lymphozyten verstärkte Annexinbindung der Makrophagen aufgrund einer höheren Motilität der Plasmamembran (Heidenreich et al., 1997). In dieser Arbeit wurde für Makrophagen und Lymphozyten der gleiche Färbepuffer mit identischer Calcium-Konzentration verwendet. Daher wurde auf den Makrophagen in der Kontrolle eine zu den Lymphozyten relativ falschhohe Annexin V-Intensität gemessen. Um die gleiche Messeinstellung für alle Färbungen einer Versuchsreihe beibehalten zu können (siehe unter 5.1.1 „Geräteeinstellung“), wurde die hohe Annexin V-Intensität nicht neu kompensiert, sondern stattdessen der Quadrantenmarker bei dieser Färbung analog zu Beispielen in der Literatur (Banki et al., 1999) höher als 10<sup>1</sup> FU gesetzt (vergleiche Abbildung 4.5). Die signifikante Zunahme der Annexin V-positiven Makrophagen durch zVAD-FMK war mit und ohne Anpassung des Quadrantenmarkers eindeutig. In anderen Arbeiten wurde für die Annexin V-Färbung von Makrophagen ein Färbepuffer mit einer geringeren Konzentration von Calcium (z.B. 1,8mM) verwendet, um der höheren Bindungsfähigkeit der Makrophagen entgegenzuwirken (Heidenreich et al., 1997).

Mit dem DNA-Farbstoff Propidiumiodid werden alle Zellen angefärbt, deren Zellmembran permeabel ist (siehe 3.6.3). Dies ist sowohl von Beginn der Nekrose an wie auch in späten Phasen der Apoptose der Fall (Vermes et al., 1995). Damit können nekrotische und apoptotische Zellen zwar gegenüber lebenden Zellen abgegrenzt, aber prinzipiell nicht voneinander unterschieden werden (Vermes et al., 1995). In Kombination mit der Annexin V-Färbung kann mit Propidiumiodid jedoch der Verlauf der Apoptose dargestellt werden: Es zeigt sich ein frühes Maximum an Annexin V-positiven und ein mit zeitlicher Latenz folgender Gipfel an Propidiumiodid-positiven Zellen, während nekrotische Zellen von Anfang an mit Propidiumiodid angefärbt werden (Vermes et al., 1995, Vermes et al., 2000).

### 5.1.3 Caspase-Inhibitoren

Bei der Verwendung von Caspase-Inhibitoren in Zellkulturen muss darauf geachtet werden, dass der verwendete Inhibitor zellpermeabel und im jeweiligen Kulturmedium stabil ist, außerdem eine für die Kulturzeit ausreichende Halbwertszeit hat und eine genügend stabile Bindung zu den Caspasen aufbaut. Nach Herstellerangaben erfüllen sowohl zVAD-FMK (vergleiche 1.2.3 und 3.3) als auch das Caspase-Family Inhibitor Set (4.13) diese Eigenschaften für die in dieser Arbeit verwendeten Kulturbedingungen (Product Monograph CASPASE der Firma Bachem, [www.bachem.com](http://www.bachem.com), Produktbeschreibung CASPASE-FAMILY-INHIBITOR-SET der Firma Chemicon, [www.chemicon.com](http://www.chemicon.com)).

Eine beeinträchtigende Wirkung des zur Lösung von zVAD-FMK verwendeten DMSO auf die mononukleären Zellen wurde ausgeschlossen (siehe 3.8).

## 5.2 Zu den Ergebnissen

### 5.2.1 Wirkung von zVAD-FMK auf Makrophagen und Lymphozyten

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Wirkung des Pancaspase-Inhibitors zVAD-FMK auf das Apoptoseverhalten von Makrophagen und Lymphozyten zu untersuchen.

zVAD-FMK hemmt irreversibel die Aktivität von allen bisher bekannten menschlichen Caspasen, auch wenn er zu den einzelnen Caspasen eine leicht unterschiedliche Affinität zeigt (Borner & Monney, 1999, Garcia-Calvo et al., 1998, Chen & Wang, 2002, Hunot & Flavell, 2001). Der Pancaspase-Inhibitor wird seit Jahren routinemäßig in der Forschung eingesetzt. In verschiedenen Tiermodellen sowie bei In-vitro-Versuchen mit menschlichen und tierischen Zellen konnte die Apoptose erfolgreich gehemmt und dadurch die Zellfunktion nachweislich erhalten werden (Hara et al., 1997, Schulz et al., 1999, Yaoita et al., 1998, Loddick et al., 1996, Fukuzuka et al., 1999, Rodriguez et al., 1996, Farber et al., 1999, Daemen et al., 1999, Li et al., 2000, Hotchkiss et al., 2000, Banki et al., 1999, Hur et al., 2003, Leite-de-Moraes et al., 2000, Zhang et al., 2000, Komoriya et al., 2000, Nagahara et al., 2000). In Experimenten mit Immunzellen wurden v.a. Lymphozyten und Neutrophile untersucht, deren Apoptose unter verschiedenen Bedingungen durch zVAD-FMK geblockt oder zumindest vermindert wurde. Allerdings gibt es Beispiele, in denen zVAD-FMK bestimmte Apoptoseformen nicht (oder nur fraglich) verhindern konnte. In diesen Fällen lief die Apoptose von vorneherein oder nach Hemmung der Caspasen über einen caspaseunabhängigen Weg ab (Woodle et al., 1997, Zanke et al., 1998, Deas et al., 1998, Sarin et al., 1997, Borner & Monney, 1999, Drenou et al., 1999).

Zur Wirkung von zVAD-FMK auf die Makrophagenapoptose gibt es bisher nur wenige Ergebnisse. Ruckdeschel et al., 2002 und Denecker et al., 2001 konnten die Apoptose von *Yersinia enterocolitica*-infizierten Mausmakrophagen in einer reinen Makrophagenkultur der Zelllinie J744A.1 mit zVAD-FMK

erfolgreich hemmen. Sie verwendeten den Inhibitor in Konzentrationen von 40 bzw. 100µM ohne toxischen Effekt auf die Zellen. Allerdings beurteilten sie die Apoptoserate rein morphologisch unter dem Fluoreszenzmikroskop; eine direkte Anfärbung der apoptotischen Zellen (z.B. mit Annexin V) erfolgte nicht. Die Kulturbedingungen der beiden Versuchsreihen sind nicht mit den Bedingungen dieser Arbeit vergleichbar. Abgesehen davon sind Ergebnisse einer Zelllinie, noch dazu einer mäuseichen, nicht direkt auf Zellkulturen mit aus Blut isolierten, humanen Zellen übertragbar.

Dockrell et al., 2001 konnten die Apoptose von Streptococcus pneumoniae-infizierten menschlichen Makrophagen verhindern. Sie verwendeten eine reine Makrophagenkultur mit isolierten Zellen aus peripherem Erwachsenenblut. zVAD-FMK wurde in einer Konzentration von 50µM eingesetzt; die Apoptose durch TUNEL-Färbung (engl. „terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling“, Färbung zur Detektion von DNA-Fragmenten) fixierter und permeabilisierter Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Die Autoren beobachteten nach 20 Stunden Kulturzeit keine veränderte Apoptoserate durch zVAD-FMK in den (nicht-infizierten) Kontrollmakrophagen. Dieser Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann durch unterschiedliche Kulturbedingungen und verschiedene Arten der Zellaufbereitung bedingt sein oder allein dadurch, dass bei Dockrell et al, 2001 eine reine Makrophagenkultur, in dieser Arbeit aber eine Kultur aus Makrophagen und Lymphozyten verwendet wurde.

In der vorliegenden Arbeit war zVAD-FMK nicht nur nicht in der Lage, die Apoptose der Makrophagen zu hemmen. Vielmehr induzierte der Pancaspase-Inhibitor sogar verstärkt Apoptose in den Makrophagen. In der Literatur finden sich bisher nur Berichte einer Forschungsgruppe zur Makrophagenapoptose durch zVAD: Kim et al. fanden 2001, dass zVAD in mäuseichen Makrophagen bei gleichzeitiger Aktivierung mit LPS Apoptose induzierte, während LPS-Stimulation bzw. die Inkubation mit zVAD allein – im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen - die Makrophagen nicht beeinträchtigte. Allerdings stützen sich ihre Ergebnisse ausschließlich auf Versuche mit mäuseichen Zellen

(murine Peritonealmakrophagen, die mäusele Makrophagenzelllinie RAW 264.7 und ein In-vivo-Sepsismodell mit Mäusen). Ihre Kulturbedingungen und die Verwendung einer reinen, zudem murinen Makrophagenkultur unterscheiden sich von den in dieser Arbeit vorgestellten Versuchen. In Analysen der Enzymaktivität beobachteten Kim et al. eine komplette Inhibition aller bekannten (Maus)Caspasen durch zVAD. Sie schlossen daraus, dass der Zelltod der mäusele Makrophagen durch LPS plus zVAD über einen caspaseunabhängigen Apoptoseweg verlaufen muss, und fanden 2003 eine verstärkte Expression des proapoptotischen Kernrezeptors Nur77.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Kim et al. beeinträchtigte zVAD-FMK in dieser Arbeit das Überleben der (humanen) Makrophagen bereits in Ruhe. Die Makrophagen nahmen in ihrer Gesamtzahl durch Inkubation mit 40µM zVAD-FMK über 24 Stunden signifikant ab. Mit einer reduzierten Zellgröße und einer erhöhten Granularität wiesen sie morphologische Apoptosekriterien auf; die Prozentanteile an Annexin V- und zeitlich versetzt an Propidiumiodid-positiven Makrophagen stiegen signifikant. Damit wurde durch drei verschiedene Methoden nachgewiesen, dass die Makrophagen in Gegenwart von zVAD-FMK Apoptose begehen.

Die starke Herabregulation von CD14 während der Makrophagenapoptose (vgl. Abb. 4.6) parallel zur verstärkten Annexin V-Färbung stimmt mit Ergebnissen von Heidenreich et al., 1997 überein. Ihre Hypothese war, dass die Herabregulation von CD14 nicht nur Begleitphänomen, sondern der Trigger für die Makrophagenapoptose sei.

Keines der anderen hier untersuchten Makrophagenmoleküle wurde derart stark reguliert wie CD14 (vgl. Abb. 4.9 bis 4.11). Signifikant moduliert wurden nur die Expression von HLA-A, -B, -C im Erwachsenenblut und der Prozentanteil an CD16-positiven Makrophagen (vgl. Abb. 4.9 und 4.11). Beide nahmen ab. Die CD16-Expression dieser CD16 exprimierenden Zellen wurde allerdings nicht verändert. Das lässt vermuten, dass die CD16-exprimierenden Makrophagen als vorwiegend zytotoxisch wirkende Subpopulation (siehe 1.4) relativ mehr Apoptose durch zVAD-FMK begehen als Makrophagen, die das CD16-Molekül nicht exprimieren. Heidenreich et al. fanden außer der CD14-

Herabregulation keine Rezeptorveränderungen (untersucht wurden HLA-A, -B, -C und CD33 in einer reinen Makrophagenkultur), was ihnen zufolge die Rolle des CD14-Moleküls bei der Makrophagenapoptose unterstreicht (Heidenreich et al., 1997).

Im Gegensatz zu Makrophagen wurden die Lymphozyten im Überleben nicht beeinträchtigt, sondern schienen durch zVAD-FMK geschützt zu werden (vgl. Tabelle 4.2). Dies stimmt mit der beschriebenen erfolgreichen Apoptosehemmung durch zVAD-FMK überein (Banki et al., 1999, Komoriya et al., 2000, Nagahara et al., 2000, Sarin et al., 1996, Verhoven et al., 1999). Weder die Verhältnisse verschiedener Lymphozytenuntergruppen wurden verändert, noch wichtige Lymphozytenrezeptoren durch zVAD-FMK reguliert (vgl. Tabelle 4.2 und 4.3). Nur die Expression des Korezeptors CD4 auf T-Helferzellen nahm ab (Abb. 4.12). Die Regulation von CD4 ist ohne gleichzeitige Regulation von CD3 aber wahrscheinlich nicht bedeutend (Wang et al., 1995) und könnte durch eine verminderte Interaktion mit den (zahlenmäßig eingeschränkten) Makrophagen bedingt sein.

Es stellt sich die Frage, über welchen Mechanismus zVAD-FMK Apoptose in den Makrophagen induzierte. Eine häufige Apoptoseform im Immunsystem wird durch den Todesrezeptor CD95 getriggert. Die Expression von CD95 und CD95Ligand wurde durch zVAD-FMK jedoch weder auf den Makrophagen noch auf den Lymphozyten aufreguliert (vgl. Tabelle 4.4). Die Expressionsdichte der CD95-Moleküle auf den Makrophagen nahm im Gegenteil sogar tendenziell ab. Daher erscheint es unwahrscheinlich, dass die Apoptose durch zVAD-FMK über CD95 getriggert wurde. Allerdings wurde nur der membranständige CD95Ligand analysiert. Eine eventuelle Induktion und / oder vermehrte Sekretion von löslichem CD95Ligand (sCD95L, siehe 1.1.3) aus Lymphozyten oder aus den Makrophagen selbst kann als möglicher Auslöser der Makrophagenapoptose nicht ausgeschlossen werden. Auch die Apoptoseinduktion über andere Todesrezeptoren wie z.B. über TNF-R<sub>1</sub> mit seinem Liganden TNF $\alpha$  (vgl. 1.2.2.1) sollte in Betracht gezogen werden.

Denkbar wäre auch, dass die verwendete zVAD-FMK-Konzentration von 40µM für Makrophagen, anders als z.B. für Lymphozyten, bereits zu hoch und (sub)toxisch war. Allerdings wurde keine vermehrte Nekrose, wie bei ausgeprägtem Zellschaden zu erwarten wäre, sondern vornehmlich die Apoptose der Makrophagen beobachtet. Möglich wäre, dass die Makrophagen ihr Apoptoseprogramm aufgrund eines leichten toxischen Zellschadens auf intrinsischem / mitochondrialem Weg (vergleiche 1.2.2.1) selbst angestoßen hatten. Dagegen spricht, dass zVAD-FMK in früheren Experimenten in Konzentrationen von 100 bis zu 500µM bei Lymphozyten (Deas et al., 1998, Woodle et al., 1997) und 50µM bei (humanen) Makrophagen (Dockrell et al., 2001) eingesetzt wurde, ohne dass ein toxischer Zellschaden zu sehen war. Am häufigsten verwendeten frühere Autoren (z.B. Nagahara et al., 2000, Banki et al., 1999, Ruckdeschel et al., 2002, Komoriya et al., 2000) die Konzentration 40µM, welche für diese Arbeit übernommen wurde. Sicherlich wäre es aber für die Zukunft sinnvoll, die Wirkung von verschiedenen zVAD-FMK-Konzentrationen zu untersuchen.

Des Weiteren ist eine unspezifische Bindung von zVAD-FMK oder auch nur der Fluoromethylketongruppe (FMK-Gruppe) an andere Zellmoleküle als die Caspasen zu erwägen. Die Interaktion mit anderen Enzymgruppen wie z.B. Serinproteasen oder Granzym B wurde widerlegt (Shaw, 1990, Sarin et al., 1996). Nicht ausgeschlossen werden kann aber die Bindung von zVAD-FMK an andere Cysteinproteasen wie Calpain oder Cathepsin B oder auch an wichtige Strukturmoleküle der Zelle, die für das Überleben der Makrophagen essentiell sind. Ein negativer Effekt des zur Lösung von zVAD-FMK verwendeten DMSO wurde nicht beobachtet (vgl. 3.8).

Sollte die Makrophagenapoptose tatsächlich allein durch eine CD14-Herabregulation getriggert werden können, wie Heidenreich et al., 1997 postulierten, könnte zVAD-FMK die Makrophagenapoptose indirekt über die starke CD14-Herabregulation verursacht haben. Auch wenn die Hypothese dieser Autoren mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht widerlegt werden kann, erscheint sie fraglich. So führt z.B. IFN $\gamma$  zu einer starken CD14-Herabregulation, ohne dabei das Überleben der Makrophagen zu

beeinträchtigen. Die Makrophagen werden durch IFN $\gamma$  im Gegenteil sogar aktiviert (Smith et al., 2001). Eine vermehrte IFN $\gamma$ -Produktion durch zVAD-FMK als Grund für die CD14-Herabregulation wurde nicht beobachtet (siehe 4.10). Auch ch412 verursachte eine verminderte CD14-Expression ohne negativen Effekt auf das Makrophagenüberleben bzw. ohne Anstieg der Annexin V- bzw. Propidiumiodid-positiven Zellen (vergleiche dazu 5.2.4).

Außerdem können Zytokine das Apoptoseverhalten der Makrophagen beeinflussen. So führen IL-4 und IL-10 zu einer Supprimierung und verstärkten Apoptose der Makrophagen (Estaquier & Ameisen, 1997, Heidenreich et al., 1997). Demnach könnte zVAD-FMK über eine veränderte Zytokinproduktion und -sekretion in den Lymphozyten oder Makrophagen zur Apoptose der Makrophagen führen. Durch die vermehrte Bildung bestimmter Zytokine (z.B. IL-4) könnte auch die CD14-Herabregulation erklärt werden (Heidenreich et al., 1997).

Zu beachten ist, dass in der vorliegenden Arbeit im Unterschied zu den oben beschriebenen Studien (Dockrell et al., 2001, Ruckdeschel et al., 2002, Denecker et al., 2001, Kim et al., 2001) eine gemischtzellige Kultur aus Makrophagen und Lymphozyten verwendet wurde. Die dabei erstmals beobachtete Makrophagenapoptose durch zVAD-FMK bereits in Ruhe lässt an eine entscheidende Rolle der Lymphozyten bei der Apoptoseinduktion denken. Eine Hochregulation von CD95Ligand (und CD95) auf den Lymphozyten wurde nicht beobachtet (vgl. Tabelle 4.4). Die Expression von anderen Todesliganden oder eine möglicherweise verstärkte Sekretion makrophagensupprimierender Zytokine durch die Lymphozyten wurden in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht. Sie könnten von Bedeutung sein.

Die Tatsache, dass das Absterben der Makrophagen und die starke CD14-Herabregulation nicht nur bei zVAD-FMK beobachtet wurden, sondern auch bei einer Sammlung aus Einzelinhibitoren (Caspase-Family Inhibitor Set, siehe 4.13), die laut Hersteller (Firma Chemicon) die Caspasefamilie umfassend hemmt, spricht dafür, dass die Makrophagenapoptose durch die Caspasehemmung selbst bedingt war.

Dass zVAD-FMK prinzipiell alle bisher bekannten Caspasen hemmt, ist bereits gezeigt worden (Garcia-Calvo et al., 1998). Sollten daran Zweifel bestehen, könnte dies für die hier verwendeten Kulturbedingungen durch direkte (durchflusszytometrische) Messung der Aktivitäten von den einzelnen Caspasen in den Makrophagen bestätigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde darauf verzichtet.

Denkbar ist die Existenz von weiteren, bisher unbekanntem, proapoptotisch wirkenden Caspasen, die durch zVAD-FMK bzw. das Caspase-Family Inhibitor Set nicht gehemmt werden und die möglicherweise nur in Makrophagen vorkommen oder zumindest bei der Makrophagenapoptose eine herausragende Rolle spielen. Die Hypothese nicht gehemmter Caspasen würde allerdings nur eine unzureichende Apoptosehemmung erklären, nicht aber die beobachtete Induktion der Makrophagenapoptose durch zVAD-FMK.

Auch könnten in den Makrophagen eine oder mehrere bisher unbekannte „Überlebens“-Caspasen vorhanden sein, die vorwiegend oder ausschließlich antiapoptotische Aufgaben haben. Ihre durch die Caspaseinhibition fehlende Schutzwirkung könnte dann die Apoptose auslösen.

Noch wahrscheinlicher erscheint die Möglichkeit, dass die gleichzeitige Hemmung aller Caspasen bei Makrophagen zur Apoptose führt. Die Ursache dafür könnte sein, dass andere, apoptoseunabhängige Aufgaben der Caspasen essentiell und ihr Wegfall mit dem Zellüberleben nicht vereinbar sind. So könnten die Caspasen z.B. durch eine ständige basale Enzymaktivität die Konzentration von anderen proapoptotischen Molekülen in der Zelle kontrollieren (diverse Transkriptionsfaktoren, am Apoptoseablauf beteiligte Nichtcaspase-Enzyme, Zytokine, zellzyklusregulierende Moleküle o.ä.). Durch den Pancaspase-Inhibitor würden diese derart zunehmen, dass der Schwellenwert zur Apoptoseauslösung überschritten wird. Bei vollständiger Caspase-Hemmung würde die ausgelöste Apoptose dann über einen caspaseunabhängigen Weg verlaufen.

Des Weiteren könnten die Makrophagen durch zVAD-FMK für einen bereits in Ruhe vorliegenden Apoptosetrigger derart sensibilisiert werden, dass seine Expression bzw. Konzentration auch ohne Hochregulation zur

Apoptoseinduktion ausreicht. In neutrophilen Granulozyten, in der Zelllinie NIH3T3 und in einem Mausmodell wurde in Gegenwart von zVAD-FMK eine paradoxe Verstärkung der Apoptoseinduktion durch TNF $\alpha$  gezeigt (Lüschen et al., 2000, Liu et al., 2003, Cauwels et al., 2003). Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit fanden diese Autoren jedoch keine Apoptoseinduktion durch zVAD-FMK allein, sondern nur bei gleichzeitiger Behandlung mit TNF $\alpha$ . Trotzdem sollte eine mögliche Sensibilisierung der Makrophagen für TNF $\alpha$  oder ähnliche Apoptosetrigger durch zVAD-FMK untersucht werden. Getrennt verwendete, spezifische Inhibitoren für einzelne Caspasen konnten die TNF $\alpha$ -induzierte Apoptose dagegen erfolgreich hemmen (Jones et al., 2004, Binder et al., 1999), was eine mögliche zellschädigende Wirkung bei gleichzeitiger Hemmung aller Caspasen unterstreicht.

Beide Varianten, sowohl die intrazelluläre Zunahme von proapoptotischen Molekülen als auch die Sensibilisierung für einen bereits unterschwellig vorhandenen Apoptosetrigger, würden bedeuten, dass eine basale Aktivität zumindest eines Teils der Caspasen für das Überleben der Makrophagen (und vielleicht auch anderer Zellarten) essentiell ist.

### **5.2.2 Zur Makrophagenaktivierung mit Lipopolysaccharid**

In weiteren Experimenten wurde versucht, die zVAD-FMK-induzierte Apoptose durch gleichzeitige Aktivierung der Makrophagen mit LPS zu verhindern. Dies konnte nicht gezeigt werden (vgl. Tabelle 4.5). Auch das zusätzliche „Priming“ der Makrophagen mit IFN $\gamma$ , welches die LPS-Aktivierung verstärken kann (Bosisio et al., 2002), blieb erfolglos. Trotz Stimulation nahm die Makrophagenzahl um ca. 60% (PB) bzw. 50% (NSB) und die CD14-Expression um etwa 80% ab – vergleichbar mit den Ergebnissen ohne LPS-Aktivierung. Auf der anderen Seite wurde die Makrophagenapoptose durch die gleichzeitige LPS-Stimulation nicht verstärkt, was nach den Beobachtungen von Kim et al., 2001 nicht überraschend gewesen wäre.

---

Die Makrophagenantwort auf LPS selbst passt zu Ergebnissen anderer Autoren (Marwitz et al., 1988, Landmann et al., 1991, Landmann et al., 1996, Perera & Waldmann, 1998), so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Stimulation erfolgreich war. Allerdings wurde nur der Einfluss einer gleichzeitigen Inkubation mit LPS und zVAD-FMK untersucht. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Wirkung von zVAD-FMK bereits eingetreten war, bevor die Stimulation mit LPS überhaupt einsetzen konnte. Ob eine Makrophagenaktivierung mit LPS an verschiedenen Zeitpunkten vor Zugabe von zVAD-FMK zu anderen Ergebnissen führt, bleibt zu untersuchen.

### 5.2.3 Zur Stimulation mit OKT3

Die Stimulation mit OKT3 über 24 Stunden führte, wie bereits von anderen Autoren gezeigt (Orlikowsky et al., 2003, Orlikowsky et al., 1996, Chatenoud, 2003, Sarin et al., 1996, Verhoven et al., 1999, Van Wauwe et al., 1980, Kennedy et al., 1999, Song et al., 2004), zu einer Abnahme der T-Zellzahl und gleichzeitig zu einem Anstieg der T-Zellblasten. zVAD-FMK hob die T-Zelldeletion komplett auf und reduzierte die Blastenbildung um etwa 50% (Erwachsenenblut). Die Makrophagenapoptose durch OKT3 (AICD) wurde durch zVAD-FMK verstärkt (vgl. Tabelle 4.8).

In den bereits beschriebenen Studien zur gehemmten T-Zellapoptose bzw. reduzierten T-Zellproliferation durch zVAD-FMK nach OKT3-Stimulation (Sarin et al., 1996, Verhoven et al., 1999, Kennedy et al., 1999, Song et al., 2004) wurden nur T-Zellen, aber keine Makrophagen untersucht. Aus den Ergebnissen wurde geschlossen, dass für die OKT3-induzierte T-Zelldeletion bzw. T-Zellproliferation aktive Caspasen essentiell seien und die aufgehobene Apoptose bzw. reduzierte Blastenbildung durch zVAD-FMK auf einer Hemmung der nötigen Caspasen basiere. Da die OKT3-Wirkung jedoch entweder durch Makrophagen oder durch Kreuzvernetzung des Antikörpers vermittelt wird (Chatenoud, 2003, Orlikowsky et al., 1996), stellt sich vor dem Hintergrund der Ergebnisse dieser Arbeit die Frage, ob die Hemmung von T-Zelldeletion und -

proliferation durch zVAD-FMK nicht primär auf einer fehlenden bzw. zumindest reduzierten Wirkungsvermittlung durch die beeinträchtigten Makrophagen beruht. Ob die Funktion der überlebenden Makrophagen in Bezug auf die OKT3-Wirkung voll erhalten oder eingeschränkt war, kann nicht differenziert werden. Für eine zumindest teilweise erhaltene Funktion spricht, dass die T-Zellproliferation nicht vollständig gehemmt wurde bzw. im Nabelschnurblut sogar auf dem gleichen Niveau blieb (siehe 4.11.1). Auch bei Kennedy et al., 1999 wurde die T-Zellblastenbildung durch zVAD-FMK nur teilweise gehemmt, was die Autoren zu der Hypothese führte, dass die T-Zellproliferation nur teilweise caspaseabhängig sei.

Mit Blick auf die vorliegenden Ergebnisse erscheinen zwei Möglichkeiten wahrscheinlich: Entweder ist die Makrophagenfunktion durch die verminderte Makrophagenzahl oder aufgrund einer Beeinträchtigung auch der überlebenden Makrophagen durch zVAD-FMK so reduziert, dass die T-Zelldeletion komplett und die T-Zellproliferation z.T. gehemmt erscheint, oder die nach Inkubation mit zVAD-FMK verbleibenden Makrophagen können weiterhin eine volle OKT3- / ADCC-Wirkung an die T-Zellen vermitteln; die Apoptose der T-Zellen wird durch die Caspaseinhibition aber verhindert, während die T-Zellproliferation im Erwachsenenblut nur zum Teil caspaseabhängig, zum anderen Teil bzw. im Nabelschnurblut komplett caspaseunabhängig ist. Die caspaseunabhängige T-Zellproliferation fände dann trotz zVAD-FMK statt.

#### **5.2.4 Zur Wirkung von ch412**

Die Inkubation mit dem monoklonalen antiCD4-Antikörper ch412 führte analog zu vorhandenen Beschreibungen in der Literatur (Wang et al., 1994a, Wang et al., 1998, Orlikowsky et al., 1997b, Orlikowsky et al., 2001, Badley et al., 1997, Choy et al., 1993, Rep et al., 1997) zu einer Deletion der CD4 T-Zellen, ohne das Überleben von CD8 T-Zellen, von anderen Lymphozyten oder von Makrophagen zu beeinträchtigen (siehe Abb. 4.15 und Tabelle 4.9 bzw. 4.11). Die beobachteten Herabregulationen von CD4, CD3 und CD28 auf den CD4 T-

Zellen (vgl. Tabelle 4.10) waren ebenfalls vorbeschrieben (Wang et al., 1998, Mittler & Hoffmann, 1989, Orlikowsky et al., 1997b). Sie gelten als CD95-abhängig (Orlikowsky et al., 1997b).

Im Gegensatz zur T-Zelldeletion durch OKT3 (vergleiche 5.2.3) vermochte zVAD-FMK die CD4 T-Zellapoptose durch ch412 nur um etwa 50% zu reduzieren (vgl. Abb. 4.15). Die Herabregulation von CD4 und CD3 konnte zVAD-FMK zumindest im Erwachsenenblut um 40% vermindern, während die CD28-Herabregulation gar nicht verhindert werden konnte (siehe Tabelle 4.10). Wie bei der OKT3-Stimulation erfolgt die Zerstörung der CD4 T-Zellen durch ch412 makrophagenabhängig durch ADCC. Sie verläuft zumindest teilweise über CD95-getriggerte Apoptoseinduktion in den CD4 T-Zellen (Choy et al., 1993, Wang et al., 1994a, Oyaizu et al., 1997, Orlikowsky et al., 1997a, Oyaizu et al., 1994, Tateyama et al., 2000, siehe auch 3.7.3). Die verminderte CD4 T-Zelldeletion durch zVAD-FMK könnte wie bei der OKT3-Stimulation darauf gründen, dass die Wirkungsvermittlung durch die Apoptose der Makrophagen beeinträchtigt ist. Arnoult et al., 2003 fanden ebenfalls eine durch zVAD-FMK nur teilweise gehemmte CD4 T-Zellapoptose in SIV-infizierten Rhesusaffen. (Eine SIV-Infektion (englisch für "simian immunodeficiency virus") führt in Affen entsprechend der HIV-Infektion des Menschen zum Absterben der CD4 T-Zellen.) Analog zur OKT3-Stimulation ergeben sich zwei Hypothesen für unsere Ergebnisse: Entweder sind die Makrophagen in ihrer Funktion durch zVAD-FMK zahlenmäßig oder qualitativ eingeschränkt, oder die überlebenden Makrophagen können die ch412-Wirkung zwar voll vermitteln; die CD4 T-Zellapoptose durch ch412 verläuft aber z.T. über einen caspaseunabhängigen Weg, der durch eine (erfolgreiche) Caspasehemmung nicht beeinflusst werden kann. Die durch zVAD-FMK nicht oder nur teilweise gehemmten Rezeptorregulationen könnten ebenfalls caspaseunabhängig (durch andere Enzyme) bedingt und deshalb unsensibel für zVAD-FMK sein.

Bei den Makrophagen führte ch412 im Erwachsenenblut zu einer Herabregulation von CD14 um ca. 50% ohne gleichzeitige Zunahme der Annexin V- oder Propidiumiodid-Anfärbung (siehe Tabelle 4.11). Damit hatte die

CD14-Herabregulation hier – im Gegensatz zu den Ergebnissen von Heidenreich et al., 1997 - keine Auswirkung auf das Überleben der Makrophagen. Das könnte bedeuten, dass eine CD14-Herabregulation erst ab einer bestimmten Schwelle als Trigger für die Makrophagenapoptose fungiert oder eben doch kein Trigger, sondern nur ein Begleitphänomen der Makrophagenapoptose ist (vergleiche dazu 5.2.1).

### **5.2.5 Unterschiede zwischen adulten und neonatalen Zellen**

Zwischen den mononukleären Zellen im Nabelschnur- und Erwachsenenblut fanden sich bereits in den Kontrollproben einige Unterschiede: Abgesehen von einem geringeren Gehalt an CD8 T-Zellen und an B-Zellen im Nabelschnurblut (Tabelle 4.2; vgl. Giorgi et al., 1992), exprimierten die CD8 T-Zellen der Neugeborenen weniger kostimulierende CD28-Rezeptoren (siehe Tabelle 4.3). Die Expression von CD14 war auf Neugeborenen- und Erwachsenenmakrophagen vergleichbar (Abb. 4.6). Die neonatalen Makrophagen exprimierten aber bei einer insgesamt kleineren Anzahl HLA-DR-positiver Makrophagen sowohl signifikant weniger antigenpräsentierende MHC Klasse I und II-Moleküle als auch weniger kostimulatorische B7-Moleküle (vgl. Abb. 4.9 und 4.10). Diese Unterschiede wurden auch von Glover et al., 1987, El-Mohandes et al., 1995 bzw. Orlikowsky et al., 2003 berichtet. Die Makrophagen im Nabelschnurblut zeigten zwar eine tendenziell schwächere CD16-Expression, wiesen aber eine signifikant größere Fraktion CD16-positiver Makrophagen auf (Abb. 4.11), welche als vorwiegend zytotoxisch wirkende Subpopulation angesehen wird (siehe 1.4; Wang et al., 2001, Orlikowsky et al., 1996). Auf die makrophagenvermittelte OKT3-Stimulation (Chatenoud, 2003, Orlikowsky et al., 1996) reagierte das Nabelschnurblut mit einer im Vergleich zum Erwachsenenblut signifikant stärkeren T-Zelldeletion und geringeren Blastenbildung (vgl. Abb. 4.14), was die Ergebnisse von Orlikowsky et al., 2003 und Papadogiannakis et al., 1986 bestätigt. Orlikowsky et al., 2003 konnten zudem zeigen, dass die Nabelschnurmakrophagen ihre B7-Moleküle durch

OKT3 weniger stark heraufregulieren (können). Sie vermuteten, dass die beeinträchtigte Antwort des Nabelschnurbluts auf OKT3 primär durch eine im Vergleich zum Erwachsenenblut veränderte Makrophagenfunktion bedingt ist.

Was das Apoptoseverhalten von Makrophagen und Lymphozyten angeht, so fand sich bei den Zellen von Neugeborenen und Erwachsenen eine vergleichbar starke Spontanapoptose mit gleichen Prozentanteilen an Annexin V- und Propidiumiodid-positiven Zellen in den Kontrollen (vgl. Abb. 4.5 und 4.13). Allerdings waren im Nabelschnurblut nur wenige CD95-exprimierende Lymphozyten und tendenziell weniger CD95Ligand-exprimierende Makrophagen zu beobachten (Tabelle 4.4).

In ihrer Reaktion auf zVAD-FMK unterschieden sich die Makrophagen und Lymphozyten von Nabelschnur- und Erwachsenenblut nicht. Im Nabelschnurblut zeigte sich eine genauso starke Zellschrumpfung und Abnahme der Makrophagenzahl, eine vergleichbare Zunahme in der Anfärbung mit Annexin V bzw. Propidiumiodid und eine ebenso starke Herabregulation von CD14 (siehe Abb. 4.2 und 4.4 bis 4.6). Auch die Apoptose der neonatalen Makrophagen konnte durch Stimulation mit LPS nicht verhindert werden (vgl. Tabelle 4.5). Die kinetischen Verläufe dieser Ergebnisse über 24 Stunden waren identisch (Abb. 4.7). Wie im Erwachsenenblut konnte die T-Zelldeletion durch OKT3 und ch412 im Nabelschnurblut durch zVAD-FMK gehemmt werden (siehe Abb. 4.14 und 4.15). Allerdings wurde die schon in der Kontrolle niedrige Blastenbildung nach OKT3-Stimulation im Nabelschnurblut durch zVAD-FMK kaum vermindert (vgl. Abb. 4.14), woraus geschlossen werden könnte, dass die Blastenbildung hier komplett auf einem caspaseunabhängigen Weg abläuft, auf den zVAD-FMK keinen Einfluss hat (vergleiche dazu 5.2.3).

Zusammenfassend exprimierten die neonatalen Makrophagen in dieser Arbeit im Vergleich zu erwachsenen Zellen weniger antigenpräsentierende Moleküle und zeigten eine schwächer kostimulierende, aber stärker zytotoxische Wirkung auf die T-Zellen. Die veränderte Makrophagenfunktion könnte neben der

ineffektiveren Zytokinproduktion (Schibler et al., 1992, Wilson & Lewis, 1990, Lee et al., 1996, Maródi, 2001a, Maródi et al., 2001b, Chalmers et al., 1998) und dem geringeren Gehalt an CD8 T-Zellen mit zugleich schwächerer CD28-Expression für die weniger effektive T-Zellabwehr von Neugeborenen (Wilson & Lewis, 1990, Maródi et al., 1994) mitverantwortlich sein.

Hinsichtlich ihrer spontanen Apoptoseaktivität unterschieden sich Makrophagen und Lymphozyten von Neugeborenen und Erwachsenen aber trotz geringerer Expression von CD95 und CD95Ligand nicht. Auf zVAD-FMK reagierte das Nabelschnurblut bei gleicher Sensitivität wie das Erwachsenenblut mit einer spezifischen Apoptose der Makrophagen.

### **5.3 Schlussfolgerung**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Pancaspase-Inhibitor zVAD-FMK in Makrophagen Apoptose induziert und zu einer starken Herabregulation von CD14 führt. Beides konnte durch Stimulation der Makrophagen mit LPS nicht verhindert werden. Die Lymphozyten wurden durch den Caspase-Inhibitor weder im Überleben noch im Phänotyp beeinträchtigt. Makrophagenvermittelte T-Zellreaktionen durch OKT3 und ch412 wurden komplett oder zumindest teilweise gehemmt. Makrophagen und Lymphozyten aus Nabelschnur- und Erwachsenenblut unterschieden sich nicht in ihrer spontanen Apoptoserate oder ihrer Reaktion auf zVAD-FMK.

Das Apoptoseverhalten der Makrophagen scheint sich zumindest in Gegenwart von zVAD-FMK vom Verhalten anderer bisher untersuchter Zellarten zu unterscheiden. In ihnen konnte die Apoptose durch zVAD-FMK zwar nicht immer erfolgreich gehemmt werden, über eine Apoptoseinduktion durch zVAD-FMK (ohne Vorstimulation) wurde bei ihnen aber bisher nicht berichtet.

Der genaue Mechanismus der Apoptoseinduktion konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Jedoch spricht die Beobachtung des Makrophagenzelltods bei zwei verschiedenen Caspase-Inhibitoren(-Sets) für eine Bedeutung der

gleichzeitigen Hemmung aller Caspasen. Die Reaktion der Makrophagen auf andere Pancaspase-Inhibitoren bleibt zu untersuchen.

Prinzipiell ist die beschriebene Wirkung von zVAD-FMK auf die Makrophagen nicht direkt übertragbar auf andere Kulturbedingungen oder In-vivo-Verhältnisse. Die Möglichkeit einer Apoptoseinduktion in Makrophagen und eventuell auch in makrophagenverwandten Zellarten sollte jedoch bei zukünftigen Studien mit (Pan)Caspase-Inhibitoren beachtet werden. Das eingeschränkte Überleben der Makrophagen könnte die Ergebnisse einer therapeutischen Anwendung der Caspase-Inhibitoren beim Menschen beeinflussen.

Zudem stellt sich die Frage, ob bisherige Ergebnisse zur erfolgreichen Apoptosehemmung durch zVAD-FMK bei Lymphozyten in einigen Konstellationen, insbesondere im Tiermodell (z.B. Hotchkiss et al., 2000), durch eine beeinträchtigte Makrophagenfunktion mit fehlender (zytotoxischer) Interaktion bedingt sein könnten.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Caspasefamilie spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation und Ausführung der Apoptose. In der Forschung werden Caspase-Inhibitoren routinemäßig als Apoptosehemmstoffe eingesetzt. Der Pancaspase-Inhibitor zVAD-FMK wurde in der Vergangenheit erfolgreich dazu verwendet, die Apoptose verschiedener Zellarten in vitro und im Tiermodell zu blockieren wie z.B. die Apoptose von T-Zellen. Verhalten und Überleben der T-Zellen werden von antigenpräsentierenden Zellen, insbesondere den Makrophagen beeinflusst. In dieser Arbeit sollte die Wirkung von zVAD-FMK auf das Apoptoseverhalten der Makrophagen untersucht und die Hypothese hinterfragt werden, ob der Pancaspase-Inhibitor die Apoptose der T-Zellen indirekt über Einwirkung auf die Makrophagen beeinflusst. Außerdem sollten Unterschiede im Apoptoseverhalten zwischen Zellen von Neugeborenen und Erwachsenen aufgedeckt werden.

Es zeigte sich, dass zVAD-FMK spezifisch zur Apoptose der Makrophagen führte, die gleichzeitig ihre CD14-Expression stark herabregulierten. Eine Aktivierung der Makrophagen mit Lipopolysaccharid konnte die Apoptose nicht verhindern; ihr Zelltod durch OKT3-Stimulation wurde durch den Pancaspase-Inhibitor verstärkt. Dagegen blieben die Lymphozyten (T-, B-, NK-Zellen) sowohl im Phänotyp als auch im Überleben unbeeinträchtigt. Die T-Zelldeletion durch OKT3 oder ch412 konnte mit zVAD-FMK gehemmt werden. Gleichzeitig wurden aber auch die OKT3-induzierte T-Zellproliferation und die CD28-Aufregulation verringert, was wohl auf eine verminderte Wirkungsvermittlung durch die Makrophagen zurückzuführen ist. Ob die überlebenden Makrophagen durch zVAD-FMK nur zahlenmäßig oder auch in ihrer Funktion beeinträchtigt waren, kann nicht differenziert werden.

Makrophagen und Lymphozyten aus Nabelschnur- und Erwachsenenblut unterschieden sich weder in ihrer spontanen Apoptoseaktivität noch in ihrer Reaktion auf zVAD-FMK. Die neonatalen Makrophagen exprimierten jedoch weniger antigenpräsentierende Moleküle und zeigten eine stärker zytotoxische

sowie schwächer kostimulierende Wirkung. Diese Unterschiede könnten für die weniger effektive T-Zellabwehr von Neugeborenen mitverantwortlich sein.

Der genaue Mechanismus der Apoptoseinduktion in Makrophagen durch zVAD-FMK konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Eine CD95-getriggerte Apoptose scheint unwahrscheinlich, da weder CD95 noch CD95Ligand auf Makrophagen oder Lymphozyten reguliert wurden. Eine Interaktion des Caspase-Inhibitors mit anderen Zellmolekülen kann nicht ausgeschlossen werden. Die Tatsache aber, dass ein Absterben der Makrophagen und die starke CD14-Herabregulation auch bei einem Set aus Einzelinhibitoren, das die Caspasefamilie umfassend blockiert, beobachtet wurden, spricht dafür, dass die Makrophagenapoptose durch die gleichzeitige Hemmung aller Caspasen induziert wurde bzw. die Makrophagen durch die Caspase-Inhibition für andere Apoptosewege sensibilisiert wurden. Damit wäre eine basale Aktivität zumindest eines Teils der Caspasen für das Überleben der Makrophagen essentiell.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich das Apoptoseverhalten von Makrophagen in Gegenwart von zVAD-FMK vom Verhalten anderer bisher untersuchter Zellarten unterscheidet. Ein durch die Caspase-Hemmung eingeschränktes Überleben der Makrophagen und die daraus folgende Beeinflussung umgebender Zellen können möglicherweise das Ergebnis von therapeutisch beim Menschen eingesetzten Caspase-Inhibitoren beeinflussen.

---

## 7 LITERATUR

### 7.1 Literaturverzeichnis

- (1) *Acton RT (2001)*  
The Major Histocompatibility Complex  
In: Clinical Immunology – Principles and Practice  
(Herausgeber: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Kotzkin BL, Schroeder Jr HW)  
Mosby International Limited, London, 2. Aufl.: Section 1, Chapter 6
- (2) *Algeciras-Schimmich A, Barnhart BC, Peter ME (2002)*  
Apoptosis-independent functions of killer caspases  
Curr Opin Cell Biol 14: 721-726
- (3) *Altman JD, Lippolis JD (2001)*  
Cytotoxic T-cell Function  
In: Clinical Immunology – Principles and Practice  
(Herausgeber: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Kotzkin BL, Schroeder Jr HW)  
Mosby International Limited, London, 2. Aufl.: Section 2, Chapter 17
- (4) *Andree HAM, Reutelingsperger CPM, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems, GM (1990)*  
Binding of vascular anticoagulant  $\alpha$  (VAC  $\alpha$ ) to planar phospholipid bilayers  
J Biol Chem 265: 4923-4928
- (5) *Arnoult D, Petit F, Lelièvre JD, Lecossier D, Hance A, Monceaux V, Tsong Fang RH, Huntrel B, Ameisen JC, Estaquier J (2003)*  
Caspase-dependent and –independent T-cell death pathways in pathogenic simian immunodeficiency virus infection: relationship to disease progression  
Cell Death Differ 10: 1240-1252
- (6) *Badley AD, Dockrell D, Simpson M, Schut R, Lynch DH, Leibson P, Paya CV (1997)*  
Macrophage-dependent Apoptosis of CD4<sup>+</sup> T Lymphocytes from HIV-infected Individuals Is Mediated by FasL and Tumor Necrosis Factor  
J Exp Med 185: 55-64
- (7) *Banki K, Hutter E, Gonchoroff NJ, Perl A (1999)*  
Elevation of Mitochondrial Transmembrane Potential and Reactive Oxygen Intermediate Levels Are Early Events and Occur Independently from Activation of Caspases in Fas Signaling  
J Immunol 162: 1466-1479

- 
- (8) *Baumann S, Krueger A, Kirchhoff S, Krammer PH (2002)*  
Regulation of T cell Apoptosis during the Immune Response  
Curr Mol Med 2: 257-272
- (9) *Bazil V, Strominger JL (1991)*  
Shedding as a mechanism of downmodulation of CD14 on stimulated human monocytes  
J Immunol 147: 1567-1574
- (10) *Binder C, Schulz M, Hiddemann W, Oellerich M (1999)*  
Caspase-Activation and Induction of Inducible Nitric Oxide-Synthase during TNF $\alpha$ -triggered apoptosis  
Anticancer Res 19: 1715-1720
- (11) *Boatright KM, Salvesen GS (2003)*  
Mechanisms of caspase activation  
Curr Opin Cell Biol 15: 725-731
- (12) *Borner C, Monney L (1999)*  
Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine?  
Cell Death Differ 6: 497-507
- (13) *Bosisio D, Polentarutti N, Sironi M, Bernasconi S, Miyake K, Webb GR, Martin MU, Mantovani A, Muzio M (2002)*  
Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon- $\gamma$ : a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide  
Blood 99: 3427-3431
- (14) *Bour-Jordan H, Bluestone JA (2002)*  
CD28 Function: A Balance of Costimulatory and Regulatory Signals  
J Clin Immunol 22: 1-7
- (15) *Bøyum A (1974)*  
Separation of blood leucocytes, granulocytes and lymphocytes  
Tissue Antigens 4: 269-274
- (16) *Brooks CF, Moore M (1988)*  
Differential MHC class II expression on human peripheral blood monocytes and dendritic cells  
Immunology 63: 303-311
- (17) *Bryson YJ, Winter JS, Gard SE, Fischer TJ, Stiehm ER (1980)*  
Deficiency of immune interferon production by leukocytes of normal newborns  
Cell Immunol 55: 191-200

- 
- (18) *Budd RC, Fortner KA (2001)*  
T-Cell Development  
In: Clinical Immunology – Principles and Practice  
(Herausgeber: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Kotzkin BL, Schroeder Jr HW)  
Mosby International Limited, London, 2. Aufl.: Section 1, Chapter 8
- (19) *Büscher U, Chen F, Pitzten A, Menon R, Vogel M, Obladen M, Dudenhausen J (2000)*  
IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 and G-CSF in the diagnosis of early-onset neonatal infections  
J Perinat Med 28: 383-388
- (20) *Carreno BM, Collins M (2002)*  
The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and induction of immune responses  
Annu Rev Immunol 20: 29-53
- (21) *Caruso A, Licenziati S, Canaris AD, Cantalamessa A, Fiorentini S, Ansenda S, Ricotta D, Dima F, Malacarne F, Balsari A, Turano A (1998)*  
Contribution of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T cells to CD3<sup>+</sup> Lymphocyte Homeostasis during the Natural Course of HIV-1 Infection  
J Clin Invest 101: 137-144
- (22) *Cauwels A, Janssen B, Waeytens A, Cuvelier C, Brouckaert P (2003)*  
Caspase inhibition causes hyperacute tumor necrosis factor-induced shock via oxidative stress and phospholipase A2  
Nat Immunol 4: 387-393
- (23) *Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durant I, Banchereau J (1994)*  
Activation of human dendritic cells through CD40 crosslinking  
J Exp Med 180: 1263-1272
- (24) *Chace JH, Cowdery JS, Field EH (1994)*  
Effect of Anti-CD4 on CD4 Subsets. I. Anti-CD4 Preferentially Deletes Resting, Naïve CD4 Cells and Spares Activated CD4 Cells  
J Immunol 152: 405-412
- (25) *Chalmers IMH, Janossy G, Contreras M, Navarrete C (1998)*  
Intracellular Cytokine Profile of Cord and Adult Blood Lymphocytes  
Blood 92: 11-18
- (26) *Chang TW, Gingras SP (1981)*  
OKT3 monoclonal antibody inhibits cytotoxic T lymphocyte mediated cell lysis  
Int J Immunopharmac 3: 183-186

- 
- (27) *Chatenoud L (2003)*  
CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside  
Nature Reviews: Immunol 3: 123-132
- (28) *Chen M, Wang J (2002)*  
Initiator caspases in apoptosis signaling pathways  
Apoptosis 7: 313-319
- (29) *Choy EHS, Adjaye J, Forrest L, Kingsley GH, Panayi GS (1993)*  
Chimaeric anti-CD4 monoclonal antibody cross-linked by monocyte Fcγ receptor mediates apoptosis of human CD4 lymphocytes  
Eur J Immunol 23: 2676-2681
- (30) *Concha NO, Abdel-Meguid SS (2002)*  
Controlling apoptosis by inhibition of caspases  
Curr Med Chem 9: 713-726
- (31) *Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu SW, Dawson TM, Dawson VL, Park DS, Kroemer G, Slack RS (2002)*  
Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death  
J Cell Biol 158: 507-517
- (32) *Cruse JM, Lewis RE (1999)*  
Atlas of Immunology  
CRC Press LLC, Boca Raton
- (33) *Daemen MA, van't Veer C, Denecker G, Heemskerk VH, Wolfs TG, Clauss M, Vandenabeele P, Buurman WA (1999)*  
Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation  
J Clin Invest 104: 541-549
- (34) *De Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Rocarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE (1991)*  
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 174: 915-924
- (35) *Deas O, Dumont C, MacFarlane M, Rouleau M, Heibb C, Harper F, Hirsch F, Charpentier B, Cohen GM, Senik A (1998)*  
Caspase-independent cell death induced by anti-CD2 or staurosporine in activated human peripheral T lymphocytes  
J Immunol 161: 3375-3383
- (36) *Degterev A, Boyce M, Yuan J (2003)*  
A decade of caspases  
Oncogene 22: 8543-8567

- 
- (37) *Denecker G, Declercq W, Geuijen CAW, Boland A, Benabdillah R, Van Gorp M, Sory MP, Vandenabeele P, Cornelis GR (2001)*  
Yersinia enterocolitica YopP-induced Apoptosis of Macrophages Involves the Apoptotic Signaling Cascade Upstream of Bid  
J Biol Chem 276: 19706-19714
- (38) *Devitt A, Moffat OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL, Gregory CD (1998)*  
Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells  
Nature 392: 505-509
- (39) *Ding L, Linsley PS, Huang LY, Germain RN, Shevach EM (1993)*  
IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the upregulation of B7 expression  
J Immunol 151: 1224-1234
- (40) *Dive C, Gregory CD, Phipps DJ, Evans DL, Milner AE, Wyllie AH (1992)*  
Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry  
Biochim Biophys Acta 1133: 275-285
- (41) *Dockrell DH, Lee M, Lynch DH, Read RC (2001)*  
Immune-Mediated Phagocytosis and Killing of Streptococcus pneumoniae Are Associated with Direct and Bystander Macrophage Apoptosis  
J Infect Dis 184: 713-722
- (42) *Drenou B, Blancheteau V, Burgess DH, Fauchet R, Charron DJ, Mooney NA (1999)*  
A caspase-independent pathway of MHC class II antigen-mediated apoptosis of human B lymphocytes  
J Immunol 163: 4115-4124
- (43) *Dudhane A, Conti B, Orlikowsky T, Wang ZQ, Mangla N, Gupta A, Wormser GP, Hoffmann MK (1996a)*  
Monocytes in HIV type 1-infected individuals lose expression of costimulatory B7 molecules and acquire cytotoxic activity  
AIDS Res Hum Retroviruses 12: 885 - 892
- (44) *Dudhane A, Wang ZQ, Orlikowsky T, Gupta A, Wormser GP, Horowitz H, Kufer P, Hoffmann MK (1996b)*  
AIDS Patient Monocytes Target CD4 T Cells for Cellular Conjugate Formation and Deletion through the Membrane Expression of HIV-1 Envelope Molecules  
AIDS Res Hum Retroviruses 12: 893-899

- 
- (45) *Eagar TN, Tompkins SM, Miller SD (2001)*  
Helper T-cell Subsets and Control of the Inflammatory Response  
In: Clinical Immunology – Principles and Practice  
(Herausgeber: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Kotzkin BL, Schroeder Jr HW)  
Mosby International Limited, London, 2. Aufl.: Section 2, Chapter 16
- (46) *Eckert R (1991)*  
Trennung von Zellen des Immunsystems  
In: Immunologische Arbeitsmethoden (Herausgeber Friemel, H.)  
Gustav Fischer, Jena, 4.Aufl.: 286–309
- (47) *Elkon KB (2001)*  
Immunologic Tolerance and Apoptosis  
In: Clinical Immunology – Principles and Practice  
(Herausgeber: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Kotzkin BL, Schroeder Jr HW)  
Mosby International Limited, London, 2. Aufl.: Section 1, Chapter 11
- (48) *El-Mohandes AAE, Rivas RA, Kiang E, Wahl LM, Katona IM (1995)*  
Membrane Antigen and Ligand Receptor Expression on Neonatal Monocytes  
Biol Neonate 68: 308-317
- (49) *Estaquier J, Ameisen JC (1997)*  
A Role for T-Helper Type-1 and Type-2 Cytokines in the Regulation of Human Monocyte Apoptosis  
Blood 90: 1618-1625
- (50) *Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM (1992)*  
Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages  
J Immunol 148: 2207-2216
- (51) *Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Wescott JY, Henson PM (1998)*  
Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub> and PAF  
J Clin Invest 101: 890-898
- (52) *Fadok VA, Bratton D, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RAB, Henson PM (2000)*  
A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells  
Nature 405: 85-90

- 
- (53) *Farber A, Connors JP, Friedlander RM, Wagner RJ, Powell RJ, Cronenwett JL (1999)*  
A specific inhibitor of apoptosis decreases tissue injury after intestinal ischemia-reperfusion in mice  
J Vas Surg 30: 752-760
- (54) *Fukuzuka K, Rosenberg JJ, Gaines GC, Edwards CK 3<sup>rd</sup>, Clare-Salzler M, MacKay SL, Moldawer LL, Copeland EM 3<sup>rd</sup>, Mozingo DW (1999)*  
Caspase-3-dependent organ apoptosis early after burn injury  
Ann Surg 229: 851-858
- (55) Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry NA (1998)  
Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors  
J Biol Chem 273: 32608-32613
- (56) *Giorgi JV, Kesson AM, Chou CC (1992)*  
Immunodeficiency and Infectious Diseases  
In: Manual of Clinical Laboratory Immunology  
(Herausgeber: Rose NR, de Macario EC, Fahy JL, Friedman H, Penn GM)  
American Society of Microbiology, Washington DC, 4. Aufl.: 174-180
- (57) *Girndt M, Sester U, Kaul H, Hüniger F, Köhler H (1998)*  
Glucocorticoids inhibit activation-dependent expression of costimulatory molecule B7-1 in human monocytes  
Transplantation 66: 370-375
- (58) *Glover DM, Brownstein D, Burchett S, Larsen A, Wilson CB (1987)*  
Expression of HLA class II antigens and secretion of interleukin-1 by monocytes and macrophages from adults and neonates  
Immunology 67: 195-201
- (59) *Gregory CD (2000)*  
CD14-dependent clearance of apoptotic cells: relevance to the immune system  
Curr Opin Immunol 12: 27-34
- (60) *Hara H, Friedlander RM, Gagliardini V, Ayata C, Fink K, Huang Z, Shimizu-Sasamata M, Yuang J, Moskowitz MA (1997)*  
Inhibition of interleukin 1 beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage  
Proc Natl Acad Sci USA 94: 2007-2012
- (61) *Hathcock KS, Laszlo G, Pucillo C, Linsley P, Hodes RJ (1994)*  
Comparative Analysis of B7-1 and B7-2 Costimulatory Ligands: Expression and Function  
J Exp Med 180: 631-640

- 
- (62) *Heidenreich S, Schmidt M, August C, Cullen P, Rademaekers A, Pauels HG (1997)*  
Regulation of Human Monocyte Apoptosis by the CD14 Molecule  
J Immunol 159: 3178-3188
- (63) *Hengartner MO (2000)*  
The biochemistry of apoptosis  
Nature 407: 770-776
- (64) *Hotchkiss RS, Chang KC, Swanson PE, Tinsley KW, Hui JJ, Klender P, Xanthoudakis S, Roy S, Black C, Grimm E, Aspiotis R, Han Y, Nicholson DW, Karl IE (2000)*  
Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte  
Nat Immunol 1: 496-501
- (65) *Hunot S, Flavell RA (2001)*  
Apoptosis: Death of a Monopoly?  
Science 292: 865-866
- (66) *Hur J, Kang MK, Park JY, Lee SY, Bae YS, Lee SH, Park YM, Kwak JY (2003)*  
Pro-apoptotic effect of high concentrations of histamine on human neutrophils  
Int Immunopharmacol 3: 1491-1502
- (67) *Iwai K, Miyawaki T, Takizawa T, Konno A, Ohta K, Yachie A, Seki H, Taniguchi N (1994)*  
Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes and neutrophils  
Blood 84: 1201-1208
- (68) *Janeway CA Jr., Bottomly K (1994)*  
Signals and signs for lymphocyte responses  
Cell 76: 275-285
- (69) *Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ (2001)*  
Immunobiology: the immune system in health and disease  
Garland Publishing, New York, 5.Auflage
- (70) *Jones SA, Butler RN, Sanderson IR, Wilson JW (2004)*  
The effect of specific caspase inhibitors on TNF- $\alpha$  and butyrate-induced apoptosis of intestinal epithelial cells  
Exp Cell Res 292: 29-39
- (71) *Joyner JL, Augustine NH, Taylor KA, Di Giorgio G, Fusilli S, Zendoli F, Carotenuto M (2000)*  
Effects of group B streptococci on cord and adult mononuclear cell interleukin-12 and interferon- $\gamma$  mRNA accumulation and protein secretion  
J Infect Dis 182: 974-977

- 
- (72) *Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CYJ, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HYM, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zúniga-Pflücker JC, Kroemer G, Penninger JM (2001)*  
Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death  
Nature 410: 549-554
- (73) *Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C, Santacrose R, Di Corcia MG, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacrose S, Simone S, Bucci R, Farber E (2002)*  
Cell death: Apoptosis versus necrosis (Review)  
Int J Oncol 21: 165-170
- (74) *Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM (1997)*  
Medizinische Mikrobiologie  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 9. Auflage
- (75) *Kennedy NJ, Kataoka T, Tschopp J, Budd RC (1999)*  
Caspase activation is required for T cell proliferation  
J Exp Med 190: 1891-1895
- (76) *Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972)*  
Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics  
Br J Cancer 26: 239-257
- (77) *Kerr JFR, Gobe GC, Winterford CM, Harmon BV (1995)*  
Anatomical methods in cell death  
Methods Cell Biol 46: 1-27
- (78) *Kiener PA, Davis PM, Starling GC, Mehlin C, Klebanoff SJ, Ledbetter JA, Liles WC (1997)*  
Differential Induction of Apoptosis by Fas-Fas Ligand Interactions in Human Monocytes and Macrophages  
J Exp Med 185: 1511-1516
- (79) *Kim SO, Ono K, Han J (2001)*  
Apoptosis by pan-caspase inhibitors in lipopolysaccharide-activated macrophages  
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 281: L1095-L1105
- (80) *Kim SO, Ono K, Tobias PS, Han J (2003)*  
Orphan Nuclear Receptor Nur77 Is Involved in Caspase-independent Macrophage Cell Death  
J Exp Med 197: 1441-1452

- (81) *Kohl S, West S, Loo LS (1988)*  
Defects in interleukin-2 stimulation of neonatal natural killer cytotoxicity to herpes simplex virus-infected cells  
J Pediatr 112: 976-981
- (82) *Komoriya A, Packard BZ, Brown MJ, Wu ML, Henkart PA (2000)*  
Assessment of Caspase Activities in Intact Apoptotic Thymocytes Using Cell-permeable Fluorogenic Caspase Substrates  
J Exp Med 191: 1819-1828
- (83) *Koopman G, Reutelingsperger CPM, Kuijten GAM, Keehnen RMJ, Pals ST, van Oers MHJ (1994)*  
Annexin V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on B Cells Undergoing Apoptosis  
Blood 84: 1415-1420
- (84) *Koretzky GA, Peterson EJ (2001)*  
T-Cell Activation and Inactivation  
In: Clinical Immunology – Principles and Practice  
(Herausgeber: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Kotzkin BL, Schroeder Jr HW)  
Mosby International Limited, London, 2. Aufl.: Section 1, Chapter 10
- (85) *Krammer PH (2000)*  
CD95's deadly mission in the immune system  
Nature 407: 789-795
- (86) *Kung P, Goldstein G, Reinherz EL, Schlossman SF (1979)*  
Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens  
Science 206: 347-349
- (87) *Landmann R, Ludwig C, Obrist R, Obrecht JP (1991)*  
Effect of Cytokines and Lipopolysaccharide on CD14 Antigen Expression in Human Monocytes and Macrophages  
J Cell Biochemistry 47: 317-329
- (88) *Landmann R, Knopf HP, Link S, Sansano S, Schuhmann R, Zimmerli W (1996)*  
Human Monocyte CD14 Is Upregulated by Lipopolysaccharide  
Infect Immun 64: 1762-1769
- (89) *Lazaron V, Dunn DL (2002)*  
Molecular Biology of Endotoxin Antagonism  
World J Surg 26: 790-798

- 
- (90) *Lee SM, Suen Y, Chang L, Bruner V, Qian J, Indes J, Knoppel E, van de Ven C, Cairo MS (1996)*  
Decreased Interleukin-12 (IL-12) From Activated Cord Versus Adult Peripheral Blood Mononuclear Cells and Upregulation of Interferon- $\gamma$ , Natural Killer, and Lymphokine-Activated Killer Activity by IL-12 in Cord Blood Mononuclear Cells  
Blood 88: 945-954
- (91) *Leite-de-Moraes MC, Herbelin A, Gouarin C, Koezuka Y, Schneider E, Dy M (2000)*  
Fas/Fas Ligand Interactions Promote Activation-Induced Cell Death of NK T Lymphocytes  
J Immunol 165: 4367-4371
- (92) *Levin S, Bucci TJ, Cohen SM, Fix AS, Hardisty JF, Le Grand EK, Maronpot RR, Trump BF (2002)*  
The nomenclature of cell death: recommendations of an ad hoc Committee of the Society of Toxicologic Pathologists  
Toxicol Pathol 27: 484-490
- (93) *Lewis DE, Rickman WJ (1992)*  
Methodology and Quality Control for Flow Cytometry  
In: Manual of Clinical Laboratory Immunology  
(Herausgeber: Rose NR, de Macario EC, Fahy JL, Friedman H, Penn GM)  
American Society of Microbiology, Washington DC, 4. Aufl.: 164-173
- (94) *Lewis DE, Tang DSN, Adu-Oppong A, Schober W, Rodgers JR (1994)*  
Anergy and Apoptosis in CD8<sup>+</sup> T Cells from HIV-Infected Persons  
J Immunol 153: 412-420
- (95) *Lewis DE, Harriman GR (2001)*  
Cells and Tissues of the Immune System  
In: Clinical Immunology – Principles and Practice  
(Herausgeber: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Kotzkin BL, Schroeder Jr HW)  
Mosby International Limited, London, 2. Aufl.: Section 1, Chapter 2
- (96) *Lewis LL, Jackson AL (1992)*  
Monoclonal Antibodies: Differentiation Antigens Expressed on Leukocytes  
In: Manual of Clinical Laboratory Immunology  
(Herausgeber: Rose NR, de Macario EC, Fahy JL, Friedman H, Penn GM)  
American Society of Microbiology, Washington DC, 4. Aufl.: 157-163
- (97) *Li M, Oua VO, Guegan C, Chen M, Jackson-Lewis V, Andrews LJ, Olszewski AJ, Stieg PE, Lee JP, Przedborski S, Friedlander RM (2000)*  
Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model  
Science 288: 335-339

- 
- (98) *Liu CY, Takemasa A, Liles WC, Goodman RB, Jonas M, Rosen H, Chi E, Winn RK, Harlan JM, Chuang PI (2003)*  
Broad-spectrum caspase inhibition paradoxically augments cell death in TNF- $\alpha$ -stimulated neutrophils  
*Blood* 101: 295-304
- (99) *Lockshin RA, Zakeri Z (2002)*  
Caspase-independent cell deaths  
*Curr Opin Cell Biol* 14: 727-733
- (100) *Loddick SA, MacKenzie A, Rothwell NJ (1996)*  
An ICE inhibitor, z-VAD-DCB attenuates ischaemic brain damage in the rat  
*Neuroreport* 7: 1465-1468
- (101) *Lüschen S, Ussat S, Scherer G, Kabelitz D, Adam-Klages S (2000)*  
Sensitization to Death Receptor Cytotoxicity by Inhibition of Fas-associated Death Domain Protein (FADD)/Caspase Signaling  
*J Biol Chem* 275: 24670-24678
- (102) *Majno G, Joris I (1995)*  
Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death  
*Am J Path* 146: 3-15
- (103) *Maliszewski CR, Wright SD (1991)*  
CD14 and Immune Response to Lipopolysaccharide  
*Science* 252: 1321-1322
- (104) *Mangan DF, Welch GR, Wahl SM (1991a)*  
Lipopolysaccharide, Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  Prevent Programmed Cell Death (Apoptosis) in Human Peripheral Blood Monocytes  
*J Immunol* 146: 1541-1546
- (105) *Mangan DF, Wahl SM (1991b)*  
Differential Regulation of Human Monocyte Programmed Cell Death (Apoptosis) by Chemotactic Factors and Pro-Inflammatory Cytokines  
*J Immunol* 147: 3408-3412
- (106) *Marchant A, Duchow J, Delville JP, Goldman M (1992)*  
Lipopolysaccharide induces up-regulation of CD14 molecule on monocytes in human whole blood  
*Eur J Immunol* 22: 1663-1665
- (107) *Maródi L, Kaposzta R, Campbell DE, Polin RA, Csongor J, Johnston RB (1994)*  
Candidacidal mechanisms in the human neonate: impaired IFN $\gamma$  activation in newborn infants  
*J Immunol* 153: 5643-5649

- 
- (108) *Maródi L (2001a)*  
IL-12 and IFN $\gamma$  Deficiencies in Human Neonates. A review (2001)  
*Pediatr Res* 49: 316
- (109) *Maródi L, Goda K, Palicz A, Szabó G (2001b)*  
Cytokine receptor signalling in neonatal macrophages: defective STAT-1 phosphorylation in response to stimulation with IFN $\gamma$   
*Clin Exp Immunol* 126: 456-460
- (110) *Martin SJ, Reutelingsperger CPM, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RCAA, LaFace DM, Green DR (1995)*  
Early Redistribution of Plasma Membrane Phosphatidylserine Is a General Feature of Apoptosis Regardless of the Initiating Stimulus: Inhibition by Overexpression of Bcl-2 and Abl  
*J Exp Med* 182: 1545-1556
- (111) *Marwitz PA, Van Arkel-Vigna E, Rijkers GT, Zegers BJM (1988)*  
Expression and modulation of cell surface determinants on human adult and neonatal monocytes  
*Clin Exp Immunol* 72: 260-266
- (112) *Mason D, André P, Bensussan A, Buckley C, Civin C, Clark E, de Haas M, Goyert S, Hadam M, Hart D, Hořejší V, Meuer S, Morrissey J, Schwartz-Albiez R, Shaw S, Simmons D, Uguccioni M, van der Schoot E, Vivier E, Zola H (2001)*  
CD antigens 2001  
*Immunology* 103: 401-406
- (113) *Mittler RS, Hoffmann MK (1989)*  
Synergism Between HIV gp120 and gp120-Specific Antibody in Blocking Human T Cell Activation  
*Science* 245: 1380-1382
- (114) *Nagahara Y, Ikekita M, Shinomiya T (2000)*  
Immunosuppressant FTY720 Induces Apoptosis by Direct Induction of Permeability Transition and Release of Cytochrome c from Mitochondria  
*J Immunol* 165: 3250-3259
- (115) *Newton K, Strasser A (2003)*  
Caspases signal not only apoptosis but also antigen-induced activation in cells of the immune system  
*Genes Dev* 17: 819-825
- (116) *Nicholson DW (2000)*  
From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents  
*Nature* 407: 810-816

- 
- (117) *Niinobu T, Fukuo K, Yasuda O, Tsubakimoto M, Mogi M, Nishimaki H, Morimoto S, Ogihara T (2000)*  
Negative feedback regulation of activated macrophages via Fas-mediated apoptosis  
*Am J Physiol Cell Physiol* 279: 504-509
- (118) *Op den Kamp JAF (1979)*  
Lipid asymmetry in membranes  
*Annu Rev Biochem* 48: 47-71
- (119) *Orlikowsky T, Wang ZQ, Dudhane A, Horowitz H, Conti B, Hoffmann M (1996)*  
The Cell Surface Marker Phenotype of Macrophages from HIV-1-Infected Subjects Reflects an IL-10-Enriched and IFN- $\gamma$ -Deprived Donor Environment  
*J Interferon Cytokine Res* 16: 957-962
- (120) *Orlikowsky T, Wang ZQ, Dudhane A, Horowitz H, Conti B, Hoffmann MK (1997a)*  
Two distinct pathways of human macrophage differentiation are mediated by interferon- $\gamma$  and interleukin-10  
*Immunology* 91: 104-108
- (121) *Orlikowsky T, Wang ZQ, Dudhane A, Horowitz H, Riethmüller G, Hoffmann MK (1997b)*  
Cytotoxic Monocytes in the Blood of HIV Type 1-Infected Subjects Destroy Targeted T Cells in a CD95-Dependent Manner  
*AIDS Res Hum Retroviruses* 13: 953-960
- (122) *Orlikowsky T, Wang ZQ, Dudhane A, Mittler R, Trejo V, Dannecker GE, Niethammer D, Hoffmann MK (1998)*  
Elevated major histocompatibility complex class I expression protects T cells from antibody- and macrophage-mediated deletion  
*Immunology* 95: 437-442
- (123) *Orlikowsky T, Dannecker GE, Wang Z, Horowitz H, Niethammer D, Hoffmann MK (1999)*  
Activation or destruction of T cells via macrophages  
*Pathobiology* 67: 298-301
- (124) *Orlikowsky TW, Wang ZQ, Dudhane A, Dannecker GE, Niethammer D, Wormser GP, Hoffmann MK, Horowitz HW (2001)*  
Dexamethasone Inhibits CD4 T Cell Deletion Mediated by Macrophages from Human Immunodeficiency Virus-Infected Persons  
*J Infect Dis* 184: 1328-1330

- 
- (125) *Orlikowsky TW, Spring B, Dannecker GE, Niethammer D, Poets CF, Hoffmann MK (2003)*  
Expression and Regulation of B7 Family Molecules on Macrophages (M $\Phi$ ) in Preterm and Term Neonatal Cord Blood and Peripheral Blood of Adults  
*Clin Cytometry* 53B: 40-47
- (126) *O'Shea JJ, Frucht DM, Duckett CS (2001)*  
Cytokines and Cytokine Receptors  
In: *Clinical Immunology – Principles and Practice*  
(Herausgeber: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Kotzkin BL, Schroeder Jr HW)  
Mosby International Limited, London, 2. Aufl.: Section 1, Chapter 12
- (127) *Oyaizu N, McCloskey TW, Than S, Hu R, Kalyanaraman VS, Pahwa S (1994)*  
Cross-Linking of CD4 Molecules Upregulates Fas Antigen Expression in Lymphocytes by Inducing Interferon- $\gamma$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Secretion  
*Blood* 84: 2622-2631
- (128) *Oyaizu N, Adachi Y, Hashimoto F, McCloskey TW, Hosaka N, Kayagaki N, Yagita H, Pahwa S (1997)*  
Monocytes Express Fas Ligand upon CD4 Cross-Linking and Induce CD4<sup>+</sup> T Cells Apoptosis. A Possible Mechanism of Bystander Cell Death in HIV infection  
*J Immunol* 158: 2456-2463
- (129) *Papadogiannakis N, Johnsen SA, Olding LB (1986)*  
Monocyte-regulated Hyporesponsiveness of Human Cord Blood Lymphocytes to OKT3-mono-clonal-antibody-induced Mitogenesis  
*Scan J Immunol* 23: 91-99
- (130) *Perera LP, Waldmann TA (1998)*  
Activation of human monocytes induces differential resistance to apoptosis with rapid down regulation of caspase-8/FLICE  
*Immunology* 95: 14308-14313
- (131) *Rathmell JC, Thompson CB (1999)*  
The Central Effectors of Cell Death in the Immune System  
*Annu Rev Immunol* 17: 781-828
- (132) *Rep MHG, van Oosten BW, Roos MTL, Adèr HJ, Polman CH, van Lier RAW (1997)*  
Treatment with Depleting CD4 Monoclonal Antibody Results in a Preferential Loss of Circulating Naive T Cells but Does Not Affect IFN- $\gamma$  Secreting TH1 Cells in Humans  
*J Clin Invest* 99: 2225-2231

- 
- (133) *Reutelingsperger CPM, Hornstra G, Hemker HC (1985)*  
Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord  
Eur J Biochem 151: 625-629
- (134) *Rodriguez I, Matsuura K, Ody C, Nagata S, Vassalli P (1996)*  
Systemic injection of a tripeptide inhibits the intracellular activation of CPP32-like proteases in vivo and fully protects mice against Fas-mediated fulminant liver destruction and death  
J Exp Med 184: 2067-2072
- (135) *Roitt I, Brostoff J, Male D (2001)*  
Immunology  
Mosby, Edinburgh, 6. Auflage
- (136) *Rowen L, Smith CW, Edwards HS (1995)*  
Group B streptococci elicit leukotriene B4 and interleukin-8 from human monocytes: neonates exhibit a diminished response  
J Infect Dis 172: 420-426
- (137) *Ruckdeschel K, Mannel O, Schröttner P (2002)*  
Divergence of Apoptosis-Inducing and Preventing Signals in Bacteria-Faced Macrophages Through Myeloid Differentiation Factor 88 and IL-1 Receptor-Associated Kinase Members  
J Immunol 168: 4601-6611
- (138) *Sadowski-Debbing K, Coy JF, Mier W, Hug H, Los M (2002)*  
Caspases – their role in apoptosis and other physiological processes as revealed by knock-out studies  
Arch Immunol Ther Exp 50: 19-34
- (139) *Salmena L, Lemmers B, Hakem A, Matysiak-Zablocki E, Murakami K, Au PYB, Berry DM, Tamblyn L, Shehabeldin A, Migon E, Wakeham A, Bouchard D, Yeh WC, McGlade JC, Ohashi PS, Hakem R (2003)*  
Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity  
Genes Dev 17: 883-895
- (140) *Salomon B, Bluestone JA (2001)*  
Complexities of CD28 / B7 : CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation  
Annu Rev Immunol 19: 225-252
- (141) *Sarin A,, Wu ML, Henkart PA (1996)*  
Different ICE-family protease requirements for the apoptotic death of T lymphocytes triggered by diverse stimuli  
J Exp Med 184: 2445-2450

- 
- (142) *Sarin A, Williams MS, Alexander-Miller MA, Berzofsky JA, Zacharchuk CM, Henkart PA (1997)*  
Target cell lysis by CTL granule exocytosis is independent of ICE/Ced-3 family proteases  
*Immunity* 6: 209-215
- (143) *Savill J, Fadok V (2000)*  
Corpse clearance defines the meaning of cell death  
*Nature* 407: 784-788
- (144) *Schibler KR, Liechty KW, White WL, Rothstein G, Christensen RD (1992)*  
Defective Production of Interleukin-6 by Monocytes: A Possible Mechanism Underlying Several Host Defense Deficiencies of Neonates  
*Pediatr Res* 31: 18-21
- (145) *Schmittl A, Scheibenbogen C, Keilholz U (1995)*  
Lipopolysaccharide effectively up-regulates B7-1 (CD80) expression and costimulatory function of human monocytes  
*Scand J Immunol* 42: 701-704
- (146) *Schroeder HW Jr, Radbruch A, Berek C (2001)*  
B-Cell Development and Differentiation  
In: *Clinical Immunology – Principles and Practice*  
(Herausgeber: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Kotzkin BL, Schroeder Jr HW)  
Mosby International Limited, London, 2. Aufl.: Section 1, Chapter 9
- (147) *Schulz JB, Weller M, Moskowitz MA (1999)*  
Caspases as Treatment Targets in Stroke and Neurodegenerative Diseases  
*Ann Neurol* 45: 421-429
- (148) *Seaman WE (2001)*  
Natural Killer Cells and Natural Killer T Cells  
In: *Clinical Immunology – Principles and Practice*  
(Herausgeber: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Kotzkin BL, Schroeder Jr HW)  
Mosby International Limited, London, 2. Aufl.: Section 2, Chapter 18
- (149) *Sell S, Max EE (2001)*  
*Immunology, Immunopathology and Immunity*  
ASM Press, Washington D.C., 6. Auflage
- (150) *Shapiro HM (1995)*  
*Practical Flow Cytometry*  
Wiley-Liss, New York, 3. Auflage: 272, 307

- 
- (151) *Shaw E (1990)*  
Cysteinyl proteinases and their selective inactivation  
Adv Enzymol 63: 271-346
- (152) *Siegel RM, Ka-Ming Chan F, Chun HJ, Lenardo MJ (2000)*  
The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity  
Nature Immunology 1: 469-474
- (153) *Skowron G, Cole BF, Zhang DL, Accetta G, Yen-Lieberman B (1997)*  
gp120-directed antibody-dependent cellular cytotoxicity as a major determinant of the rate of decline in CD4 percentage in HIV-1 disease  
AIDS 11: 1807-1814
- (154) *Smith PD, Smythies LE, Wahl SM (2001)*  
Macrophage Effector Function  
In: Clinical Immunology – Principles and Practice  
(Herausgeber: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Kotzkin BL, Schroeder Jr HW)  
Mosby International Limited, London, 2. Aufl.: Section 2, Chapter 19
- (155) *Song R, Mahidhara RS, Zhou Z, Hoffman RA, Seol DW, Flavell RA, Billiar TR, Otterbein LE, Choi AMK (2004)*  
Carbon Monoxide Inhibits T Lymphocyte Proliferation via Caspase-Dependent Pathway  
J Immunol 172: 1220-1226
- (156) *Tateyama M, Oyaizu N, McCloskey TW, Than S, Pahwa S (2000)*  
CD4 T lymphocytes are primed to express Fas ligand by CD4 cross-linking and to contribute to CD8 T-cell apoptosis via Fas/FasL death signaling pathway  
Blood 96: 195-202
- (157) *Um HD, Orenstein JM, Wahl SM (1996)*  
Fas Mediates Apoptosis in Human Monocytes by a Reactive Oxygen Intermediate Dependent Pathway  
J Immunol 156: 3469-3477
- (158) *Van Cruchten S, Van den Broeck W (2002)*  
Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, oncosis and Necrosis  
Anat Histol Embryol 31: 214-223
- (159) *Van de Winkel JGJ, Capel PJA (1993)*  
Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications  
Immunol Today 14: 215-221

- 
- (160) *Van Wauwe JP, De Mey JR, Goossens JG (1980)*  
OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties  
J Immunol 124: 2708-2713
- (161) *Verhoven B, Krahling S, Schlegel RA, Williamson P (1999)*  
Regulation of phosphatidylserine exposure and phagocytosis of apoptotic T lymphocytes  
Cell Death Differ 6: 262-270
- (162) *Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995)*  
A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V  
J Immunol Methods 184: 39-51
- (163) *Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C (2000)*  
Flow cytometry of apoptotic cell death  
J Immunol Methods 243: 167-190
- (164) *Volk HD (1991)*  
Multiparameteranalysen von mononukleären Zellen mittels Durchflußzytofluorometrie.  
In: Immunologische Arbeitsmethoden (Herausgeber Friemel, H.)  
Gustav Fischer, Jena, 4.Aufl.: 324–339
- (165) *Wakasugi N, Virelizier JL (1985a)*  
Defective IFN- $\gamma$  Production in the Human Neonate. I. Dysregulation Rather Than Intrinsic Abnormality  
J Immunol 134: 167-171
- (166) *Wakasugi N, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Rothhut B, Mencia Huerta JM, Russo-Marie F, Fiers W (1985b)*  
Defective IFN- $\gamma$  Production in the Human Neonate. II. Role of Increased Sensitivity to the Suppressive Effects of Prostaglandin E  
J Immunol 134: 172-176
- (167) *Wang ZQ, Dudhane A, Orlikowsky T, Clarke K, Li X, Darzynkiewicz Z, Hoffmann MK (1994a)*  
CD4 engagement induces Fas antigen-dependent apoptosis of T cells in vivo  
Eur J Immunol 24: 1549-1552
- (168) *Wang ZQ, Orlikowsky T, Dudhane A, Mittler R, Blum M, Lacy E, Riethmüller G, Hoffmann MK (1994b)*  
Deletion of T lymphocytes in human CD4 transgenic mice induced by HIV-gp120 and gp120-specific antibodies from AIDS patients  
Eur J Immunol 24: 1553-1557

- 
- (169) Wang ZQ, Dudhane A, Orlikowsky T, Hoffmann MK (1995)  
T cell antigen receptor engagement abrogates CD4-mediated T cell deletion in vivo  
Int Immunol 7: 207-211
- (170) Wang ZQ, Orlikowsky T, Dudhane A, Trejo V, Hoffmann MK (1998)  
Macrophages May Activate or Destroy T Cells with Which They Form Antigen- or Coreceptor-Mediated Cellular Conjugates  
Cell Immunol 189: 74-82
- (171) Wang ZQ, Bapat AS, Rayanade RJ, Dagtas AS, Hoffmann MK (2001)  
Interleukin-10 induces macrophage apoptosis and expression of CD16 (FcγRIII) whose engagement blocks the cell death programme and facilitates differentiation  
Immunology 102: 331-337
- (172) Wilson CB, Lewis DB (1990)  
Basis and Implications of Selectively Diminished Cytokine Production in Neonatal Susceptibility to Infection  
Rev Infect Dis 12: 410-420
- (173) Woodle ES, Smith DM, Bluestone JA, Kirkman III WM, Green DR, Skowronski EW (1997)  
Anti-human class I MHC antibodies induce apoptosis by a pathway that is distinct from the Fas antigen-mediated pathway  
J Immunol 158: 2156-2164
- (174) Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC (1990)  
CD14, a Receptor for Complexes of Lipopolysaccharide (LPS) and LPS Binding Protein  
Science 249: 1431-1433
- (175) Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y (1998)  
Attenuation of ischemia /reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor  
Circulation 97: 276-281
- (176) Zanke BW, Lee C, Arab S, Tannock IF (1998)  
Death of tumor cells after intracellular acidification is dependent on stress-activated protein kinases (SAPK/JNK) pathway activation and cannot be inhibited by bcl-2 expression or interleukin 1 beta-converting enzyme inhibition  
Cancer Res 58: 2801-2808
- (177) Zhang J, Mikecz K, Finnegan A, Glant TT (2000)  
Spontaneous Thymocyte Apoptosis Is Regulated by a Mitochondrion-Mediated Signaling Pathway  
J Immunol 165: 2970-2974

- (178) *Ziegler-Heitbrock HWL, Ulevitch RJ (1993)*  
CD14: Cell surface receptor and differentiation marker  
*Immunology Today* 14: 121-125

## 7.2 Veröffentlichungen

- (1) *Bauhammer J, Spring B, Dannecker GE, Poets Ch F, Hoffmann MK, Orlikowsky Th (2004)*  
Pan-caspase inhibitor zVAD-FMK induces macrophage (MΦ) apoptosis  
*Immunobiology* 209: 405  
Abstract
- (2) *Bauhammer JS, Spring B, Gille Ch, Tewes L, Poets Ch, Orlikowsky Th (2005)*  
Apoptotische Wirkungen eines Caspase-Inhibitors auf Makrophagen beim Neugeborenen und Erwachsenen  
31. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, Magdeburg, 2005  
Kongressposter, 3. Posterpreis
- (3) *Orlikowsky Th, Spring B, Dannecker GE, Bauhammer J, Hoffmann MK, Poets CF (2004)*  
Immunoglobulins alter phenotype and function of macrophages (MΦ) and may induce cell death  
*Shock* 21: 133  
Abstract
- (4) *Orlikowsky TW, Spring B, Dannecker GE, Bauhammer J, Hoffmann MK, Poets CF (2004)*  
Immunoglobulins alter phenotype and function of macrophages (MΦ) and may induce cell death  
In: 6<sup>th</sup> World Congress on Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis – Pathophysiology, Immune Consequences and Therapy, München 2.-6. März 2004, Eugen Faist (editor), Medimond S.r.l. International Proceedings Division, Bologna, Italy, pp. 117-120  
Proceedingsbeitrag
- (5) *Spring B, Bauhammer J, Dannecker GE, Poets CF, Hoffmann MK, Orlikowsky Th (2003)*  
Effekte von Polyglobin auf Makrophagen im Blut von gesunden Erwachsenen und Nabelschnurblut  
*Z Geburtsh Neonatol* 207: 48  
Abstract



## 8 ANHANG

### 8.1 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1.1: Zelltod: Nekrose und Apoptose .....	11
Abbildung 1.2: Todesrezeptor- und Mitochondrienabhängige Apoptosewege ..	14
Abbildung 1.3: Wirkung der beiden Makrophagensubtypen auf die T-Zellen ....	22
Abbildung 3.1: Verwendete Darstellungsformen der FACS-Analyse .....	35
Abbildung 3.2: Zellregionen zur Bestimmung von relativen Anteilen .....	36
Abbildung 3.3: Geräteeinstellung .....	38
Abbildung 3.4: Apoptose-Detektion durch FSC-SSC-Analyse .....	40
Abbildung 3.5: Fluoreszenzmikroskopie der Annexin V-Färbung.....	42
Abbildung 4.1: Zelldichteverteilung von Kontrolle und zVAD-FMK.....	49
Abbildung 4.2: Absolutzahl und relativer Anteil an Makrophagen .....	50
Abbildung 4.3: Population geschrumpfter Zellen (FACS-Darstellung) .....	51
Abbildung 4.4: Veränderungen in den Anteilen an großen und kleinen Makrophagen .....	53
Abbildung 4.5: Annexin V- und Propidiumiodid-positive Makrophagen .....	55
Abbildung 4.6: CD14-Expression der Makrophagen .....	57
Abbildung 4.7: Zeitliche Abfolge (24-Stunden-Kinetik).....	59
Abbildung 4.8: CD14-positive Makrophagen bei 0, 3, 6, 12, 24 Stunden .....	61
Abbildung 4.9: HLA-A,-B,-C- und HLA-DR-Expression der Makrophagen .....	63
Abbildung 4.10: CD86- und CD80-Expression der Makrophagen .....	64
Abbildung 4.11: Anteil der CD16-positiven Makrophagen und deren CD16- Expression .....	65
Abbildung 4.12: CD4-Expression der Lymphozyten.....	67
Abbildung 4.13: Annexin V- und Propidiumiodid-positive Lymphozyten .....	69
Abbildung 4.14: Hemmung von T-Zelldeletion u. –proliferation .....	77
Abbildung 4.15: Hemmung der CD4 T-Zellapoptose durch zVAD-FMK.....	82

## 8.2 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1.1: Übersicht über die untersuchten Zelloberflächenmoleküle .....	5
Tabelle 3.1: Vergleich von Kontrolle und 10mM DMSO nach 24 Stunden .....	47
Tabelle 4.1: Anteile gefärbter Zellen der großen u. kleinen Makrophagen .....	52
Tabelle 4.2: Lymphozytenzahl, Anteile der Lymphozytensubpopulationen .....	66
Tabelle 4.3: Expression der Lymphozytenoberflächenmoleküle .....	68
Tabelle 4.4: CD95-Expression und CD95Ligand-positive Zellen .....	70
Tabelle 4.5: Makrophagenanteil sowie Ergebnisse der Propidiumiodid-, Annexin V- und CD14-Färbung bei LPS-Stimulation .....	73
Tabelle 4.6: Anteile an CD4 und CD8 T-Zellen bei LPS-Stimulation .....	74
Tabelle 4.7: CD28-Expression der T-Zellen nach OKT3-Stimulation .....	78
Tabelle 4.8: Makrophagenanteil und Ergebnisse der Propidiumiodid-, Annexin V- und CD14-Färbung nach OKT3-Stimulation .....	80
Tabelle 4.9: Relative Anteile, Absolutzahlen an CD4 / CD8 T-Zellen und CD4-CD8- Lymphozyten .....	84
Tabelle 4.10: CD4 T-Zellexpression von CD4, CD3 und CD28 mit ch412 .....	85
Tabelle 4.11: Makrophagenzahl und Ergebnisse der Propidiumiodid-, Annexin V-, CD14-Färbung der Makrophagen mit ch412 .....	86
Tabelle 4.12: Anteile bzw. Absolutzahlen der Makrophagen und Lympho- zyten sowie CD14-Expression mit dem Caspase-Family Inhibitor Set“ .....	87

### 8.3 Verzeichnis der Abkürzungen

ADCC	antikörperabhängige Zellzytotoxizität (engl. „antibody dependent cell cytotoxicity“)
AICD	durch Aktivierung induzierter Zelltod (engl. „activation induced cell death“)
AIDS	erworbenes Immundefizienzsyndrom (engl. „acquired immunodeficiency syndrome“)
AIF	engl. „apoptosis inducing factor“
Ak	Antikörper
Apaf-1	engl. „apoptosis activating factor-1“
APC	engl. „antigen presenting cell(s)“
ATP	Adenosintriphosphat
CD	engl. „cluster of differentiation“
CD95L	CD95Ligand
CTL	engl. „cytotoxic T-lymphocytes“
Cyto c	Cytochrom c
DISC	engl. „death inducing signaling complex“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.coli	Escherichia coli
ELISA	engl. „enzyme-linked immunsorbent assay“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	engl. „fluorescence activated cell sorter“
FADD	engl. „Fas associated protein with death domain“
FCS	engl. „fetal calf serum“
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FU	engl. „fluorescence unit“
g	Erdbeschleunigung ( $g=9,81\text{m/s}^2$ )
GM-CSF	engl.: „granulocyte monocyte colony stimulating factor“
HIV	engl.: „human immunodeficiency virus“
HLA	engl. „human leucocyte antigen“

---

I.E.	Internationale Einheiten
IFN $\gamma$	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDA	Kilodalton
LBP	LPS-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. „major histocompatibility complex“)
MNC	engl. „mononuclear cells“
M $\phi$	Makrophagen
NaCl	Natrium-Chlorid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NSB	Nabelschnurblut
PB	peripheres Erwachsenenblut
PBS	engl. „phosphate buffered saline“
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
SIV	engl.: „simian immunodeficiency virus“
TCR	T-Zellrezeptor (engl. „T-cell receptor“)
Th-Zellen	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TUNEL	engl.: „terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling“
U	Enzymeinheit (= $\mu$ mol umgesetztes Substrat pro min)
VLE	engl. „very low endotoxin“
zVAD-FMK	Benzyloxycarbonyl-Valin-Alanin-Aspartat-Fluoromethylketon (O-Methylester)



## 9 DANKSAGUNG

An der Entstehung dieser Arbeit waren viele Menschen beteiligt. Ihnen allen möchte ich herzlich danken. Besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Ch. F. Poets für die Annahme als Doktorandin, seine Unterstützung und sein Interesse an meiner Dissertation;

Herrn PD Dr. Orlikowsky für das Überlassen des Themas, die Betreuung meiner Arbeit, die anregenden Diskussionen, seine Ratschläge und seinen Optimismus;

Frau Dr. Bärbel Spring für die Einführung in die Labormethoden, das Überwachen meiner ersten Schritte in der Forschung, ihre Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft;

Meinen Laborkollegen Till Spreemann, Lena Tewes, Isabella Widmaier, Judith Kugel und Christian Gilles für das gute Arbeitsklima, für alle Gespräche und die gegenseitige Motivation;

Lena Tewes für die ELISA-Messungen sowie Regine, Sina und Frau Bauer für ihre Hilfe bei den fluoreszenzmikroskopischen Bildern;

Diana Stier, Sonja Holder, Kerstin Kommer, meinem Bruder und meinem Vater fürs Korrekturlesen;

Wolfgang Bauhammer für die EDV-Ausrüstung und das geduldige Beantworten meiner verzweifelten Anrufe;

Der Studienstiftung des deutschen Volkes für die ideelle und finanzielle Unterstützung meines Studiums;

Meinen Eltern dafür, dass sie für mich da sind und mir den Weg bereitet haben;

Meiner Familie und allen Freunden für die regelmäßige Erinnerung daran, dass es auch noch eine Welt außerhalb der Medizin gibt;

Meinem Mann für jegliche Unterstützung, für seine Geduld und dafür, dass er akzeptierte, dass ich viele Abende und Wochenenden an dieser Arbeit saß.



---

## 10 LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

Name: Jutta Sinikka Bauhammer, geb. Schröter  
Familienstand: verheiratet  
Geburtsdatum/ort: 13.11.1978, Mutlangen  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Ausbildung

1985 - 1989 Grund- und Hauptschule Rindelbach / Ellwangen  
1989 - 1998 Hariolf-Gymnasium Ellwangen, Abitur 06/1998  
1994 Deutsche Schule Helsinki, Finnland 09/1994 – 12/1994  
1998 – 1999 Auslandsaufenthalt in Ecuador, Arbeit auf einer  
Krankenstation in Manglaralto 09/1998 – 01/1999  
1999 – 2005 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-  
Universität Tübingen  
Ärztliche Vorprüfung 03/2001  
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 03/2002  
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 04/2004  
2002 – 2005 Doktorarbeit bei Prof. Dr. Ch. F. Poets und PD Dr.  
Orlikowsky in der Universitätskinderklinik Tübingen,  
Abteilung Neonatologie  
2004 – 2005 Praktisches Jahr  
Chirurgie, Kreiskrankenhaus Böblingen  
Innere Medizin, General Hospital, University of  
Newfoundland, St. John`s, Kanada  
Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Böblingen  
Pädiatrie, Kreiskrankenhaus Böblingen  
11.05.2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung,  
Abschluss des Studiums der Humanmedizin an der  
Eberhard-Karls-Universität Tübingen

### Stipendium

2001 – 2005 Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes