

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

**Einfluss der Buckminsterfullerene auf Zellen des
Immunsystems**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard Karls Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Hanno Friedemann Rüdiger Bunz

aus

Tübingen

2011

Dekan:

Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Frau Professor Dr. R. Klein

2. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. B. Gückel

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Einleitende Worte.....	1
1.2	Fullerene	1
1.2.1	Buckminsterfullerene	1
1.2.2	Wasserlösliche Fullerene	2
1.3	Verwendung von Fullerenen in der Medizin	3
1.3.1	Einfluss und Toxizität von Fullerenen	3
1.3.2	Fullerene als Medikamente und Drugcarrier	4
1.3.3	Einfluss auf Zellen des angeborenen Immunsystems	5
1.3.4	Spezifische Immunreaktion auf Fullerene.....	5
1.3.5	Aktiver Schutz vor oxidativem Stress in PBMC durch Fullerene	6
1.4	Exkurs Immunologie.....	7
1.4.1	Cluster of Differentiation zur T-Zell Differenzierung.....	7
1.4.2	Funktionelle Differenzierung der CD4-T-Zellen	8
1.4.3	Untersuchte Zytokine.....	10
1.5	Ziel der Arbeit.....	11
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Blutspender	13
2.2	Material	13
2.2.1	Reagenzien für die Isolierung von Lymphozyten aus Vollblut	13
2.2.2	Reagenzien für den Lymphozytentransformationstest (LTT).....	14
2.2.3	Reagenzien für die Durchführung des Zytokin-Sandwich-ELISA.....	14
2.2.4	Reagenzien für die Standardverdünnungen beim Zytokin-Sandwich-ELISA	14
2.2.5	Antikörper für den Zytokin-Sandwich-ELISA	15
2.2.6	Reagenzien für die Vorbereitung der Zellen zur Durchflusszytometrie.....	15
2.2.7	Antikörper für die durchflusszytometrischen Untersuchungen.....	15
2.2.8	Immunmodulierende Antigene.....	16

Inhaltsverzeichnis

2.2.9 Fullerene	16
2.2.10 Endotoxin Detections Test.....	16
2.2.11 Verbrauchsmaterialien/Geräte.....	17
2.3 Methoden	17
2.3.1 Probengewinnung.....	17
2.3.2 Isolierung von Peripheral Blood Mononuclear Cells	17
2.3.3 Bestimmung der Zellzahl	18
2.3.4 Positiv- und Negativkontrolle, Antigentitration	18
2.3.5 Lösung und Konzentration der zu untersuchenden Medikamente.....	19
2.3.6 Lymphozytentransformationstest (LTT)	19
2.3.7 Proliferationskinetik	20
2.3.8 Durchflusszytometrische Bestimmung CD69 aktiver Zellen	20
2.3.9 Zytokin-ELISA.....	22
2.3.10 Endotoxin Detection Test (LAL).....	23
2.4 Statistik	24
3 Ergebnisse	25
3.1 Proliferationskinetik.....	25
3.2 Zellproliferation nach 7-tägiger Inkubation (LTT)	26
3.2.1 Einfluss von Poly-C60 und Nepo-C60 auf die Proliferation von PBMC ohne Kostimulation.....	26
3.2.2 Einfluss von Poly-C60 und Nepo-C60 auf die BCG-induzierte Proliferation von PBMC	27
3.2.3 Einfluss von Poly-C60 und Nepo-C60 auf die TT-induzierte Proliferation von PBMC	27
3.2.4 Einfluss von Poly-C60 und Nepo-C60 auf die PPD-induzierte Proliferation von PBMC	28
3.3 Bestimmung der Zytokinproduktion.....	29

3.3.1 Einfluss von Poly und Nepo auf die Produktion Makrophagen typischer Zytokine (IL-1 α , IL-6, TNF- α).....	29
3.3.2 Einfluss von Poly und Nepo auf die Produktion T _H 1-typischer Zytokine (TNF- β , IFN- γ).....	31
3.3.3 Einfluss von Poly und Nepo auf die Produktion T _H 2-typischer Zytokine (IL-5, IL-13).....	33
3.3.4 Einfluss von Poly und Nepo auf die Produktion von Interleukin 10 (IL-10)	35
3.3.5 Einfluss von Poly und Nepo auf die Produktion von GM-CSF	38
3.4 Einfluss von Poly und Nepo auf die Expression von CD69 durch PBMC	40
3.4.1 Einfluss von Poly und Nepo auf die CD69-Expression von CD3+ und CD4+ Zellen.....	40
3.4.2 Einfluss von Poly und Nepo auf die CD69-Expression von CD3+ CD8+ Zellen.....	43
3.4.3 Einfluss von Poly und Nepo auf die CD69-Expression von CD19+ Zellen	45
3.4.4 Einfluss von Poly und Nepo auf die CD69-Expression von CD56+ Zellen	48
3.5 Endotoxin Detection Test (LAL)	50
4. Diskussion	52
4.1 Diskussion der Methodik	52
4.1.1 Reinheit der Fullerene	52
4.1.2 Konzentrationsstufen der Fullerene.....	53
4.2 Diskussion der Ergebnisse.....	53
4.2.1 Einfluss von Poly-C60 und Nepo-C60 auf die Proliferation von immunkompetenten Zellen	53
4.2.2 Sekretion von Zytokinen unter Poly-C60 und Nepo-C60 Einfluss.....	54
4.2.3 Aktivierung von immunkompetenten Zellen unter Poly-C60 und Nepo-C60	55
4.2.4 Gesamtbewertung des Einflusses von Poly-C60 und Nepo-C60 auf immunkompetente Zellen	56
4.2.5 Abschließende Betrachtung und Schlussfolgerung	58

Inhaltsverzeichnis

5 Ausblick	59
6 Zusammenfassung	60
7 Literaturverzeichnis	62
8 Danksagung	65
9 Lebenslauf	66

1 EINLEITUNG

1.1 Einleitende Worte

Seit ihrer Erstbeschreibung 1985 wecken die Fullerene große Hoffnungen. Im medizinischen Bereich ist dies der Einsatz als eigenständige Medikamente, als Transporter (Drug Carrier) für Medikamente oder in der Diagnostik bei bildgebenden Verfahren.

Diese Hoffnungen beruhen auf der einzigartigen Struktur der Kohlenstoffmoleküle und den chemischen Fähigkeiten, sowie der Möglichkeit der unterschiedlichen Modifikationen der Fullerene.

Auch in der Immunologie erscheinen die Fullerene vielversprechend. Sie werden als HIV-Medikament gehandelt, als Suppressor der allergischen Reaktion sowie als Hoffnungsträger in der immunspezifischen Krebstherapie.

Daher ist es von großem Interesse die Auswirkungen der Fullerene auf das Immunsystem des Körpers näher zu erforschen. In der vorliegenden Arbeit sollen die Einflüsse der Fullerene auf die Zellen der spezifischen Immunabwehr, der Einfluss auf die Zytokinausschüttung und der Einfluss auf die unterschiedliche Aktivierung von immunkompetenten Zellen untersucht werden.

1.2 Fullerene

1.2.1 Buckminsterfullerene

Erstmalig wurden Fullerene 1970 von dem Japaner Eiji Oosawa theoretisch beschrieben und berechnet (Eiji Oosawa: 大澤映二 (Superaromaticity). In: 「化学」 (Kagaku). 25, 1970, S. 854–863 (Japanisch)). Da seine Forschungsarbeit in japanischer Sprache veröffentlicht wurde, beziehe ich mich in meiner Arbeit auf die Erstbeschreibung der Buckminsterfullerene - auch C₆₀ genannt - von Kroto, Curl und Smalley im Jahre 1985 [1]. Fullerene sind nach Graphit und Diamant die dritte Elementmodifikation des Kohlenstoffs. Namensgeber ist der amerikanische Architekt Richard Buckminster Fuller, dessen konstruierte Kuppeln dem Aufbau der C₆₀-Fullerene sehr ähnlich sind. Bei ihrer Erstbeschreibung von Curl et al. wurden sie

durch das Verdampfen von Graphit unter Helium-Atmosphäre im Lichtbogen hergestellt und im Massenspektrometer dargestellt. Fullerene kommen aber auch in der Natur vor. Sie wurden zum Beispiel in Shungit-Kohle in Russland gefunden. Das häufigste Fulleren ist das C₆₀-Fulleren. Es besteht aus 60 Kohlenstoffatomen die in 12 pentagonalen Ringen und 20 hexagonalen Ringen angeordnet sind. Auf Grund der Tatsache, dass regelmäßige Fünfecke keine plane Ebene beschreiben können, ergibt sich ihre sphärische Anordnung. Sie beschreiben einen abgestumpften Ikosaeder, gut vorstellbar als Fußball.



Abbildung 1: Fussball



Abbildung 2: C₆₀-Fulleren (Torsten Brandmueller)

Die Kohlenstoffatome sind im C₆₀-Fulleren sp²-hybridisiert und enthalten somit aromatische Ringe. Sie haben daher aromatische Eigenschaften. Auf Grund der sphärischen Struktur und den sp²-hybridisierten Kohlenstoffatome sind die Fullerene starke Radikalfänger, da sie sehr viele Elektronen in ihren konjugierten Doppelbindungen binden können. Sie wurden daher auch als „Radical Sponge“ bezeichnet [2]. Man kann Fullerene exohedral oder endohedral konjugieren, sprich Molekülgruppen außerhalb der Kugelform addieren oder in das Innere der Kugel einbringen [1].

1.2.2 Wasserlösliche Fullerene

In meiner Arbeit verwende ich zwei Vertreter von wasserlöslichen C₆₀-Fullerenen. Dabei handelt es sich um Fullerene mit der C₆₀-Grundstruktur, die exohedral mit

polaren Gruppen konjugiert wurden. Dadurch bekommt das Fulleren polare Eigenschaften und wird wasserlöslich. Im ersten Fall wurde das C₆₀-Fulleren mit vielen Alkoholgruppen konjugiert. Es hat den Namen: Polyhydroxy-C₆₀ (Poly-C₆₀). Im zweiten Fall wurde das C₆₀-Fulleren mit vielen Ethyl-amin-Gruppen konjugiert. Es hat den Namen: N-ethyl-polyamino-C₆₀ (Nepo-C₆₀). Beide modifizierten Fullerene wurden über Bucky USA bezogen.

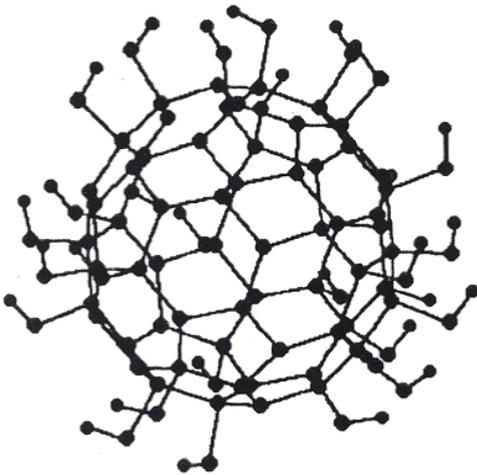


Abbildung 3: Polyhydroxy-C₆₀ (Bucky USA)

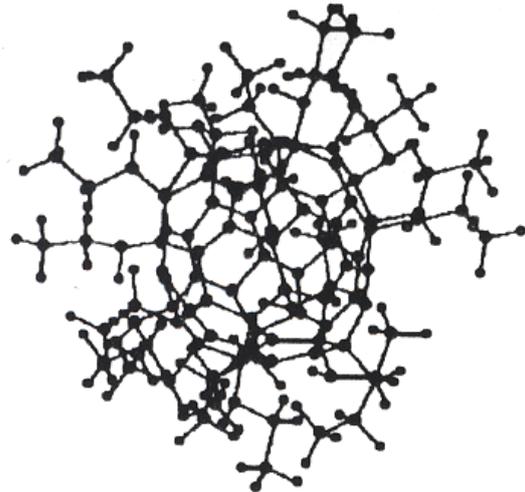


Abbildung 4: N-ethyl-polyamino-C₆₀ (Bucky USA)

1.3 Verwendung von Fullerenen in der Medizin

1.3.1 Einfluss und Toxizität von Fullerenen

Wichtige Voraussetzung für die medizinische Nutzung von Nanopartikeln, in unserem Fall von Fullerenen, ist deren Einfluss und Toxizität auf Zellen des menschlichen Körpers. So muss eigentlich für jede modifizierte Form der Nanopartikel die explizite Toxizität erfasst werden. Für die Fullerene gibt es mehrere Studien und Ansätze die sich nicht alle einig sind [3]. Einigkeit besteht in der Aussage, die Dosis macht das Gift. Weitere Faktoren, die Einfluss auf die Toxizität zu haben scheinen, sind: Wasserlöslichkeit, Kontakt-/Inkubationszeit, Lichteinwirkung und reaktive konjugierte Gruppen.

So wurde von Sayes et al. beschrieben, dass unmodifizierte C₆₀ Fullerene auf humane Fibroblasten und Astrozyten nach 48stündiger Inkubation zytotoxisch wirkten, aber andererseits dieser zytotoxische Effekt nach der Bindung von

Seitenketten an das Carbongerüst vermindert bzw. verhindert werden konnte [4]. Dass die Konzentration der Fullerene einen Einfluss auf die Toxizität hat, zeigt Yamawaki und Iwai an Hand von Endothelzellen, die sie mit Hydroxy-C60 in einer Konzentration von 100 µg/ml konfrontierten [5]. Geringere Konzentrationen hatten keinen Effekt auf die Zellen. Chen et al. zeigten ebenfalls, dass die Zytotoxizität konzentrationsabhängig ist. Ihrer Beschreibung nach hatte bei Versuchen an der Ratte eine orale Zufuhr keinen Effekt auf die Versuchstiere. Durch Injektion wurde eine letale Dosis von LD50 600mg/kg KG ermittelt [6].

Zhao et al. konnten an Hand von zwei Fullerenen (C60 und hydroxyliertem C60) zeigen, dass diese unter UV-Bestrahlung freie Sauerstoffradikale produzierten [7]. Dazu inkubierten sie menschliche Keratinozyten mit den Fullerenen und bestrahlten diese anschließend mit UV-Strahlung. Dabei war das reine C60 60-fach stärker phototoxisch für die menschlichen Keratinozyten als das hydroxylierte C60 Fulleren. Für die Entstehung von Sauerstoffradikalen war die Anwesenheit von NADH als Elektronendonator wichtig.

1.3.2 Fullerene als Medikamente und Drugcarrier

Es gibt viele Möglichkeiten, Fullerene in der Medizin einzusetzen. Fullerene eignen sich zum Beispiel als Drug Carrier. Man kann das Medikament exohedral oder endohedral konjugieren oder im Inneren ungebunden transportieren. Es wird auch diskutiert, ob man diese Drug Carrier mit speziellen Konjugaten selektiv für spezielle Gewebe machen kann. So beschreiben McDevitt et al. einen Nanotubecarrier, der mit spezifischen Antikörpern für menschliche Lymphomzellen konjugiert ist und ein Radiometal-Ion transportiert [8]. Dabei konnten sie zeigen, dass die spezifizierte Nanotube als Drugcarrier sehr gut geeignet war und sich gut im Zielgewebe anreicherte. Des Weiteren werden pharmakologische Eigenschaften von Fullerenen an sich beschrieben [9, 10].

Marcorin et al. beschreiben, dass C60 Fullerene als Inhibitoren für die HIV Protease fungieren können [11]. In diesem Fall nimmt das C60 Fulleren mit seiner Kugelstruktur die Rolle als Ligand im aktiven Zentrum des Virus-Enzyms ein. Das Fulleren ist allerdings sehr lose fixiert. Die Autoren versuchten die Ligandenbindung zu erhöhen, indem sie an speziellen räumlichen Positionen des Fulleren Gruppen

konjugierten, die die Bindung mit dem Virus-Enzym stabilisieren. Dadurch wird der Maternalisierungsprozess des Virus gestört.

Die potentielle Phototoxizität der Fullerene wurde von Kasermann et al. an Hand von umhüllten Viren untersucht [12]. Sie zeigten, dass Vertreter der Togaviren und Rhabdoviren, die in einer Fullerenlösung schwammen, durch 5 stündige Bestrahlung mit sichtbarem Licht signifikant an Infektiosität ($7 \log_{10}/\text{ml}$) verloren. Dieser Effekt wurde durch die Bildung von freien Sauerstoffradikalen hervorgerufen und war sauerstoffabhängig.

1.3.3 Einfluss auf Zellen des angeborenen Immunsystems

2007 beschrieben Ryan et al. den Einfluss von Poly-C60 und Nepo-C60 auf humane Mastzellen (aus der Haut und der Lunge) und basophile Zellen im peripheren Blut [13]. Sie konnten zeigen, dass die Immunzellen signifikant schwächer auf Antigenstimulation reagierten, wenn sie vorher mit Fullerenen inkubiert wurden. Auch fiel die Histaminausschüttung signifikant geringer aus, ebenso der anaphylaktisch bedingte Abfall der Körpertemperatur. Dem Ergebnis ihrer Arbeit nach unterbinden Fullerene nicht den Antigen-Antikörperkontakt auf der Zelloberfläche sondern sie scheinen intrazellulär in die Signaltransduktion eingreifen. So wurde eine hoch signifikante Inhibition der Phosphorylierung der Syk-Tyrosinkinase festgestellt. Die Phosphorylierung der Syk-Tyrosinkinase korreliert mit der Sekretion von Mastzellen und Basophilen. Die Autoren zeigten mit diesen Ergebnissen, dass Fullerene die Immunantwort von Mastzellen und Basophilen inhibieren können. Sie schließen daraus auf das immunmodulatorische Potential der Fullerene in Bezug auf Erkrankungen wie Asthma, Anaphylaxie, Arthritis und weiteren Autoimmunerkrankungen.

1.3.4 Spezifische Immunreaktion auf Fullerene

Chen et al. konnten 1998 zeigen, dass das Immunsystem von Mäusen spezifisch auf Fullerene reagieren kann [14]. Sie konjugierten C60 Fullerene mit bovinem Thyroglobulin. Bei so immunisierten Mäusen, bildeten sich IgG Antikörper gegen das konjugierte C60 Fulleren, die mit Hilfe eines IgG-spezifischen zweiten Antikörpers im

ELISA nachgewiesen werden konnten. Diese Antikörper zeigten eine Kreuzreaktion zu unkonjugierten C70 Fullerenen. Jedoch war für die Sensibilisierung der Immunzellen auf Fullerene die Koppelung an ein bovines Antigen notwendig. Die Autoren konnten aber noch nicht zeigen, auf welche Weise das Immunsystem die Fullerene erkennen kann. Sie stellten einige Hypothesen auf. Dabei spielen die Hydrophobizität, Krümmung, Ladungsverteilung und die pi-Bindungen eine Rolle. Eine Röntgen Kristallographie soll weitere Erkenntnisse bringen.

1.3.5 Aktiver Schutz vor oxidativem Stress in PBMC durch Fullerene

Die postulierte Eigenschaft der Fullerene, als Radikalschwämme zu dienen und so freie Radikale bei oxidativem Stress zu binden, wurde von Monti et al. genauer untersucht [15]. Es ging um den Einfluss von Fullerenen auf mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC), die durch zwei verschiedene Modelle in die Apoptose gebracht werden sollten. Dabei wurden die PBMC's entweder mit 2-desoxy-D-Ribose(dRib) oder TNF- α plus Cyclohexamid konfrontiert. Es zeigte sich, dass PBM Zellen, die mit Fullerenen „geschützt“ wurden, ohne Einwirkung von dRib oder TNF- α plus Cyclohexamid keine Veränderungen in der Spontanapoptoserate zeigten. Jedoch konnte die Apoptoserate unter beiden Triggermodellen signifikant gesenkt werden. Des Weiteren zeigten Monti et al., dass der Prozentsatz der depolarisierten Mitochondrien der PBM Zellen unter Fulleren-Schutz deutlich geringer war. Dieser Prozentsatz korreliert mit dem oxidativen Stress.

Diese Studie beschreibt zum ersten Mal die anti-apoptotische Wirkung von C60 Fullerenen auf PBMC's bei oxidativem Stress.

1.4 Exkurs Immunologie

1.4.1 *Cluster of Differentiation zur T-Zell Differenzierung*

Die *Cluster of Differentiation (CD)* sind die Bezeichnungen für charakteristische Oberflächenmoleküle auf Leukozyten. Sie sind Bestandteile der Leukozytenmembran und haben unterschiedliche Funktionen bei der Signaltransduktion oder der Zelladhäsion. In der folgenden Tabelle sind die CD aufgeführt, die eine wichtige Rolle in der vorliegenden Arbeit spielen. Mit Hilfe von Antikörpern, die sich gegen die CD-Moleküle auf den Leukozyten richten, lassen sich die verschiedenen Leukozyten in der Durchflusszytometrie genauer differenzieren. Da die speziellen CD-Moleküle nur auf bestimmten Leukozyten vorkommen, kann man zwischen den Subtypen der Leukozyten unterscheiden, wenn man die CD-Antikörper mit Molekülen markiert (FITC, PerCP, PE), die zur Fluoreszenz angeregt werden können und diese im Durchflusszytometer bestimmt.

So werden T-Helfer-Zellen zum Beispiel durch eine zweifach Kombination aus den Antikörpern gegen CD3 und CD4 definiert (Tab.1). Zellen, die zum Beispiel CD3 und CD4 positiv sind damit eindeutig als T-Helferzellen zu identifizieren. Der Antikörper gegen CD69 signalisiert, ob die Zelle sich im aktivierten Zustand befindet, da CD69 nur bei Aktivierung exprimiert wird. Für zytotoxische T-Zellen wird ähnlich verfahren. CD3+ und CD8+ positive Zellen identifizieren cytotoxische Zellen; CD69+/- differenziert zwischen aktiviertem und inaktivem Zustand. B-Zellen werden über CD19+ und CD45+ beschrieben und die Aktivierung wieder über CD69+/- bestimmt. Bei den NK-Zellen findet die Identifizierung über CD56+ und CD45+ statt und wiederum wird die Aktivierung mit Hilfe von CD69 bestimmt.

Einleitung

CD-Anitgen	Antigentragende Zellen	Funktion	Andere Bezeichnungen	Verwandschaft
CD3	Thymozyten, T-Zellen	Assoziiert mit dem Antigenrezeptor von T-Zellen(TCR); Zelloberflächenexpression und Signalübertragung des TCR	T3	Immunglobulin
CD4	T _H 1- und T _H 2-Zellen, Monozyten, Makrophagen	Corezeptor für MHC-II Moleküle	T4, L3T4	Immunglobulin
CD8	Cytotoxische T-Zellen	Corezeptor für MHC-I Moleküle	T8, Lyt2,3	Immunglobulin
CD19	B-Zellen	Bildet Komplex mit CD21 und CD81; Corezeptor für B-Zellen		Immunglobulin
CD45	Alle hämatopoetischen Zellen	Tyrosinphosphatase; erhöht die Signalvermittlung über den Antigenrezeptor von B- und T-Zellen	Leukocyte common antigen(LCA), T200, B220	Fibronectin Typ III
CD56	NK-Zellen	Isoform des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM); Adhäsionsmolekül	NKH-I	Immunglobulin
CD69	Aktivierte T- und B-Zellen, aktivierte Makrophagen und NK-Zellen	Unbekannt, frühes Aktivierungsantigen	activation inducer molecule (AIM)	C-Typ-Lektin

Tabelle 1: Cluster of Differentiation (Auswahl); Auszug aus Leucocyte Typing VII und Immunologie [16] [17].

1.4.2 Funktionelle Differenzierung der CD4-T-Zellen

Durch die Antigenpräsentation im MHC II Komplex einer Antigen-Präsentierenden-Zelle (APC) kommt es zur Aktivierung von naiven CD4-T-Zellen. Dadurch werden diese zur Proliferation angeregt und differenzieren zu T_H0-Effektorzellen. Jetzt entscheidet sich, ob sich die T_H0-Effektorzelle in eine T_H1- oder in eine T_H2-

Effektorzelle ausdifferenziert [18]. Hierbei spielt das umgebende Milieu eine große Rolle. Unter anderem ist die Art und Anzahl der Antigene/Erreger von Bedeutung. Aber den größten Einfluss haben die Zytokinkonzentrationen des umgebenden Milieus. So kommt es zur T_H1 Antwort, wenn vorwiegend Interleukin-12 oder Interferon- γ zugegen sind. Bei überwiegender Konzentration von Interleukin-4 oder Interleukin-6 kommt es vermehrt zur T_H2 Antwort. Dabei wirkt Interferon- γ als Inhibitor für die T_H2 Differenzierung und Interleukin-4 und Interleukin-10 wirken umgekehrt als Inhibitoren der T_H1 Differenzierung. Die unterschiedliche Differenzierung gibt den Ausschlag bei der Neigung der Immunantwort. So kommt es bei einer überwiegenden T_H2 Antwort zur vermehrten Aktivierung von B-Zellen, die durch Antikörperproduktion die humorale Antwort stärken. Bei einer vermehrten T_H1 Antwort kommt es hauptsächlich zur Aktivierung der zellulären Antwort durch Aktivierung von Makrophagen oder die Stimulierung von B-Zellen zur Bildung von Antikörpern [16] (Abbildung 5).

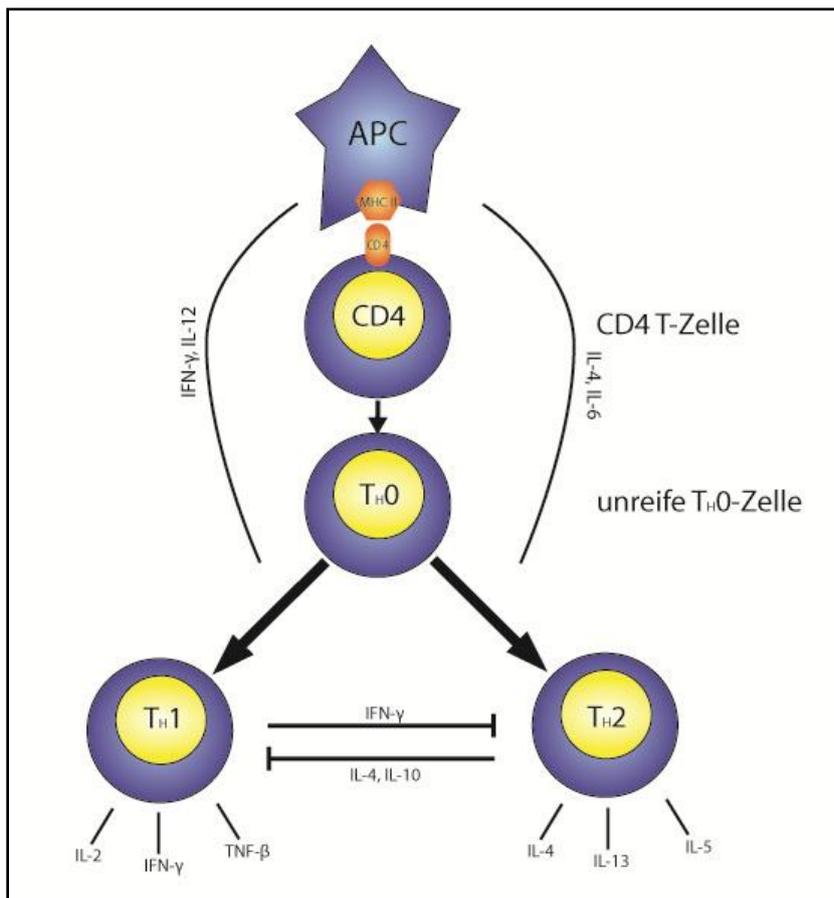


Abbildung 5: Funktionelle Differenzierung der CD4-T-Zellen

1.4.3 Untersuchte Zytokine

Die unten stehende Tabelle gibt einen kurzen Überblick über die in dieser Arbeit untersuchten Zytokine und deren Ursprung und Wirkung.

Zytokin	Rezeptor	Produzierende Zellen	Wirkung
IL-1 α	CD121a, CD121b	Makrophagen, Epithelzellen	Fieber, T-Zell-Aktivierung, Makrophagenaktivierung
IL-5	CD125, β c	T-Zellen, Mastzellen	Wachstum und Differenzierung der eosinophilen Zellen
IL-6	CD126, CD130	T-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen	Wachstum und Differenzierung von T- und B-Zellen, Produktion von Proteinen der akuten Phase, Fieber
IL-10	IL-10R α , CFR2-4	T-Zellen, Makrophagen, EBV-transformierte B-Zellen	Wirksamer Inhibitor von Makrophagenfunktionen
IL-13	IL-13R, CD132	T-Zellen	Wachstum und Differenzierung der B- Zellen, hemmt T _H 1-Zellen und die Produktion inflammatorischer Zytokine durch Makrophagen
IFN- γ	CD119, IFNGR2	T-Zellen, natürliche Killerzellen	Aktivierung der Makrophagen, erhöhte Expression von MHC-Molekülen und Komponenten des Antigenprozessierungssystems, Ig- Klassenwechsel, hemmt T _H 2-Zellen
GM-CSF	CD116, β c	Makrophagen, T- Zellen	Stimuliert Wachstum und Differenzierung der myelo-monocytischen Linie, besonders der dendritischen Zellen
TNF- α	p55, p75, CD120a, CD120b	Makrophagen, NK-Zellen, T-Zellen	Lokale Entzündungen, Endothelaktivierung
TNF- β	p55, p75, CD120a, CD120b	T-Zellen, B-Zellen	Abtöten, Endothelaktivierung

Tabelle 2: Untersuchte Zytokine; Auszug aus „Immunologie“ von Charles A. Janeway [16]

1.5 Ziel der Arbeit

Die genannten wissenschaftlichen Erkenntnisse und der beginnende Einsatz der Fullerene in der Medizin verlangen zwangsläufig eine genauere Bestimmung der Interaktion der Fullerene mit dem menschlichen Körper. Es ist wichtig, umfassend die Fragen der Toxizität und die Wirkung auf den Menschen bzw. die Modulation von spezifischem Gewebe zu klären, um einen sicheren Einsatz gewährleisten und eventuelle pharmakologische Effekte sicher und effizient nutzen zu können.

Da Fullerene eine relativ neue Stoffgruppe darstellen, gibt es noch zu wenige Aussagen über die Interaktion mit dem menschlichen Körper. Im Bereich des Immunsystems wurden wie oben genannt schon modulatorische Effekte beschrieben. Diese beschränkten sich allerdings auf die Zellen der angeborenen Immunantwort [13] *in-vitro* oder befassten sich mit der Provokation einer humoralen Antwort der Immunzellen auf die Fullerene *in-vitro* [14].

Da Fullerene einen modulatorischen Effekt auf immunkompetente Zellen des menschlichen Körpers zu haben scheinen, ist es von Interesse, diesen Effekt bei Zellen der erworbenen Immunantwort (B-Zellen, T-Helferzellen und T-Killerzellen), aber auch bei Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) *in-vitro* näher zu betrachten.

Hierbei muss noch zwischen den unterschiedlichen Immunreaktionen des T_H1 - und des T_H2 -Musters unterschieden werden, da bei beiden Mustern unterschiedliche Zytokine und Aktivierungskaskaden eine Rolle spielen.

Die Fragen des Effektes von Fullerenen auf Zellen der erworbenen Immunantwort, auf NK-Zellen und der unterschiedlichen T_H -Muster mit Bestimmung der spezifischen Zytokinausschüttung sollen in der vorliegenden Arbeit an Hand von zwei wasserlöslichen Vertretern der C60 Fullerene (Poly C60 und Nepo C60) in einem Versuchskollektiv von 20 gesunden Probanden mit folgenden Methoden gezeigt werden:

- Gewinnung von PBMC's durch Isolierung aus Vollblut.
- Anschließende Kultivierung der Zellen und Inkubation mit unterschiedlichen, stimulierenden Antigenen, die vor allem die T_H1 -Antwort induzieren (PPD; BCG) und solchen, die die T_H2 -Antwort induzieren (Tetanus-Toxoid; Barth et al. 2003 [19]) mit und ohne Zugabe von verschiedenen Fullerenkonzentrationen.

- Weiterführende quantitative Zytokinbestimmung mit Hilfe von Sandwich-ELISA und Zellproliferationsbestimmung mittels radioaktiver Proliferationsassays.
- Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression des frühen spezifischen Aktivierungsmarkers CD69. Neben CD69 werden verschiedene, für die speziellen Immunzellen spezifischen Zelloberflächenmarker (CD3, CD4, CD8, CD19, CD45, CD56) angefärbt.
- Zeigen des Einflusses von Fullerenen in verschiedenen Konzentrationsstufen auf die Zellen der erworbenen Immunantwort *in-vitro*. Aus Mangel an Informationen zur Wirkung von Fullerenen auf die Zellen der erworbenen Immunantwort wurde das Intervall der Konzentrationsstufen sehr groß gewählt. Der Konzentrationsbereich orientiert sich an den Konzentrationsstufen (1.000 – 0,1 ng/ml) der Arbeiten mit Zellen der angeborenen Immunantwort [13].

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Blutspender

Die Blutspender wurden aus dem nahen Umfeld des Doktoranden ausgesucht. Dabei handelt es sich um 11 weibliche Spenderinnen und um 9 männliche Spender im Alter von 22-38 Jahren. Alle Spender waren körperlich gesund und hatten zum Zeitpunkt der Blutspende keine akuten Infektionen oder allergische Reaktionen.

Eine bekannte Allergie führte nicht zum Ausschluss. 5 Spender gaben eine Pollenallergie an. Bei keinem Spender war ein angeborener oder erworbener Immundefekt bekannt. Kein Spender hatte in den letzten 12 Monaten eine Tetanus- oder BCG-Impfung erhalten.

2.2 Material

2.2.1 Reagenzien für die Isolierung von Lymphozyten aus Vollblut

- Heparin-Natrium ratiopharm® Injektionslösung 5000 IE
Ratiopharm GmbH
- RPMI 1640 Medium (1x) 5,5 g/l NaCl, 5 mg/l Phenolrot
2 g/l NaHCO₃, 25 mM HEPES
BIOCHROM AG

Wird in dieser Arbeit RPMI 1640 Medium erwähnt, ist immer 100 mg/l Refobacin® als Breitbandantibiotikum mit enthalten.

- Refobacin® Gentamicinsulfat
MERCK
- HBSS (1x) Hanks' Balanced Salt Solution
w/o CaCl₂, w/o MgCl₂
GIBCO / Invitrogen
- Biocoll separating solution (Ficoll) Dichte: 1,077 g/ml
BIOCHROM AG
- Acridin-Orange *Merck*

2.2.2 Reagenzien für den Lymphozytentransformationstest (LTT)

- [Methyl-3H] Thymidin 74 GBq/mmol *Hartmann Analytic*
- ULTIMA Gold *Packard*

2.2.3 Reagenzien für die Durchführung des Zytokin-Sandwich-ELISA

- PBS-Puffer (60 mM; pH 7,4) 6,81 g KH_2PO_4 ; 43,83 g NaCl;
44,49 g Na_2HPO_4 ; gelöst in 5 l
 $\text{Aqua}_{\text{dest}}$
- Waschpuffer (pH 7,4) 1 x PBS + 0,05% BSA
- Bicarbonat-Puffer (0,2 M; pH 9,6) 33,90 g Na_2CO_3 ; 57,12 g
 NaHCO_3 ; gelöst in 5 l $\text{Aqua}_{\text{dest}}$.
- Citrat-Puffer (0,1 M; pH 5,0) 82,36 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat;
25,20 g Citronensäure-
Monohydrat; gelöst in 4 l $\text{Aqua}_{\text{dest}}$
- Substrat-Lösung 0,5mg o-Phenyldiamin /ml
Citratpuffer; 33 μl H_2O_2 (30%)
/100 ml Puffer
- Avidin-Peroxidase *Sigma*
- 25%-ige Schwefelsäure *Merck*

2.2.4 Reagenzien für die Standardverdünnungen beim Zytokin-Sandwich-ELISA

- IL-1 α , IL-5, IL-6, IL-10, IL-13,
GM-CSF, INF- γ , TNF- α , TNF- β *BD Biosciences Pharmingen*

2.2.5 Antikörper für den Zytokin-Sandwich-ELISA

- Maus anti-human:
IL-5, IL-6, IL-10, IL-13,
GM-CSF, INF- γ , TNF- α , TNF- β *BD Biosciences Pharmingen*
- anti-human IL-1 α *R&D Systems*

- Ratte anti-human biotinyliert
IL-5, IL-6, IL-10, IL-13,
GM-CSF, INF- γ , TNF- α , TNF- β *BD Biosciences Pharmingen*
- anti-human IL-1 α biotinyliert *R&D Systems*

2.2.6 Reagenzien für die Vorbereitung der Zellen zur Durchflusszytometrie

- BD CellFIX™ 10x Konzentrat
BD Biosciences
- PBS-Puffer 6,81 g KH₂PO₄ ; 43,83 g NaCl;
44,49 g Na₂HPO₄ ; gelöst in 5 l
Aquadest
- Waschpuffer 1xPBS + 0,05% BSA
- FITC BrdU Flow Kit *BD Biosciences Pharmingen*
- FITC anti-human Foxp3 staining set *NatuTec / eBioscience*

2.2.7 Antikörper für die durchflusszytometrischen Untersuchungen

- **Isotypkontrollen**
FITC Maus anti-human IgG1 κ
PE Maus anti-human IgG1 κ
PerCP Maus anti-human IgG1 κ *BD Biosciences Pharmingen*

- **Antikörper für die Detektion CD69-exprimierender Zellen**
FASTIMMUNE™ CD4/CD69/CD3 CD4 FITC, CD69 PE, CD3 PerCP
FASTIMMUNE™ CD 8/CD69/CD3 CD8 FITC, CD69 PE, CD3 PerCP

FASTIMMUNE™ CD19/CD69/CD45	CD19FITC, CD69PE, CD45PerCP
FASTIMMUNE™ CD56/CD69/CD45	CD56FITC, CD69PE, CD45PerCP

BECTON-DICKINSON

2.2.8 Immunmodulierende Antigene

- BCG-medac
2x10⁸ - 3x10⁹ Einheiten von
BCG (Stamm RIVM); Pulver
medec GmbH
- Pokeweed Mitogen (PWM)
0,4 mg Protein/Flasche
BIOCHROM AG
- Tetanol® pur
Konservierungsmittelfreier
Tetanus-Toxoid-Absorbat-
Impfstoff mind. 40 I.E./ 0,5 ml
Chiron Vaccines Behring
- Tuberkulin PD RT 23 SSI
enthält 0,4 µg/ ml Tuberkulin
PPD (purified protein derivative)
STATENS SERUM INSTITUT

2.2.9 Fullerene

- Polyhydroxy-C60
Catalog: BD-301 *Bucky USA*
- N-ethyl-polyamino-C60
Catalog: BD-302 *Bucky USA*

2.2.10 Endotoxin Detections Test

- Limulus Amebocyte Lysate
PYROGENT® Plus Single Test Kit
CAMBREX / Lonza

2.2.11 Verbrauchsmaterialien/Geräte

- BLUE MAX™ 50 ml,
Konische Röhrchen, Polypropylen *Becton Dickinson Labware*
- Cellstar® Zellkulturröhrchen, 12ml,steril *Greiner*
- Cellstar® Zellkulturplatte 24well, steril *Greiner*
- Glasfiberfilter *Wollac*
- Einmalpipetten 5ml, 10 ml, 25ml *Becton Dickinson Labware*
- Pipetten 10µl, 100µl, 1000µl *Eppendorf*
- NUNCLON™ 96well Zellkulturplatte *Nalge Nunc International*
- BD Falcon™ 5 ml
Rundbodenröhrchen, Polystyrol *BD Biosciences*
- Zentrifuge Rotixa *Hettich*
- Centrifuge 5810 *Eppendorf*
- Neubauer-Zählkammer *Assistent*
- Fluoreszenzmikroskop *Ernst Leitz*
- CO2-Brutschrank *Forma Scientific*
- LKB Wallac 1205 Betaplate® Liquid Scintillation Counter
- SKATRON Combi Cell Harvester
- BD FACSCalibur™- Durchflusszytometer

2.3 Methoden

2.3.1 Probengewinnung

Den Spendern wurden jeweils 120 ml venöses Blut mit Hilfe eines Butterflys entnommen. Dem Blut wurden 25 IE Heparin pro Milliliter beigefügt um die Gerinnung zu unterbinden. Die Entnahme fand zeitnah, aber max. 12 Stunden vor der Verwertung statt, um möglichst vitale Zellen zu verwenden.

2.3.2 Isolierung von Peripheral Blood Mononuclear Cells

Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes der Spender wurden unter sterilen Bedingungen mit Hilfe einer Ficoll- Hypaque- Dichtegradientenzentrifugation gewonnen.

In separaten Blaukopfröhrchen(50 ml) wurden jeweils 30 ml des Spenderblutes mit 5 ml HBSS verdünnt und vorsichtig auf 15 ml Biocoll Separating Solution in einem weiteren Blaukopfröhrchen überschichtet. Die 4 daraus resultierenden Blaukopfröhrchen pro Spender wurden bei 740 g 30 Minuten zentrifugiert. Dabei entstand zwischen der mit Erythrozyten und Granulozyten angereicherten Trennmediumsschicht und dem Plasma eine Grenzschicht, welche die peripheren mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) enthält. Diese Grenzschicht wurde vollständig in ein neues Blaukopfröhrchen überpipettiert und mit HBSS auf 50 ml aufgefüllt. Diese Verdünnung wurde bei 370 g 10 Minuten zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde verworfen. Das Zellsediment wurde erneut mit HBSS auf 25 ml aufgefüllt und bei 370 g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Zellsediment mit 1ml RPMI 1640 Medium pro 10 ml eingesetztem Blut resuspendiert.

2.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellzahl der Suspension zu bestimmen, wurden jeweils 20 µl der Zellsuspension mit 180 µl Acridin-Orange vermengt und in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Anschließend wurden die Lymphozyten bei 16facher Vergrößerung ausgezählt. Dazu wurden 4 Quadranten mit grober Rasterung à 16 Felder ausgezählt. Der Durchschnitt der 4 Quadranten wurde durch 10 geteilt und ergibt die Zellzahl in Millionen pro Milliliter.

Um mit einheitlichen Zellkonzentrationen zu arbeiten, wurde bei jedem Ansatz die Zellzahlkonzentration mit RPMI 1640 Medium auf 1 Million Zellen pro Milliliter eingestellt.

2.3.4 Positiv- und Negativkontrolle, Antigentitration

Als Negativkontrolle wurde das Nährmedium RPMI 1640 verwendet. Die Positivkontrolle bestand aus 1:40 verdünntem Pokeweed Mitogen (PWM), einem polyklonalen Mitogen pflanzlichen Ursprungs (*Phytolacca americana*, Kermesbeere). PWM führt sowohl zur Aktivierung der B- als auch der T-Zellen.

Das Trockensubstrat des Tuberkuloseimpfstoffes BCG (Bacillus Calmette-Guérin), der hauptsächlich Makrophagen stimuliert, enthält pro Flasche 2×10^8 – 3×10^9 Einheiten von BCG. Dieses Substrat wurde in 5 ml RPMI aufgenommen und in eine

1:10 Verdünnung mit RPMI gebracht. Diese Verdünnung dient im Versuch als Antigen Nummer 1.

Das zweite Antigen wurde aus Tetanus-Toxoid hergestellt. Tetanus-Toxoid stimuliert hauptsächlich T_{H2}-Zellen und wurde hier in der Konzentration von 1,4 IE/ml eingesetzt.

Antigen Nummer 3 wurde aus dem überwiegend T_{H1}-Zellen stimulierenden Antigen PPD (tuberculin purified protein derivate) hergestellt. Dazu wurde die käuflich erworbene Lösung mit 2 T.E./0,1 ml verwendet. Diese Antigenkonzentrationen hatten sich in früheren Untersuchungen nach Verdünnungsreihen als optimal erwiesen (Barth et al. 2003 [19]).

2.3.5 Lösung und Konzentration der zu untersuchenden Medikamente

Von *Bucky USA* wurden jeweils 1 g Polyhydroxy-C60 und N-ethyl-polyamino-C60 bezogen. Davon wurden je 8 mg in 10 ml RPMI aufgenommen und im Ultraschallbad in Lösung gebracht. Die Suspension wurde steril filtriert und mit RPMI auf 800 ng/ml verdünnt. Diese Konzentrationsstufe, im Folgenden als Poly-1000 oder Nepo-1000 bezeichnet, wurde als höchste Konzentration verwendet. Die weiteren Konzentrationen waren: 80 ng/ml (Poly-/Nepo-100); 8 ng/ml (Poly-/Nepo-10); 0,8 ng/ml (Poly-/Nepo-1); 0,08 ng/ml (Poly-/Nepo-0,1).

2.3.6 Lymphozytentransformationstest (LTT)

Der Lymphozytentransformationstest dient der Analyse der durch spezifische Antigenreize induzierten Lymphozytenproliferation.

Für den Lymphozytentransformationstest wurden in 96 Well Mikrotiterplatten für jede Konzentrationsstufe der Fullerene jeweils mit jedem Antigen, der Negativkontrolle und der Positivkontrolle vier Ansätze hergestellt. Dazu wurden 100 µl Zellsuspension 50 µl Spenderplasma und 50 µl Antigen / Negativkontrolle / Positivkontrolle / Fulleren oder je 25 µl Fulleren und Antigen/Negativkontrolle/Positivkontrolle pro Ansatz verwendet. Diese wurden für eine Woche bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Sechzehn Stunden vor Ablauf der Inkubationszeit wurden die Ansätze mit ³H-Thymidin (0,74 MBq/ml, 20 µl/Ansatz) beimpft. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Ansätze

mit dem SKATRON Combi Cell Harvester geerntet. Dieser übertrug die radioaktiv markierten Zellen auf Filtermatten, die daraufhin mindestens 3 h getrocknet wurden. Danach wurden die Filtermatten mit einer Schutzfolie überzogen und in Szintillationsflüssigkeit (ULTIMA Gold) getränkt. In dem LKB Wallac 1205 Betaplate® Liquid Scintillation Counter wurde die von den markierten Zellen ausgehende β -Strahlung gemessen. Als Maß für die proliferative Aktivität der Zellkulturen diente die kalkulierte Zählrate (ccpm). Um einen vergleichbaren Wert bei unterschiedlichen Spontanproliferationen zu bekommen, wurde der Stimulationsindex (SI) berechnet. Dieser setzt sich zusammen aus dem Mittelwert der Zählraten der Zellkulturen mit Antigenstimulation/Positivkontrolle geteilt durch den Mittelwert der Zählraten der Zellkulturen ohne Antigenstimulation.

2.3.7 Proliferationskinetik

Es wurde ein spezieller Ansatz durchgeführt, bei dem von einem Spender mehrere Proliferationsansätze (LTT) hergestellt wurden. Sie wurden wie in Abschnitt 2.3.6 angesetzt, aber die Inkubationszeit betrug 3, 5, 7 und 9 Tage. Jeweils 16 Stunden vor Ablauf wurden die Zellen mit ^3H -Thymidin markiert und wie in Abschnitt 2.3.6 geerntet und ausgewertet.

2.3.8 Durchflusszytometrische Bestimmung CD69 aktiver Zellen

Für die Durchflusszytometrie wurde in 24 Well Mikrotiterplatten für jede Konzentrationsstufe der Medikamente jeweils mit jedem Antigen (BCG, Tetanus-Toxid, PPD), der Negativkontrolle und der Positivkontrolle ein Ansatz hergestellt. Dazu wurden 800 μl Zellsuspension, 400 μl Spenderplasma und 400 μl Antigen/Negativkontrolle/Positivkontrolle/Medikament oder je 200 μl Medikament und Antigen/Negativkontrolle/Positivkontrolle pro Ansatz verwendet. Diese wurden für einen Tag bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Kulturen in Rundbodenröhrchen überführt und die Zellen bei 370 g abzentrifugiert, zwei Mal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend wieder in 500 μl Waschpuffer resuspendiert. Von diesen 500 μl Suspension wurden jeweils 100 μl in zuvor mit den jeweiligen Antikörpersuspensionen beimpfte Rundbodenröhrchen

überführt. Ein Rundbodenröhrchen enthielt pro Ansatz die drei Isotypenkontrollen. Zwei Rundbodenröhrchen enthielten pro Ansatz die Antikörper gegen entweder CD4 oder CD8, plus Antikörper gegen CD69 und CD3. Die letzten zwei Röhrchen enthielten Antikörper gegen entweder CD19 oder CD56, plus Antikörper gegen CD69 und CD45. Diese Antikörperbindungsreaktion wurde nach 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln mit Waschpuffer abgestoppt. Nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden die antikörpermarkierten Zellen in 150 µl Waschpuffer aufgenommen und mit 50 µl BD CellFIX fixiert. Im BD FACSCalibur™-Durchflusszytometer wurden die Emissionen der drei fluoreszierenden, antikörpergekoppelten Farbstoffe (FITC, Pe, PerCP) gemessen. Es wurden pro Röhrchen/Messung 10000 Zellen ausgezählt und die Ergebnisse mit BD CellQuest Pro ausgewertet.

CD69 ist ein Oberflächenmarker, der speziell bei aktivierten Leukozyten exprimiert wird. Mit seiner Hilfe lässt sich der Anteil an aktivierten Zellen einer Leukozyten-Subpopulation bestimmen. Borges beschrieb 2007, dass CD69 sehr früh nach Stimulierung exprimiert wird [20]. Daher wurde die durchflusszytometrische Analyse der Zellen nach einer Kulturdauer von 24 Stunden durchgeführt. Dabei wurde der Quotient aus dem Anteil CD69+ und der jeweiligen Subpopulation-spezifischen CD positiven (CD4+, CD8+, CD19+, CD56+) Zellen geteilt durch den Gesamtanteil der Subpopulation errechnet. Dadurch ließ sich der Anteil an aktivierten Zellen in der jeweiligen Subpopulation mit oder ohne Stimulierung errechnen. Dabei wurde ausschließlich auf die Veränderung des Anteils aktivierter Zellen geachtet und nicht auf Änderungen der Subpopulationsanteile untereinander, da dies eine Proliferation voraussetzen würde. Diese ist aber nach der kurzen Inkubationszeit zufällig und nicht erwartet, wie auch bei Borges beschrieben [20].

Bei der Bestimmung mit der Durchflusszytometrie wurden die zu betrachtenden Lymphozyten auf Grund ihrer Größe und ihrer Oberflächenstruktur mit Hilfe von Lichtbrechung (Forward-Scatter, Side-Scatter) klar von den anderen PBMC's abgegrenzt und im Punktdiagramm als Kolonie deutlich dargestellt. Diese Kolonie wurde mit einem Gate markiert und für die Auswertung der durch die fluoreszierenden Antikörper markierten Zellen herangezogen.

2.3.9 Zytokin-ELISA

Für die Bestimmung der Zytokine in den PBMC-Überständen wurde in 24 Well Mikrotiterplatten für jede Konzentrationsstufe der Medikamente jeweils mit jedem Antigen, der Negativkontrolle und der Positivkontrolle ein Ansatz hergestellt. Dazu wurden 800 µl Zellsuspension, 400 µl Spenderplasma und 400 µl Antigen/Negativkontrolle/Positivkontrolle/Fulleren oder je 200 µl Fulleren und Antigen/Negativkontrolle/Positivkontrolle pro Ansatz verwendet. Diese wurden für eine Woche bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurde der flüssige Überstand der Ansätze abpipettiert und bei -20 °C eingefroren.

Die Zytokin-Antikörper wurden nach den Herstellerangaben mit Bicarbonatpuffer verdünnt auf 96 Well Mikrotiterplatten à 100 µl aufgetragen. Die so beschichteten Platten wurden für einen Tag bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Platten drei mal mit Waschpuffer gewaschen und verblieben für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur im Waschpuffer. Danach wurden die Platten mit je 75 µl der aufgetauten, zu untersuchenden Überstände beschichtet und im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ für 2 Stunden inkubiert. Auf jeder Platte wurden Standardverdünnungsreihen in acht Konzentrationen aufgetragen um bei der anschließenden photometrischen Bestimmung Vergleichswerte zu haben. Nach der 2-stündigen Inkubationszeit wurden die Platten erneut dreimal gewaschen. Danach wurden pro Well 100 µl biotinylierte Antikörpersuspension zugegeben. Nach erneuter Inkubation im Brutschrank für 1,5 Stunden wurden 25 µl Avidin-gekoppelte Peroxidase (2,5 µg/ml Waschpuffer) zugegeben und nochmals im Brutschrank für 40 Minuten inkubiert. Anschließend wurden pro Well 150 µl Substratlösung (0,5 mg O-Phenylendiamin/ml Citratpuffer) zugeführt und die darauf einsetzende, farblich sichtbare enzymatische Reaktion je nach Geschwindigkeit individuell mit 25%iger Schwefelsäure abgestoppt.

Anschließend wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm in einem ELISA-Reader gemessen und mit dem Programm Easyfit ausgewertet. Die gemessenen Extinktionen der Ansätze wurden in Relation zu den Extinktionen der Standardverdünnungsreihen gesetzt und in pg/ml für das jeweilige zu messende Zytokin angegeben (Norm- und Maximalwerte siehe Tabelle 3).

Zytokin	IL1- α	IL 6	TNF- α	TNF- β	INF- γ	IL 10	IL 5	IL 13	GMCSF
Normwerte	250	250	312	312	1250	156	469	330	312
Maximalwerte	8000	8000	10000	10000	40000	5000	14000	10000	10000

Tabelle 3: Normwerte und Maximalwerte der Zytokine in pg/ml.

2.3.10 Endotoxin Detection Test (LAL)

Der Endotoxin Detection Test dient der Untersuchung von Proben auf deren Verunreinigung oder Kontamination mit Endotoxinen. Der Test-Mechanismus basiert auf der Tatsache, dass Endotoxin ein Proenzym, das in den Amöbenzellen des *Limulus polyphemus* vorkommt, in eine Coagulase umwandelt, die wiederum Coagulogen in Coagulin verwandelt, was zur Agglutination führt [21, 22].

Dieser Test wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die mitgelieferte Positivkontrolle wurde in 1 ml sterilem Wasser gelöst und auf eine Konzentration von 0,06 EndotoxinUnits/ml verdünnt. Es wurden noch zweifach und einfach höhere und zweifach und einfach niedrigere Konzentrationen angesetzt. Von diesen Konzentrationen wurden jeweils 0,25ml in die fertig gelieferten Teströhrchen injiziert. Ebenso jeweils 0,25 ml der Ursprungslösung Poly-C60 und Nepo-C60 sowie jede zu testende Konzentrationsstufe der Medikamente in je ein Teströhrchen. Abschließend wurde noch ein Teströhrchen als Negativkontrolle mit 0,25 ml sterilem Wasser befüllt. Um auszuschließen, dass das verwendete Medium (RPMI) zu einer Reaktion führt, wurde noch ein Teströhrchen mit Medium befüllt. Alle Teströhrchen wurden bei 37°C für 60 min inkubiert und anschließend wurde das Testergebniss abgelesen. Dazu wurden die Teströhrchen um 180° invertiert und auf eine Agglutination geachtet.

Der Test wurde unter möglichst sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.4 Statistik

Die experimentell erhobenen Daten wurden digitalisiert, mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS Statistics in deskriptive Daten verarbeitet und mit Hilfe von nichtparametrischen Statistikttests ausgewertet. Als deskriptive Daten wurden der Mittelwert, der Median und die Standardabweichung aus den 20 Probandenwerten für jede Konzentration und jede Testvariante (Proliferation, Aktivität und Zytokinproduktion) errechnet. Aus den deskriptiven Daten wurde mit Hilfe des Wilcoxon-Testverfahrens die Signifikanz bestimmt. Als signifikant wurden Werte von $p < 0,05$ definiert. Signifikante Werte sind in den Schaubildern mit einem * gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Proliferationskinetik

Die Proliferationskinetik sollte Aufschluss über die Proliferation im Verhältnis zur Zeit geben. PBMC's eines Probanden wurden parallel mit Poly und Nepo inkubiert. Messungen erfolgten nach 3,5,7 und 9 Tagen.

Am 5. und 7. Tag waren die höchsten Proliferationsraten zu verzeichnen. Bis auf bei den Konzentrationsstufen Poly 0,1 Nepo 1000 Nepo 1 und Nepo 0,1 sowie der Negativkontrolle nahm die Proliferationsrate vom 5. bis zum 7. Tag bei allen anderen Konzentrationsstufen noch zu (Abbildung 6).

Daher wurde bei den weiteren Untersuchungen eine Inkubationszeit von 7 Tagen gewählt.

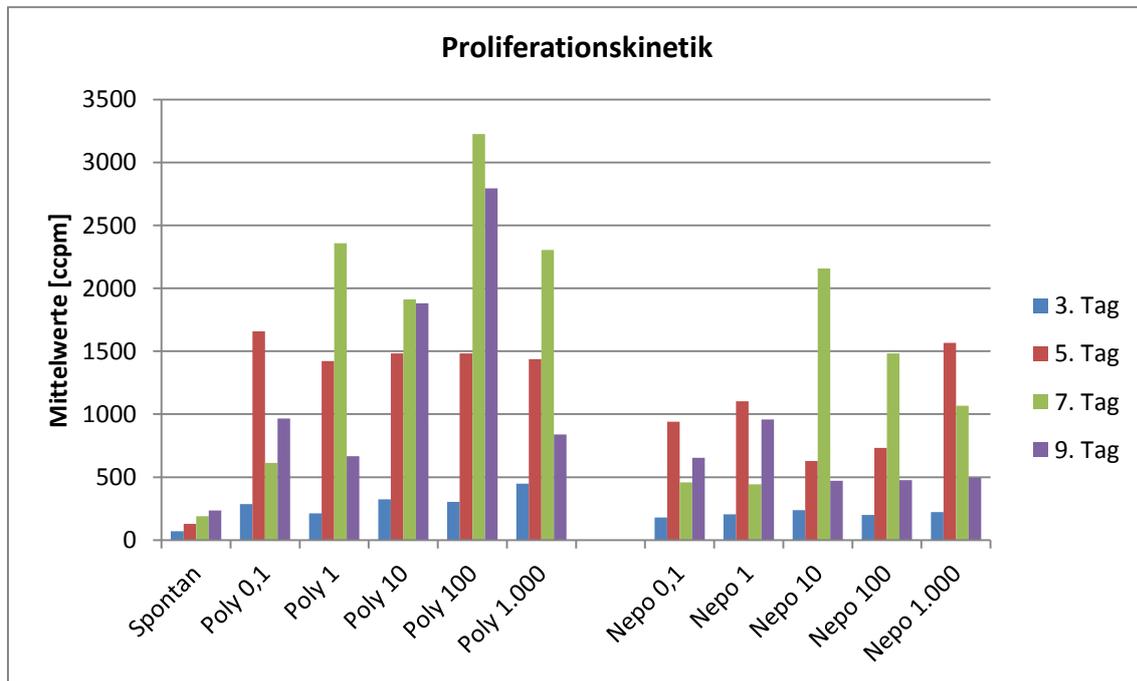


Abbildung 6: Proliferationskinetik der PBMC's bei verschiedener Kostimulation. Mittelwerte eines Probanden

3.2 Zellproliferation nach 7-tägiger Inkubation (LTT)

3.2.1 Einfluss von Poly-C60 und Nepo-C60 auf die Proliferation von PBMC ohne Kostimulation

Bei der Untersuchung der Proliferation ohne eine Kostimulation zeigte sich, dass bei den Poly-C60 Konzentrationen 1000, 100 und 10 die Proliferation signifikant gesteigert war. Nepo-C60 bewirkte in allen Konzentrationen eine signifikante Erhöhung der Proliferation (Abbildung 7). Durch unterschiedliche Spontanproliferationen einzelner Probanden kommt es hier bei der Anzahl von n=20 Probanden zu verhältnismäßig großen Standardabweichungen.

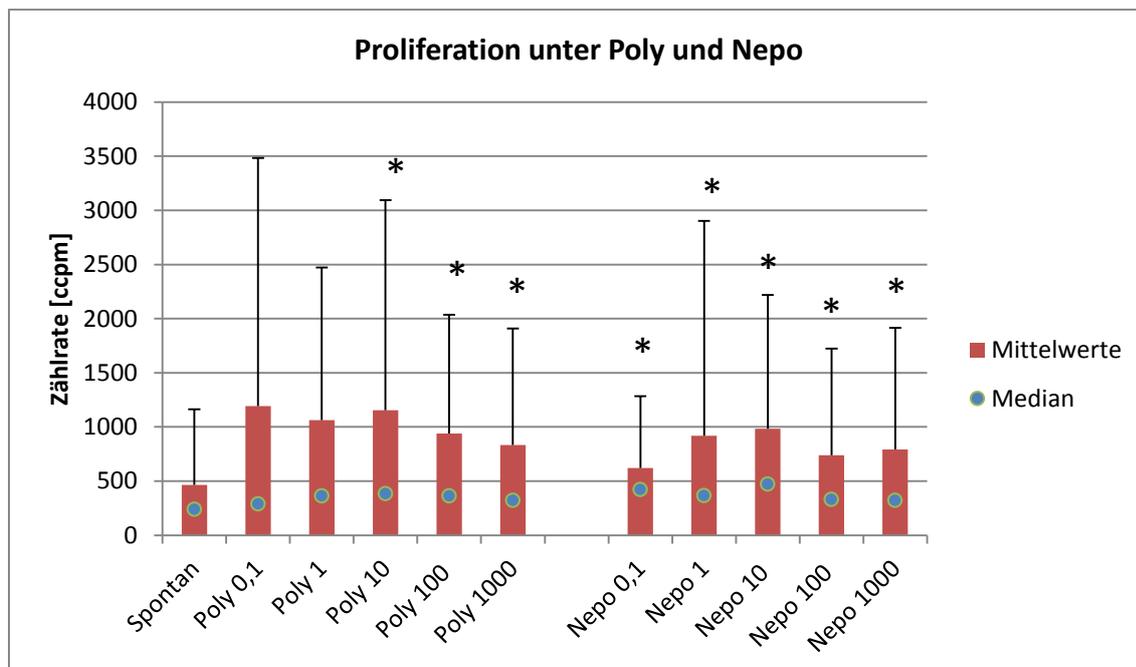


Abbildung 7: Beeinflussung der Proliferation von PBMC durch Poly-C60 und Nepo-C60 ohne Kostimulation. Gemittelte Werte von 20 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung. * p < 0,05 Signifikanzwert zur Spontanproliferation.

3.2.2 Einfluss von Poly-C60 und Nepo-C60 auf die BCG-induzierte Proliferation von PBMC

Die Kostimulation mit BCG zeigte im Vergleich zur Spontanproliferation einen signifikanten Anstieg. Poly/Nepo hatten aber keinen Einfluss auf diese BCG-induzierte Proliferation (Abbildung 8).

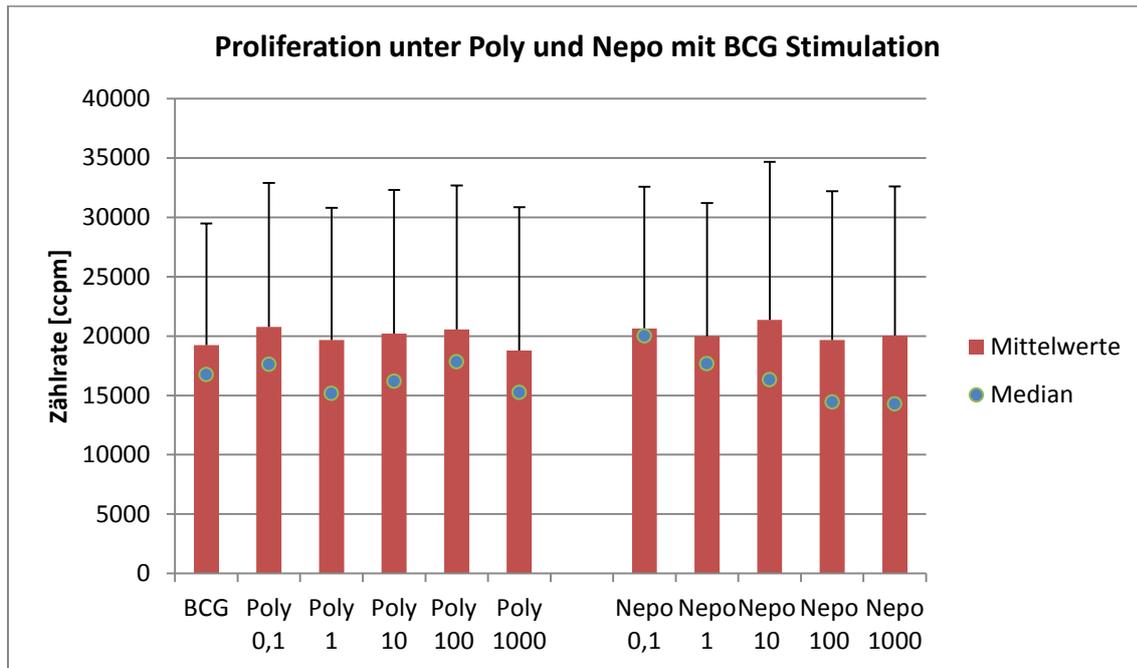


Abbildung 8: Beeinflussung der BCG-induzierten Proliferation von PBMC durch Poly-C60 und Nepo-C60. Gemittelte Werte von 20 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

3.2.3 Einfluss von Poly-C60 und Nepo-C60 auf die TT-induzierte Proliferation von PBMC

Beobachtet wurde eine signifikante Steigerung der TT-induzierten Proliferation im Vergleich zur Spontanproliferation, die aber weder durch Poly-C60 noch durch Nepo-C60 signifikant beeinflusst wurde (Abbildung 9).

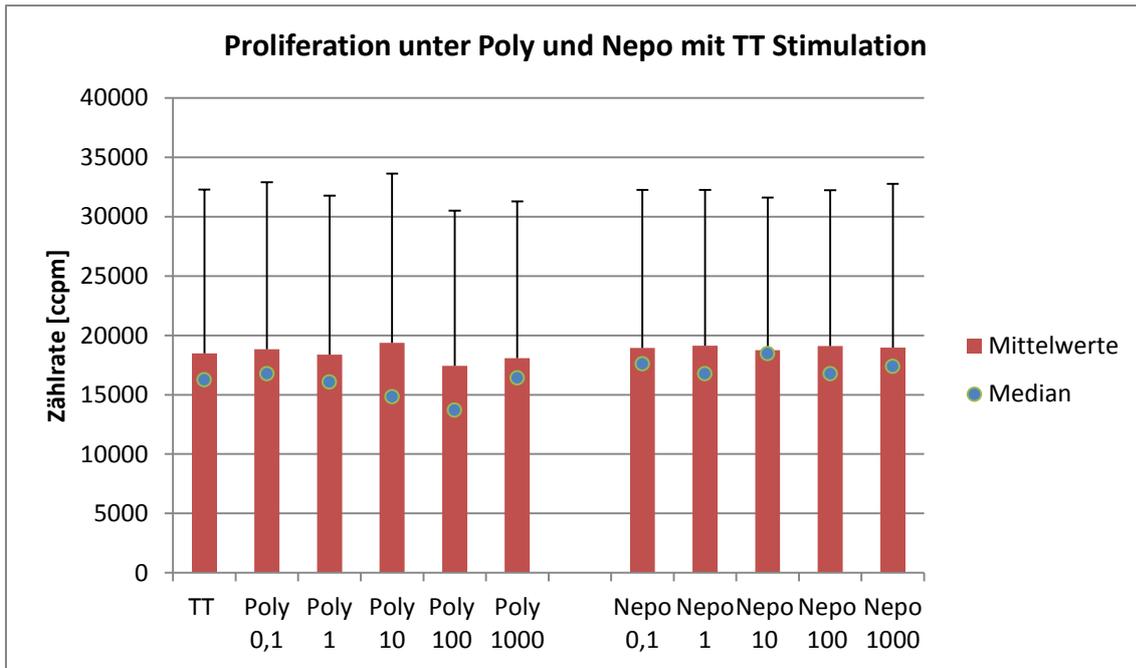


Abbildung 9: Beeinflussung der TT-induzierten Proliferation von PBMC durch Poly-C60 und Nepo-C60. Gemittelte Werte von 20 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

3.2.4 Einfluss von Poly-C60 und Nepo-C60 auf die PPD-induzierte Proliferation von PBMC

Die PPD-induzierte Proliferation wurde ebenfalls weder durch Poly-C60 noch durch Nepo-C60 signifikant beeinflusst (Abbildung 10).

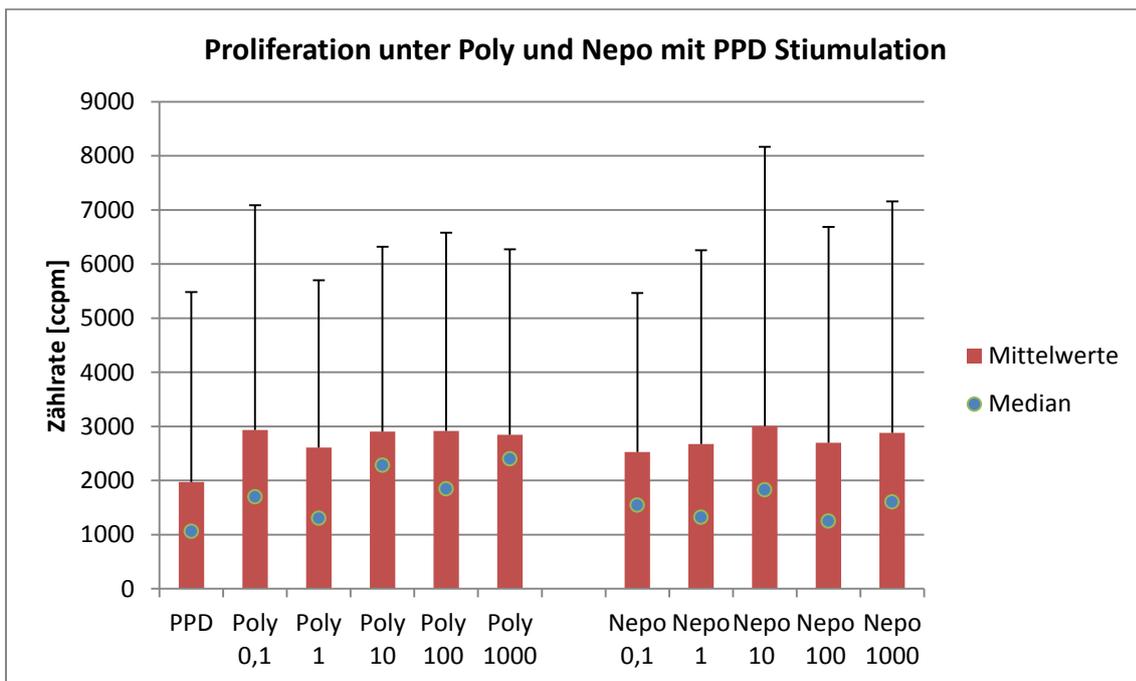


Abbildung 10: Beeinflussung der PPD-induzierten Proliferation von PBMC durch Poly-C60 und Nepo-C60. Gemittelte Werte von 20 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

3.3 Bestimmung der Zytokinproduktion

An Hand der Reaktion der PBMC der einzelnen Probanden auf die unterschiedliche Stimulierung lassen sich die Probanden in TH-Reaktionsmuster einteilen [23].

So werden Probanden, deren PBMC auf PPD Stimulierung mit einer IFN- γ oder TNF- β Sekretion reagieren dem T_H1-Typ zugerechnet. Bei Sezernierung von IL-5 oder IL-13 unter TT Stimulierung werden sie dem T_H2-Typ zugeschrieben. Zeigen Probanden eine Reaktion auf PPD und TT werden sie als Mischtyp bezeichnet. Zeigen die Probanden keine Reaktion auf PPD und TT so werden sie keinem Typ zugeschrieben.

Die Probanden dieser Arbeit zeigen folgende Typen:

Drei Probanden zeigten keine Reaktion auf PPD oder TT. Ein Proband ist dem T_H1-Muster zuzuordnen, Fünf Probanden zeigten ein T_H1/T_H2-Muster und elf Probanden konnten als T_H2-Typ klassifiziert werden.

3.3.1 Einfluss von Poly und Nepo auf die Produktion Makrophagen typischer Zytokine (IL-1 α , IL-6, TNF- α)

PBMC von fünf Probanden zeigten bereits spontan eine diskrete IL-1 α Produktion. Insgesamt wurde die IL-1 α Sekretion durch Poly-C60 und Nepo-C60 nicht signifikant beeinflusst (nicht dargestellt).

PBMC von drei Probanden sezernierten bereits spontan hohe Konzentrationen von IL-6. Diese wurden daher aus weiteren statistischen Analysen ausgeschlossen. Bei den übrigen 17 Probanden führte die Inkubation der PBMC mit Poly-C60 und Nepo-C60 zu einer signifikanten Steigerung der IL-6 Produktion (Abbildung 11).

Die TNF α -Produktion wurde durch Poly-C60 und Nepo-C60 nur bei einem Probanden angeregt. Auf die Gesamtheit bezogen ergab sich daher kein signifikanter Unterschied (hier nicht dargestellt).

Die BCG-induzierte IL-1 α , IL-6 und TNF α -Produktion von PBMC der 20 Probanden wurde weder durch Poly-C60 noch durch Nepo-C60 signifikant beeinflusst (Abbildung 12, für IL-1 α nicht dargestellt)

Ergebnisse

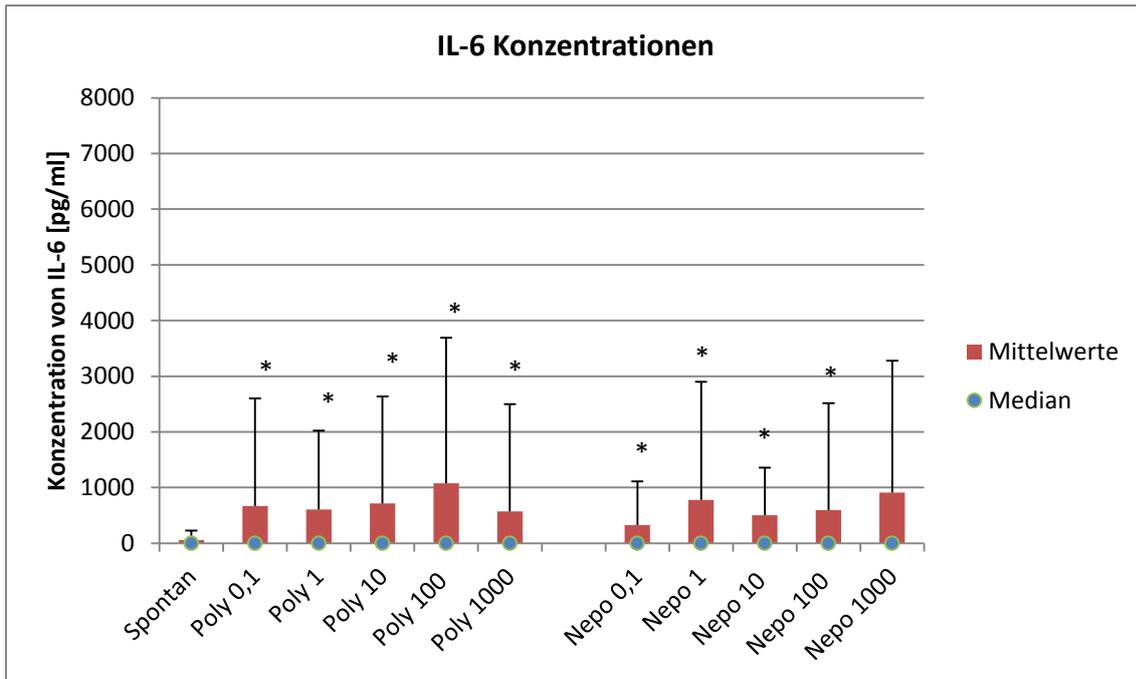


Abbildung 11: IL-6 Produktion durch PBMC nach sieben Tagen Inkubation mit Poly und Nepo. Gemittelte Werte von 17 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung. * $p < 0,05$ Signifikanzwert zur Spontankonzentration.

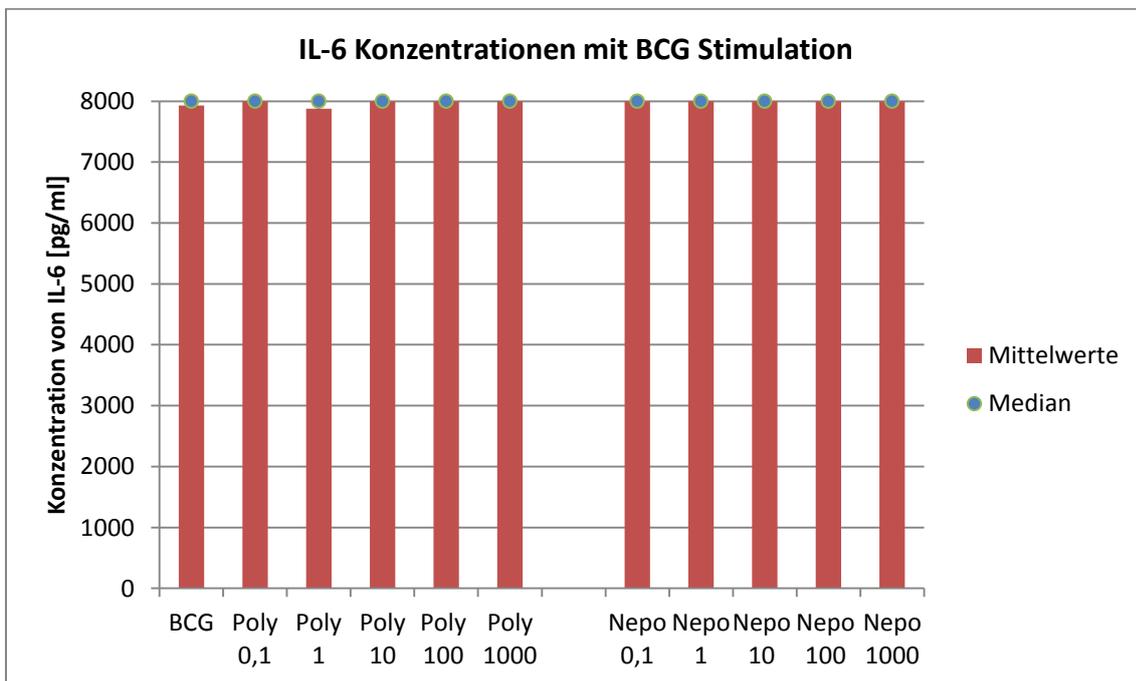


Abbildung 12: IL-6 Produktion durch PBMC nach sieben Tagen Inkubation mit Poly und Nepo unter BCG Kostimulation. Gemittelte Werte von 17 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

3.3.2 Einfluss von Poly und Nepo auf die Produktion T_H1 -typischer Zytokine (TNF- β , IFN- γ)

Analysiert wurde der Einfluss von Poly-C60 und Nepo-C60 auf die spontane sowie die durch das T_H1 -Antigen PPD induzierte Sekretion der T_H1 -Zytokine IFN- γ und TNF- β durch PBMC. Da PBMC von einem Probanden schon spontan die maximale Konzentration zeigten, wurde dieser aus der statistischen Analyse der Daten ausgeschlossen. Bei TNF- β wurden alle 20 Probanden in die Statistik einbezogen.

Die 19 Probanden zeigten unter Poly/Nepo im Vergleich zur Spontankonzentration nur vereinzelte erhöhte IFN- γ Werte. In der Gesamtheit fanden sich daher keine statistisch signifikanten Veränderungen (Abbildung 13). Bei TNF- β zeigte nur ein einzelner Proband bei der Konzentrationsstufe Nepo 100 einen gesteigerten Wert. Auch hier waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant.

Da IFN- γ auch durch Makrophagen produziert wird, führte die Inkubation der PBMC mit BCG ebenfalls zu einer starken IFN- γ Produktion, die aber durch Poly-C60 oder Nepo-C60 nicht signifikant verändert wurde (Abbildung 14).

Die PPD-induzierte IFN- γ oder TNF- β -Produktion von PBMC wurde durch Poly-C60 oder Nepo-C60 nicht beeinflusst (Abbildung 15).

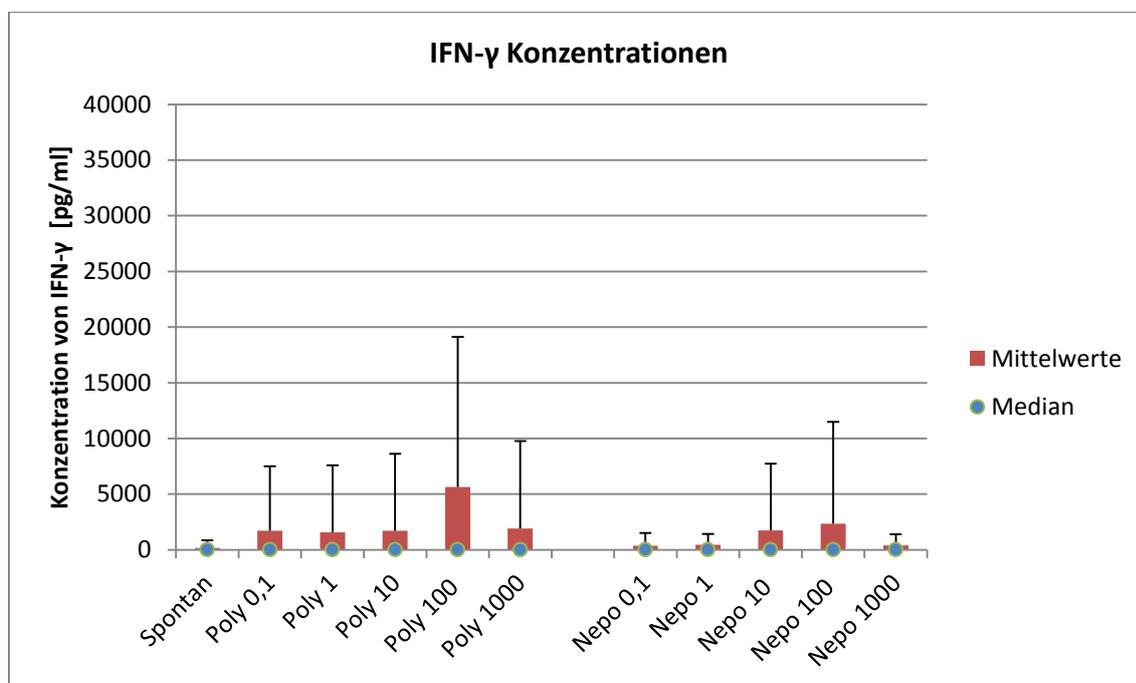


Abbildung 13: IFN- γ Produktion von PBMC nach sieben Tagen Inkubation mit Poly und Nepo. Gemittelte Werte von 19 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

Ergebnisse

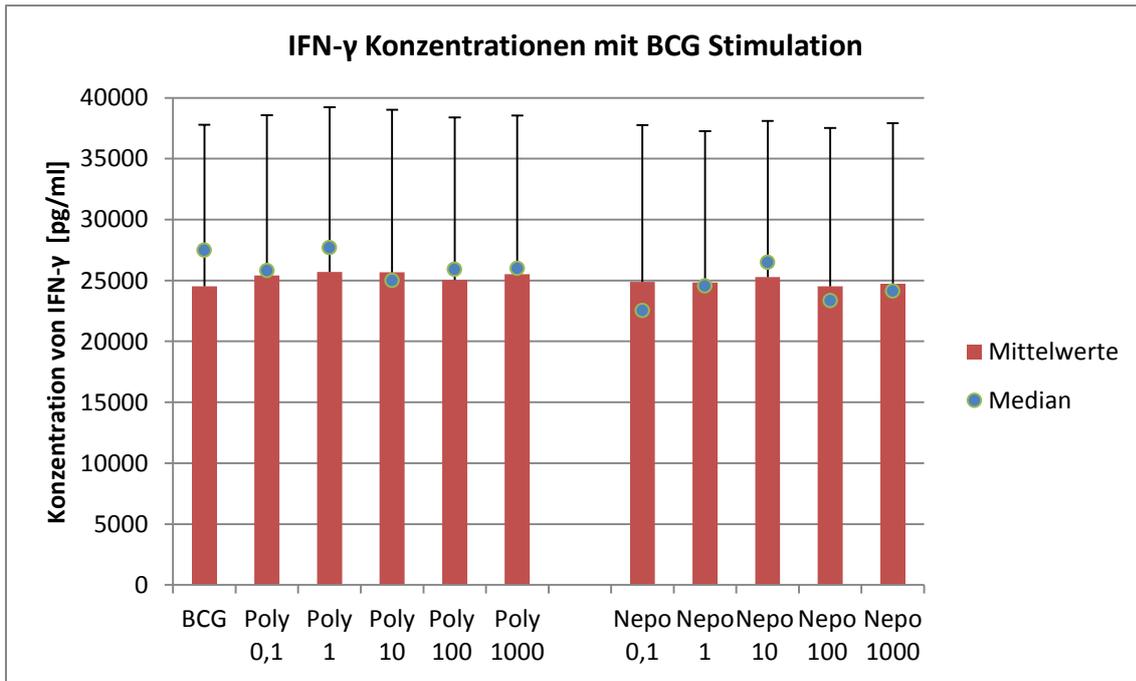


Abbildung 14: IFN- γ Produktion von PBMC nach sieben Tagen Inkubation mit Poly und Nepo unter BCG Kostimulation. Gemittelte Werte von 19 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

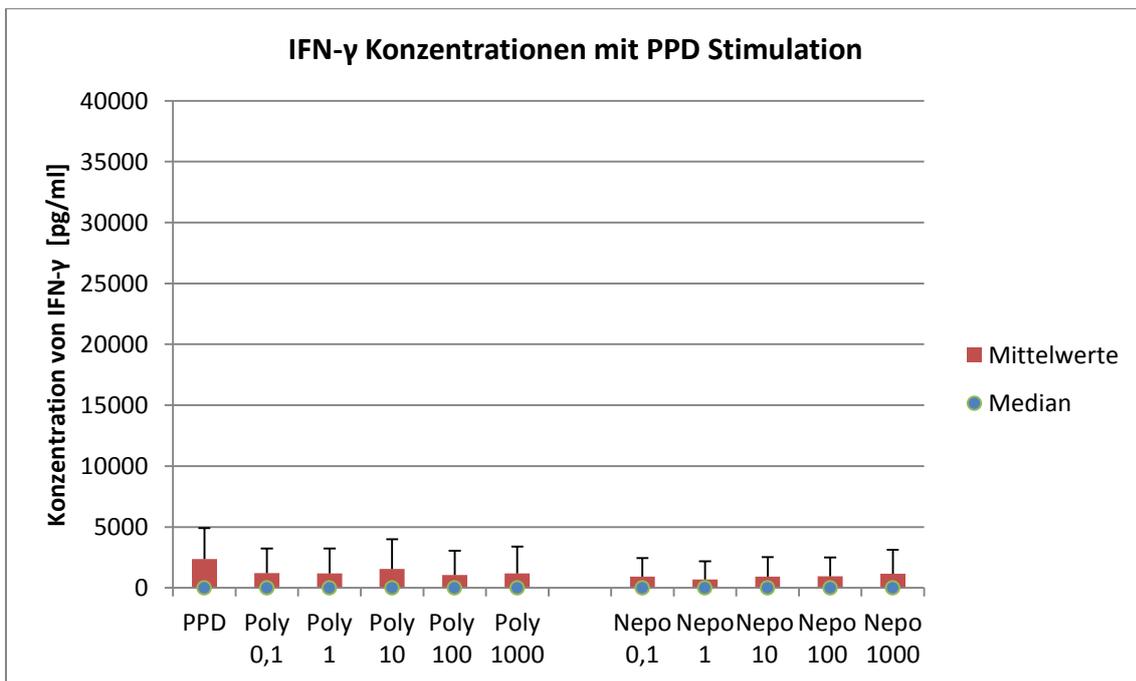


Abbildung 15: IFN- γ Produktion von PBMC nach sieben Tagen Inkubation mit Poly und Nepo unter PPD Kostimulation. Gemittelte Werte von 19 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

3.3.3 Einfluss von Poly und Nepo auf die Produktion T_H2 -typischer Zytokine (IL-5, IL-13)

Betrachtet wurde der Einfluss von Poly-C60 und Nepo-C60 auf die spontane sowie TT-induzierte Sekretion durch PBMC der 20 Probanden.

Auch auf die spontane IL-5 und IL-13 Produktion hatten die Substanzen keinen Effekt (Abbildung 16, Abbildung 17). Wie zu erwarten, führte die Inkubation der PBMC mit TT zu einer signifikanten Steigerung der IL-5 und IL-13 Produktion. Diese wurde aber durch Poly-C60/Nepo-C60 nicht beeinflusst (Abbildung 18, Abbildung 19).

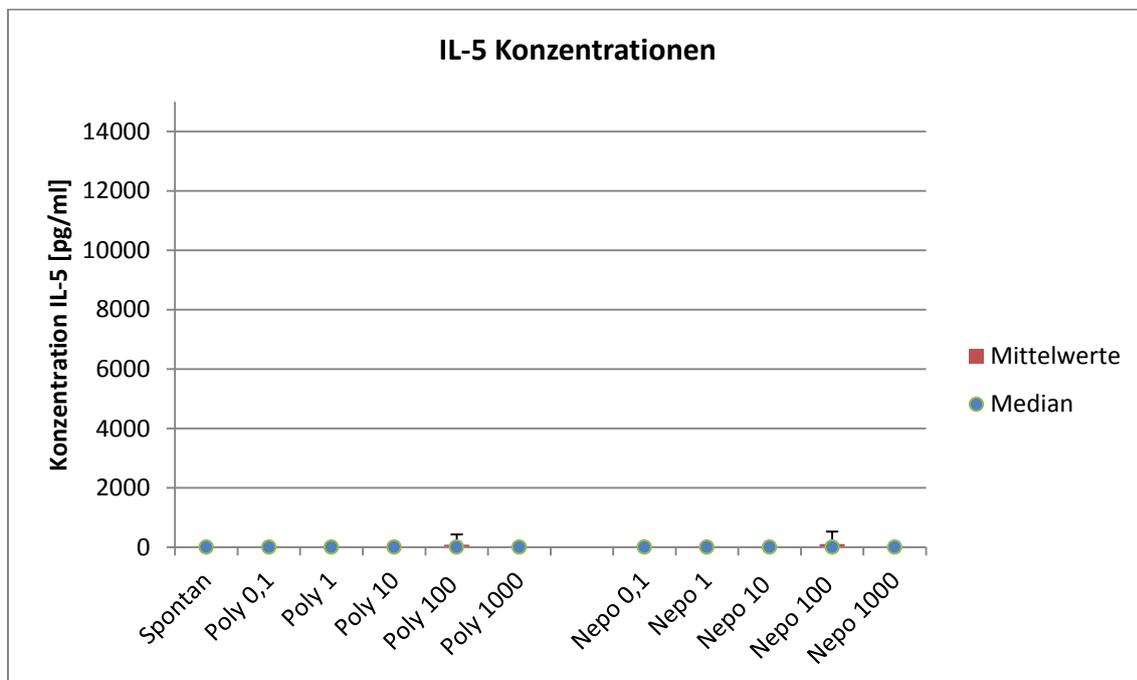


Abbildung 16: IL-5 Produktion von PBMC nach sieben Tagen Inkubation mit Poly und Nepo. Gemittelte Werte von 19 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

Ergebnisse

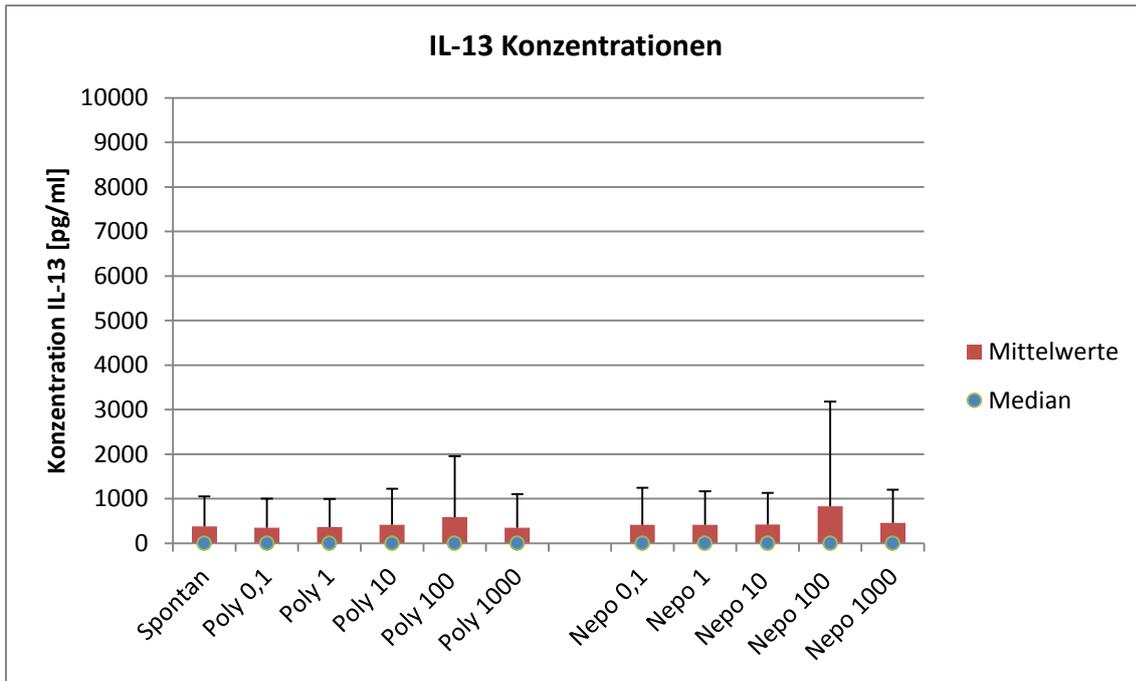


Abbildung 17: IL-13 Produktion von PBMC nach sieben Tagen Inkubation mit Poly und Nepo. Gemittelte Werte von 18 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

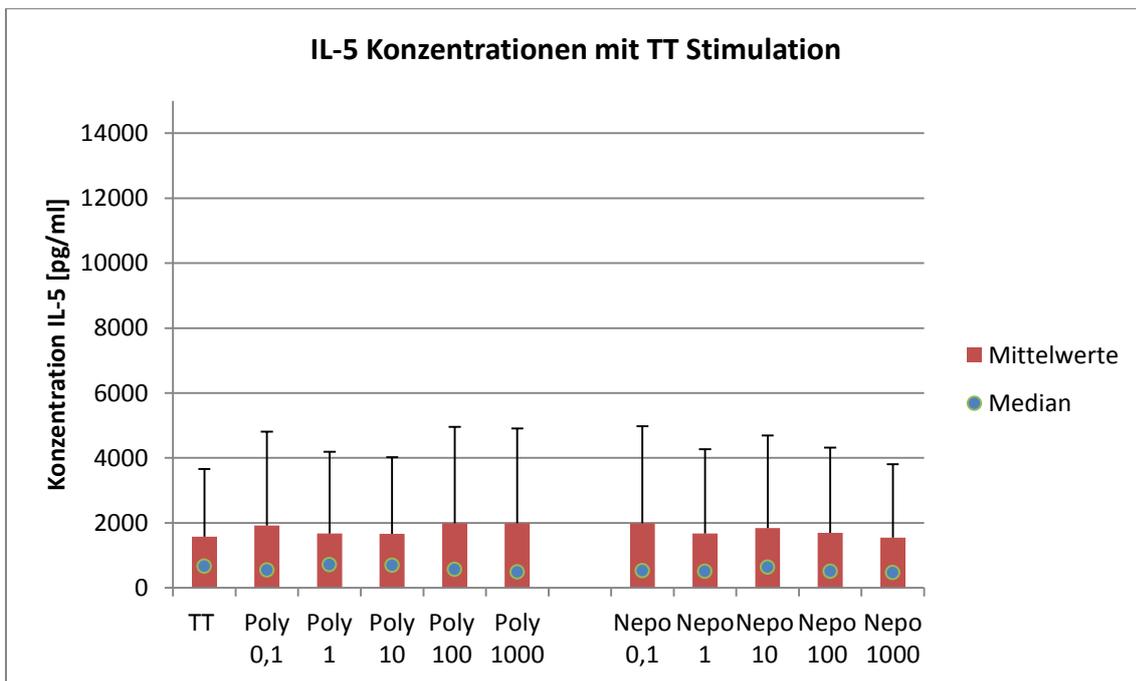


Abbildung 18: IL-5 Produktion von PBMC nach sieben Tagen Inkubation mit Poly und Nepo unter TT Kostimulation. Gemittelte Werte von 19 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

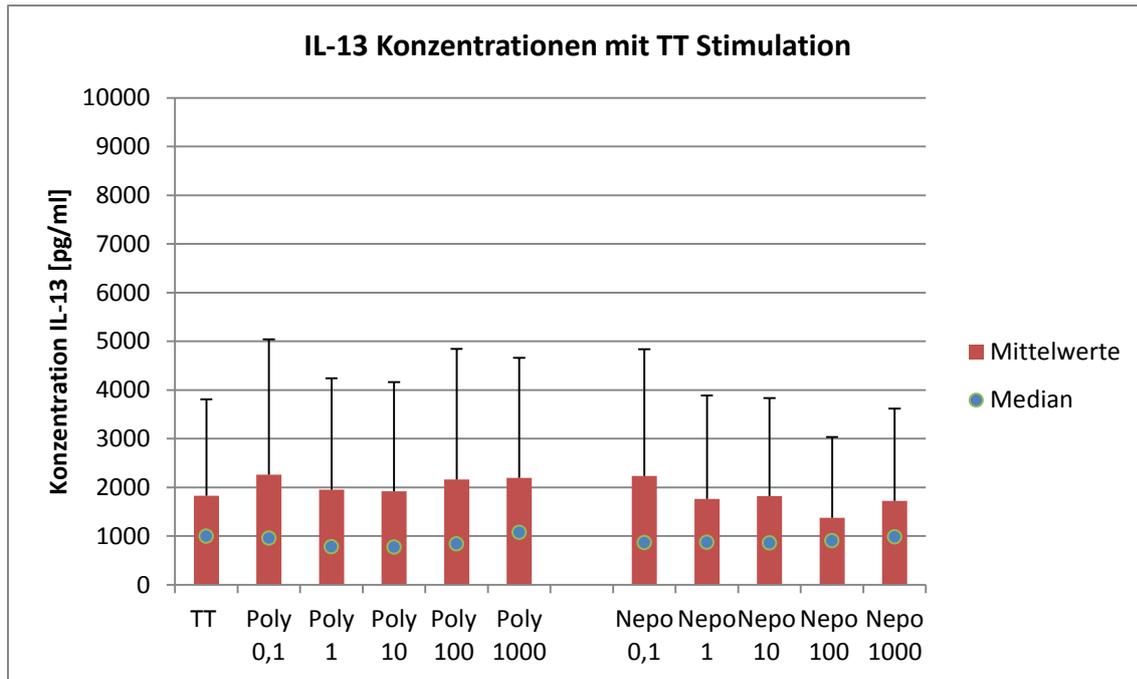


Abbildung 19: IL-13 Produktion von PBMC nach sieben Tagen Inkubation mit Poly und Nepo unter TT Kostimulation. Gemittelte Werte von 18 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

3.3.4 Einfluss von Poly und Nepo auf die Produktion von Interleukin 10 (IL-10)

Interleukin 10 wurde durch PBMC von 6 Probanden bereits spontan in einer niedrigen Konzentration sezerniert. PBMC von 2 Probanden zeigten eine starke Spontanproduktion (3110 pg/ml und 5000 pg/ml). Sie wurden daher aus der statistischen Analyse ausgeschlossen.

Bei der statistischen Betrachtung zeigte sich, dass Poly und Nepo keinen signifikanten Einfluss auf die spontane oder Antigen-induzierte (BCG, TT, PPD) IL-10 Produktion haben (Abbildung 20 - Abbildung 23).

Ergebnisse

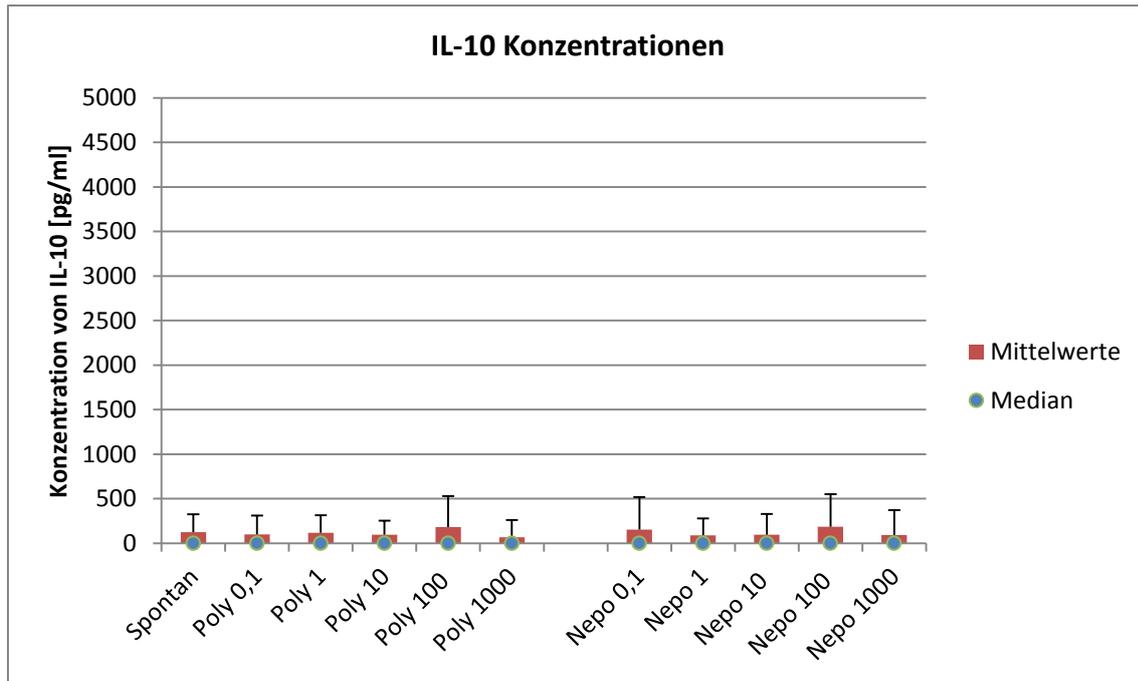


Abbildung 20: IL-10 Produktion von PBMC nach sieben Tagen Inkubation mit Poly und Nepo. Gemittelte Werte von 18 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

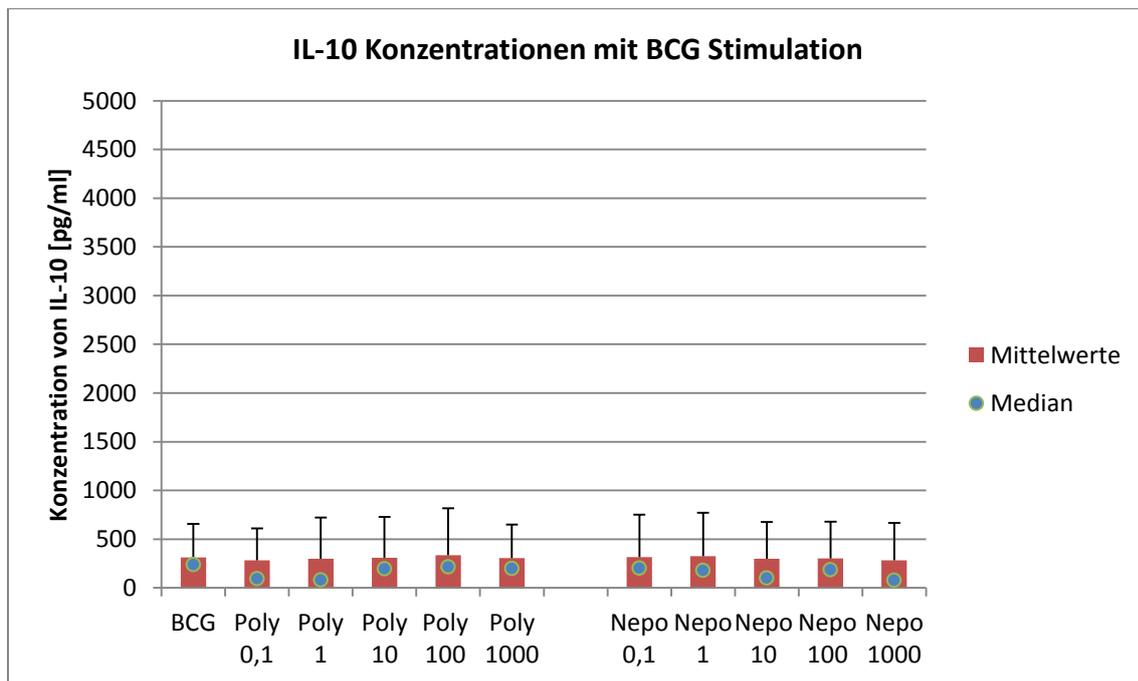


Abbildung 21: IL-10 Produktion von PBMC nach sieben Tagen Inkubation mit Poly und Nepo unter BCG Kostimulation. Gemittelte Werte von 18 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

Ergebnisse

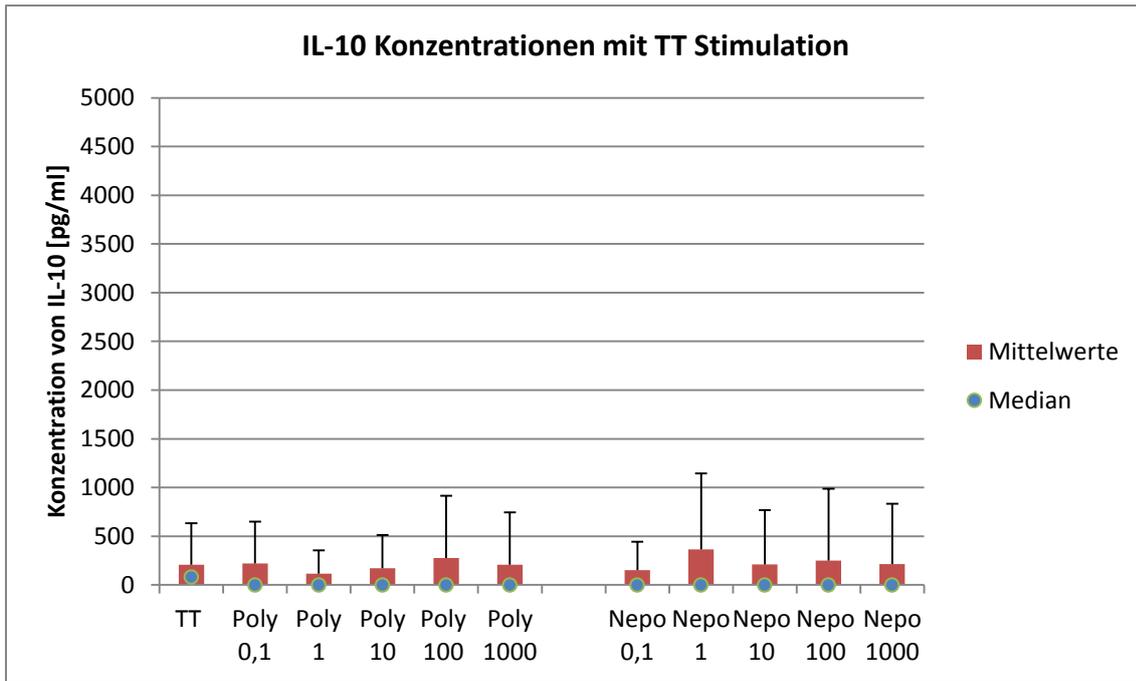


Abbildung 22: IL-10 Produktion von PBMC nach sieben Tagen Inkubation mit Poly und Nepo unter TT Kostimulation. Gemittelte Werte von 18 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

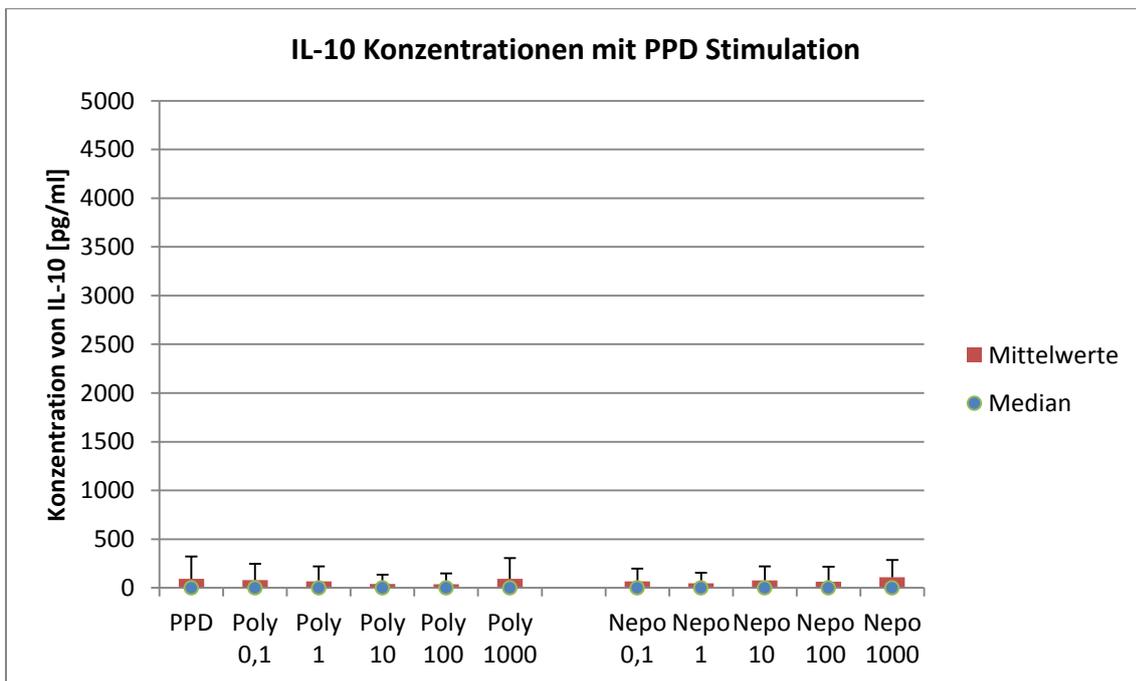


Abbildung 23: IL-10 Produktion von PBMC nach sieben Tagen Inkubation mit Poly und Nepo unter PPD Kostimulation. Gemittelte Werte von 18 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

3.3.5 Einfluss von Poly und Nepo auf die Produktion von GM-CSF

Die spontane Produktion von GM-CSF durch PBMC wurde durch Poly und Nepo nicht signifikant beeinflusst. Nur bei einzelnen Probanden gab es Konzentrationserhöhungen, die zu unterschiedlich stark erhöhten Standardabweichungen führten (Abbildung 24).

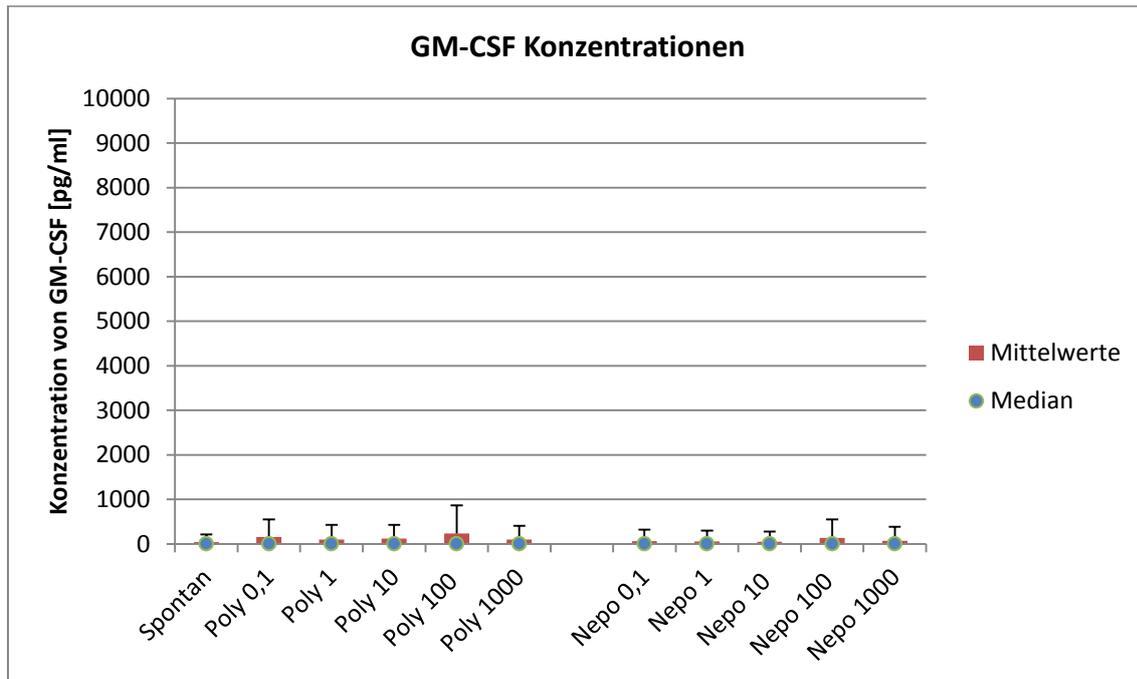


Abbildung 24: GM-CSF Produktion von PBMC nach sieben Tagen Inkubation mit Poly und Nepo Gemittelte Werte von 20 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

Auch die BCG-, TT-, PPD-induzierte GM-CSF Produktion wurde durch Poly oder Nepo nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 25 - 27).

Ergebnisse

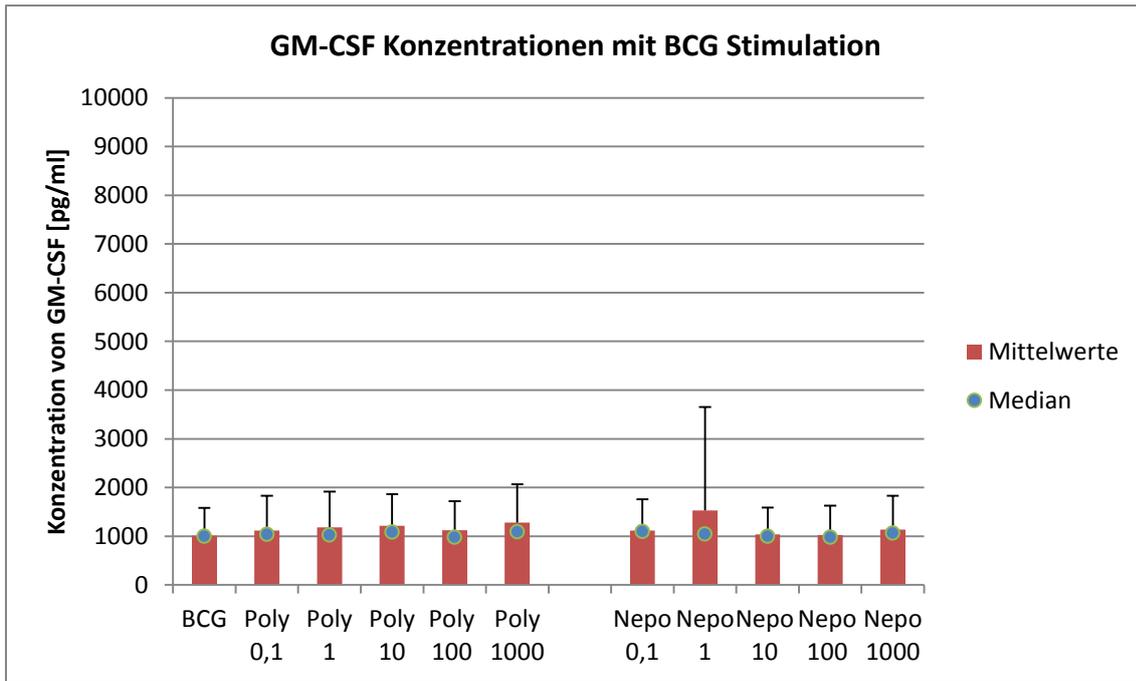


Abbildung 25: GM-CSF Produktion von PBMC nach sieben Tagen Inkubation mit Poly und Nepo unter BCG Kostimulation. Gemittelte Werte von 20 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

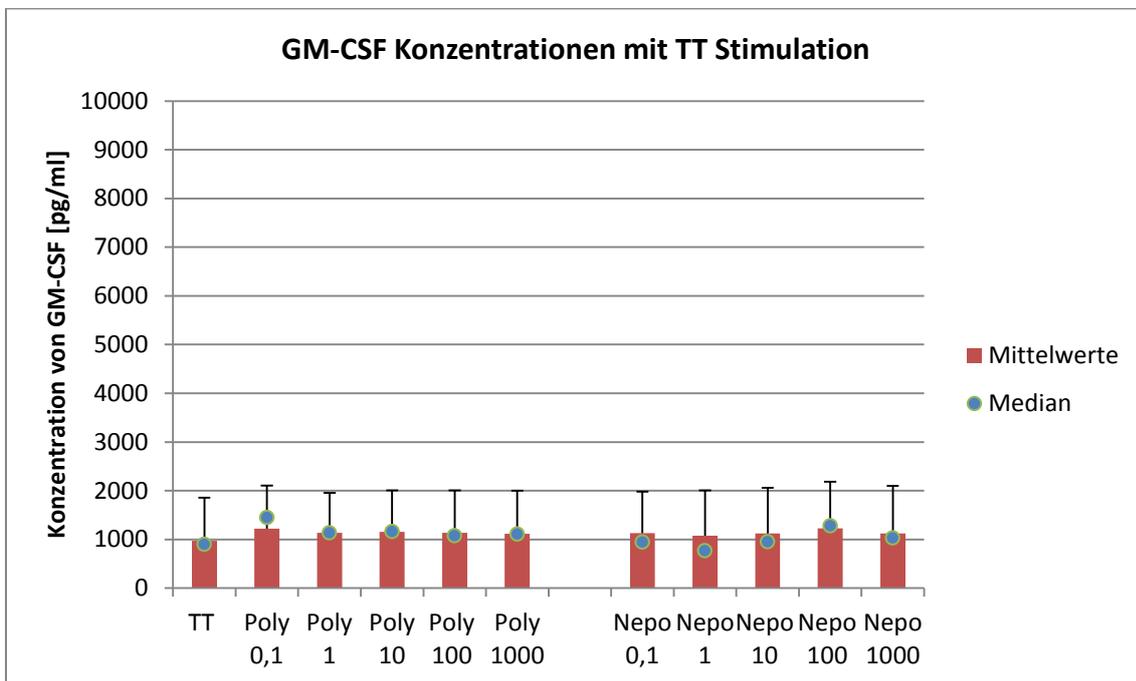


Abbildung 26: GM-CSF Produktion von PBMC nach sieben Tagen Inkubation mit Poly und Nepo unter TT Kostimulation. Gemittelte Werte von 20 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

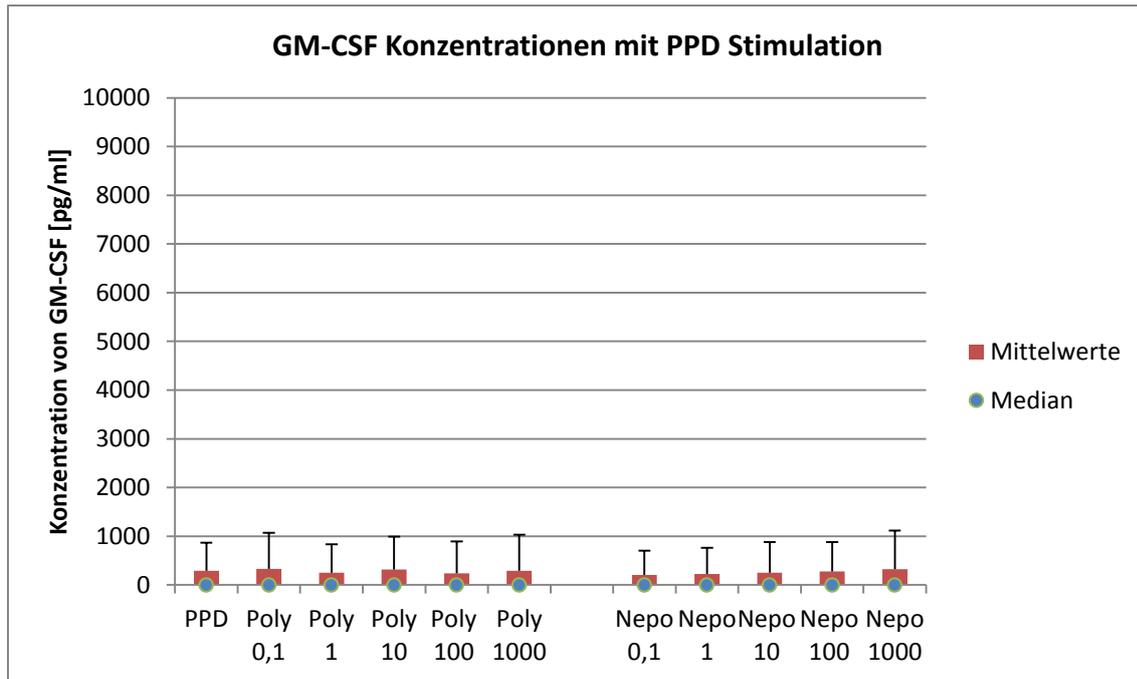


Abbildung 27: GM-CSF Produktion von PBMC nach sieben Tagen Inkubation mit Poly und Nepo unter PPD Kostimulation. Gemittelte Werte von 20 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

3.4 Einfluss von Poly und Nepo auf die Expression von CD69 durch PBMC

3.4.1 Einfluss von Poly und Nepo auf die CD69-Expression von CD3+ und CD4+ Zellen

Poly oder Nepo hatten keinen Einfluss auf die CD69-Expression von CD4+ Zellen nicht zu einer signifikanten Verstärkung oder Erniedrigung der Spontanaktivierung. Die Standardabweichungen sind bei max. ~ 1%-Punkt. Ein Proband zeigte eine Aktivierung von 15 % bei der Spontan-Kontrolle (Abbildung 28). Dadurch erklärt sich die deutlich erhöhte Standardabweichung in diesem Fall. Hier nicht dargestellt, ließ sich mit der Positivkontrolle (Stimulierung mit PWM) eine hochsignifikante Erhöhung des aktivierten Anteils CD4+ Zellen zeigen.

Ergebnisse

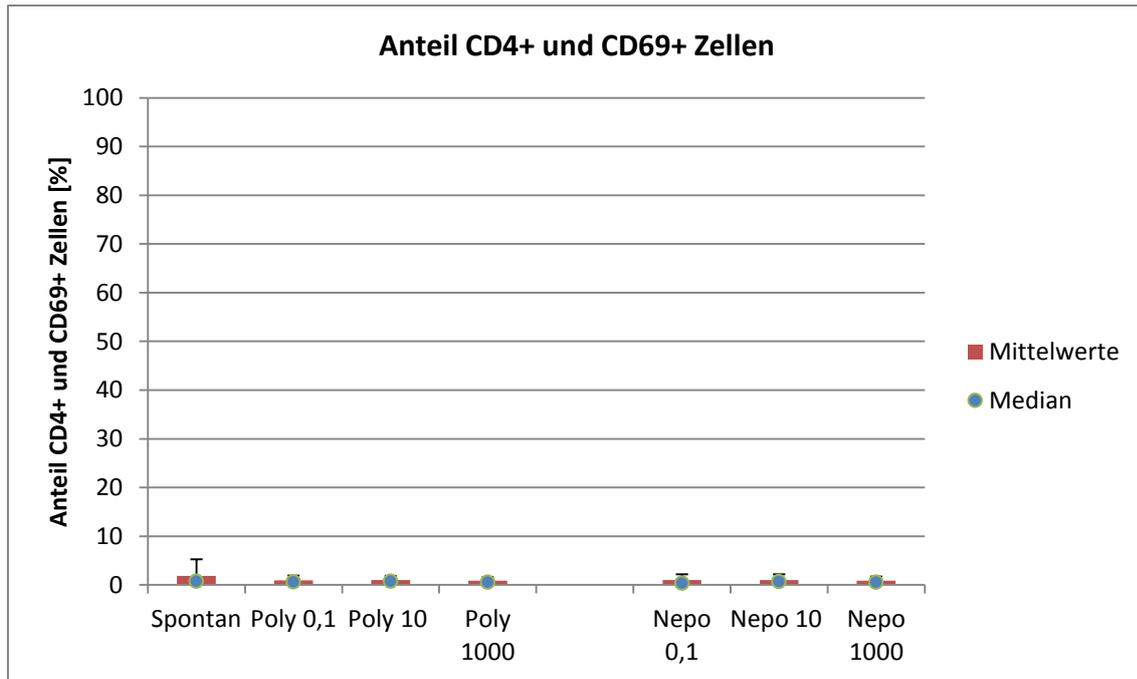


Abbildung 28: Anteil der aktivierten CD69+ Zellen am Gesamtanteil der CD4+ T-Helferzellen unter Einfluss von Poly und Nepo. Gemittelte Werte von 20 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

Auch nach Kostimulation mit BCG, TT und PPD ergab sich keine signifikante Veränderung der CD69-Expression. (Abbildung 29 - 31).

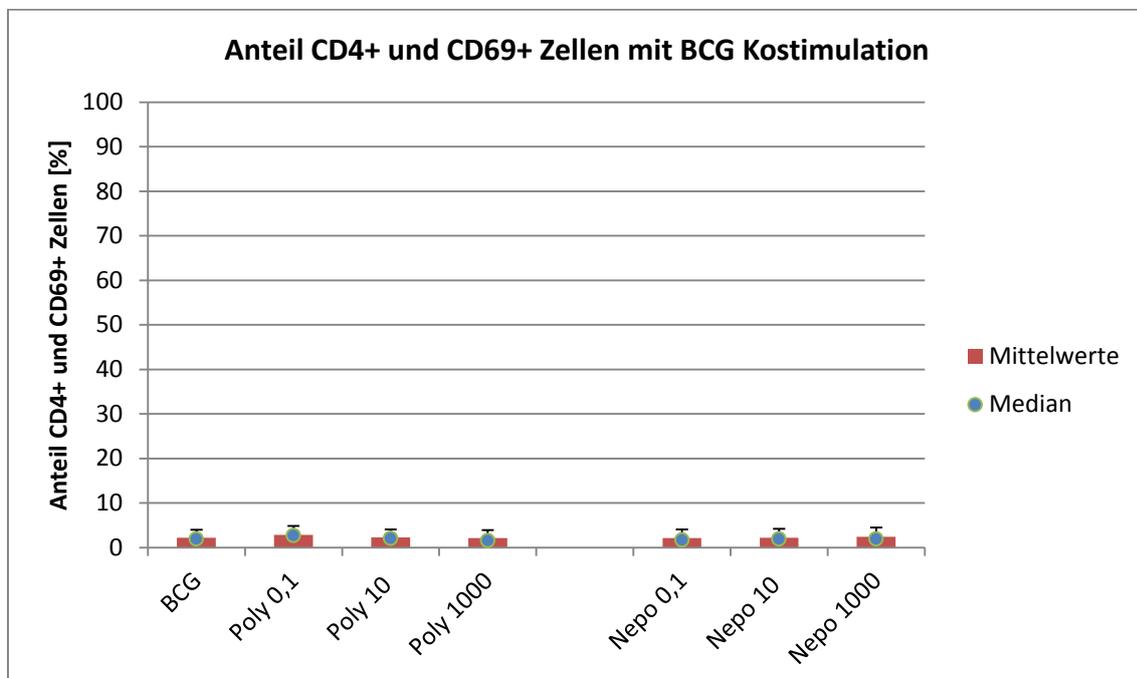


Abbildung 29: Anteil der aktivierten CD69+ Zellen am Gesamtanteil der CD4+ T-Helferzellen unter Einfluss von Poly und Nepo mit BCG Kostimulation. Gemittelte Werte von 20 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

Ergebnisse

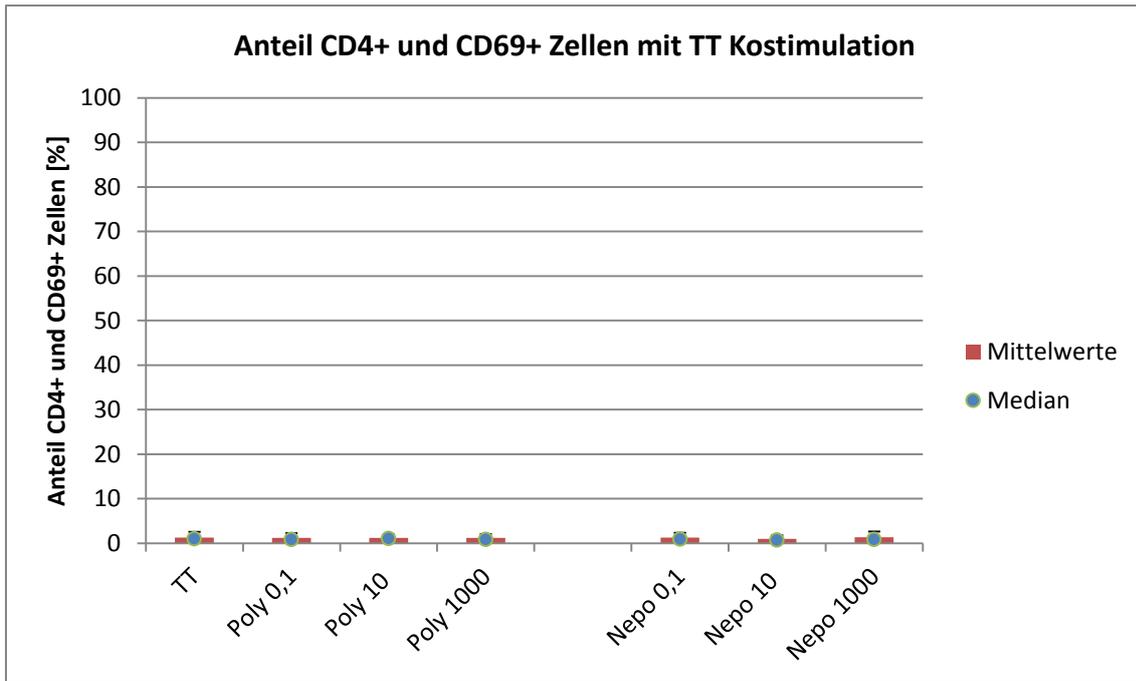


Abbildung 30: Anteil der aktivierten CD69+ Zellen am Gesamtanteil der CD4+ T-Helferzellen unter Einfluss von Poly und Nepo mit TT Kostimulation. Gemittelte Werte von 20 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

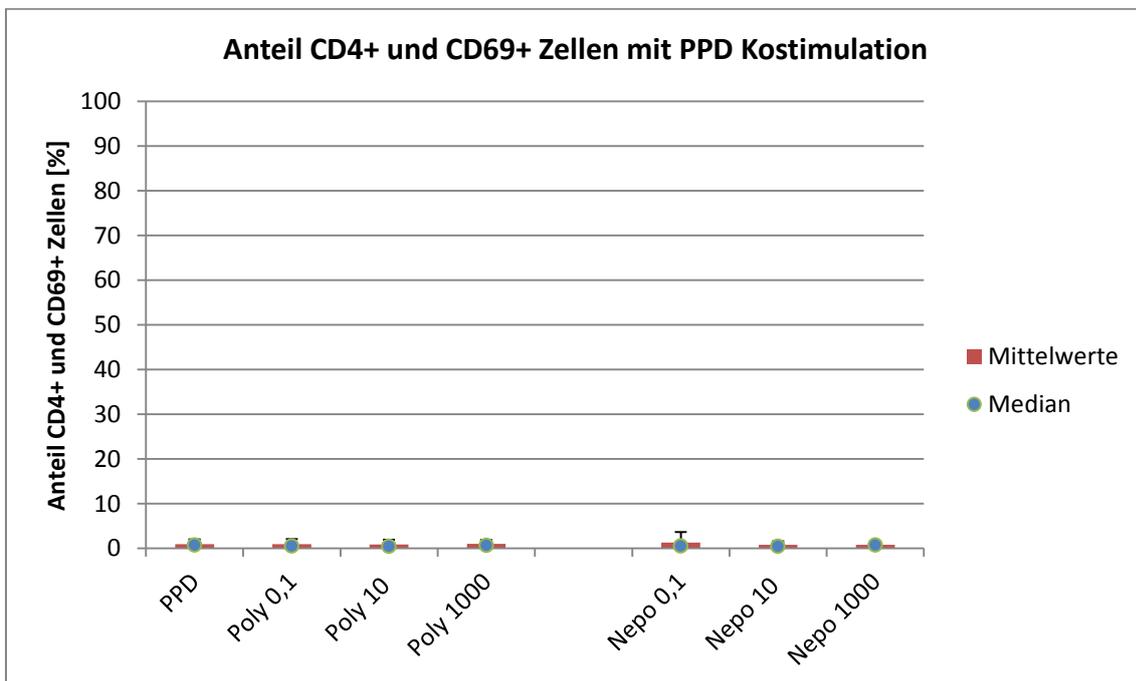


Abbildung 31: Anteil der aktivierten CD69+ Zellen am Gesamtanteil der CD4+ T-Helferzellen unter Einfluss von Poly und Nepo mit PPD Kostimulation. Gemittelte Werte von 20 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

3.4.2 Einfluss von Poly und Nepo auf die CD69-Expression von CD3+ CD8+ Zellen

Da bei den CD8+ Zellen die CD3+ und CD8+ Zellen nur einen Anteil von knapp 50 % ausmachen wurde im Falle der cytotoxischen T-Zellen darauf geachtet, den Anteil der aktivierten CD8+ T-Zellen und nicht auch den der CD8+ NK-Zellen mit zu bestimmen. Dazu wurde der Quotient aus dem Anteil CD3+/CD8+/CD69+ Zellen geteilt durch den Anteil an CD3+ und CD8+ Zellen gebildet. Es zeigte sich, dass die Zellen durch Poly oder Nepo verglichen mit der Spontanaktivierung nicht signifikant aktiviert oder inhibiert werden (Abbildung 32).

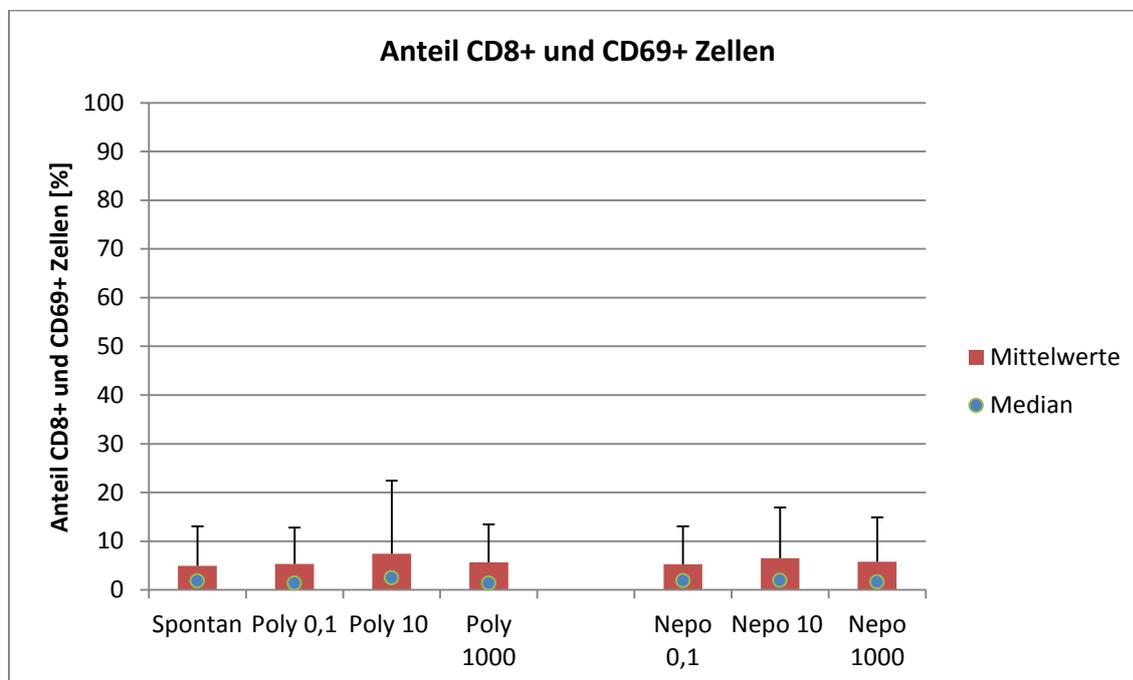


Abbildung 32: Anteil der aktivierten CD69+ Zellen am Gesamtanteil der CD8+ T-Zellen unter Einfluss von Poly und Nepo. Gemittelte Werte von 20 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

Inkubation der PBMC mit BCG führte zu einer signifikanten Verstärkung der CD69-Expression. Diese wurde durch Poly und Nepo nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 33).

Ergebnisse

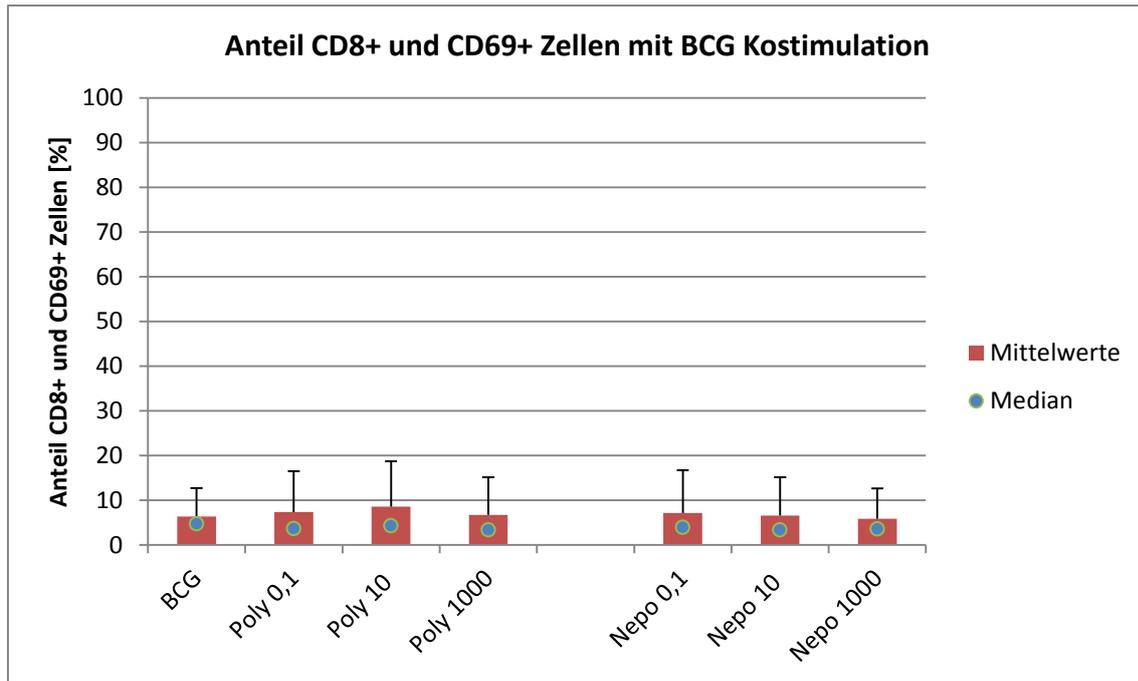


Abbildung 33: Anteil der aktivierten CD69+ Zellen am Gesamtanteil der CD8+ T-Zellen unter Einfluss von Poly und Nepo mit BCG Kostimulation. Gemittelte Werte von 20 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

Auch die TT- oder PPD-induzierte CD69-Expression wurde weder durch Poly noch durch Nepo signifikant beeinflusst (Abbildung 34, Abbildung 35).

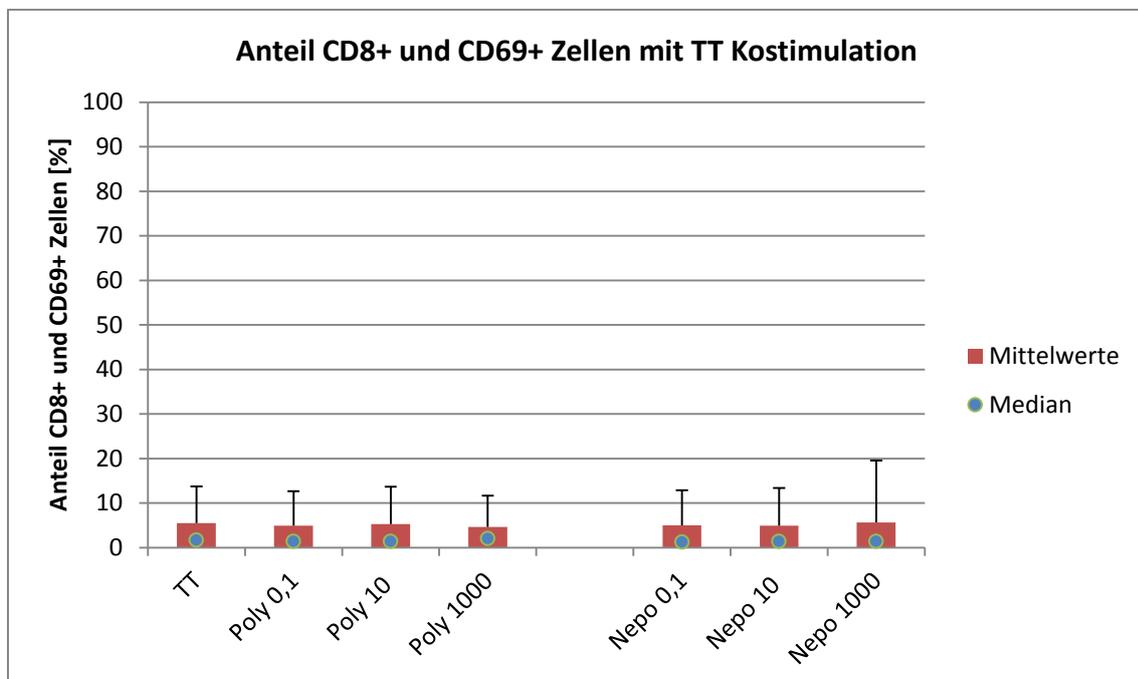


Abbildung 34: Anteil der aktivierten CD69+ Zellen am Gesamtanteil der CD8+ T-Zellen unter Einfluss von Poly und Nepo mit TT Kostimulation. Gemittelte Werte von 20 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

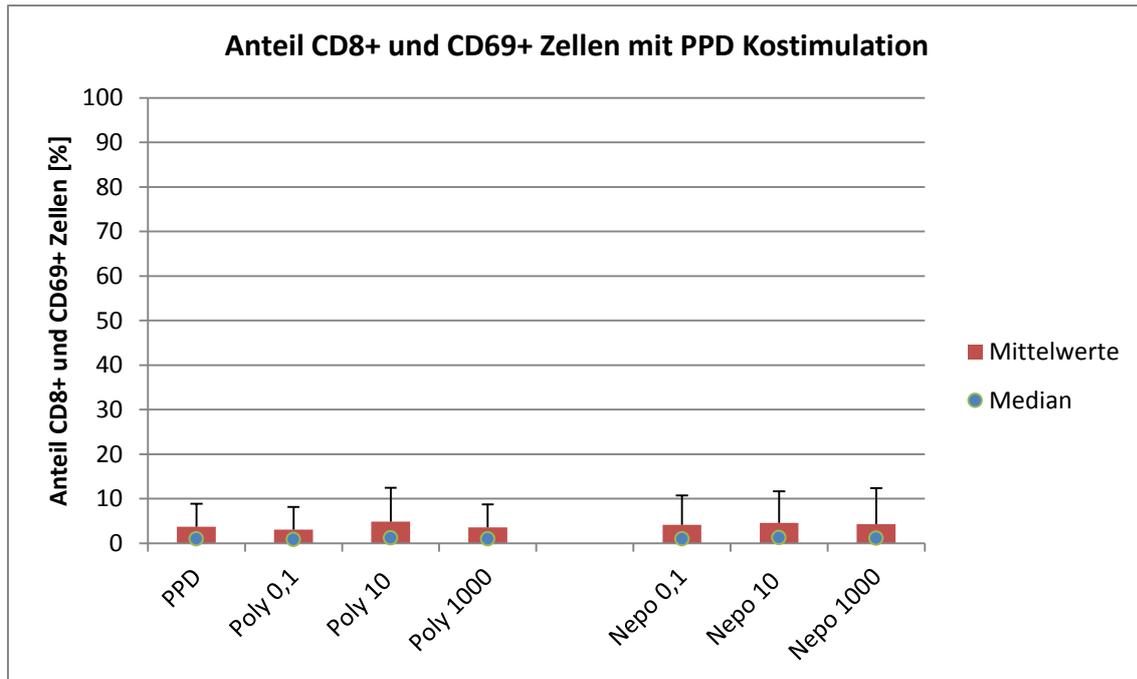


Abbildung 35: Anteil der aktivierten CD69+ Zellen am Gesamtanteil der CD8+ T-Zellen unter Einfluss von Poly und Nepo mit PPD Kostimulation. Gemittelte Werte von 20 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

3.4.3 Einfluss von Poly und Nepo auf die CD69-Expression von CD19+ Zellen

Poly oder Nepo führte zu keinem signifikanten Anstieg der CD69-Expression von B-Zellen (Abbildung 36).

Ergebnisse

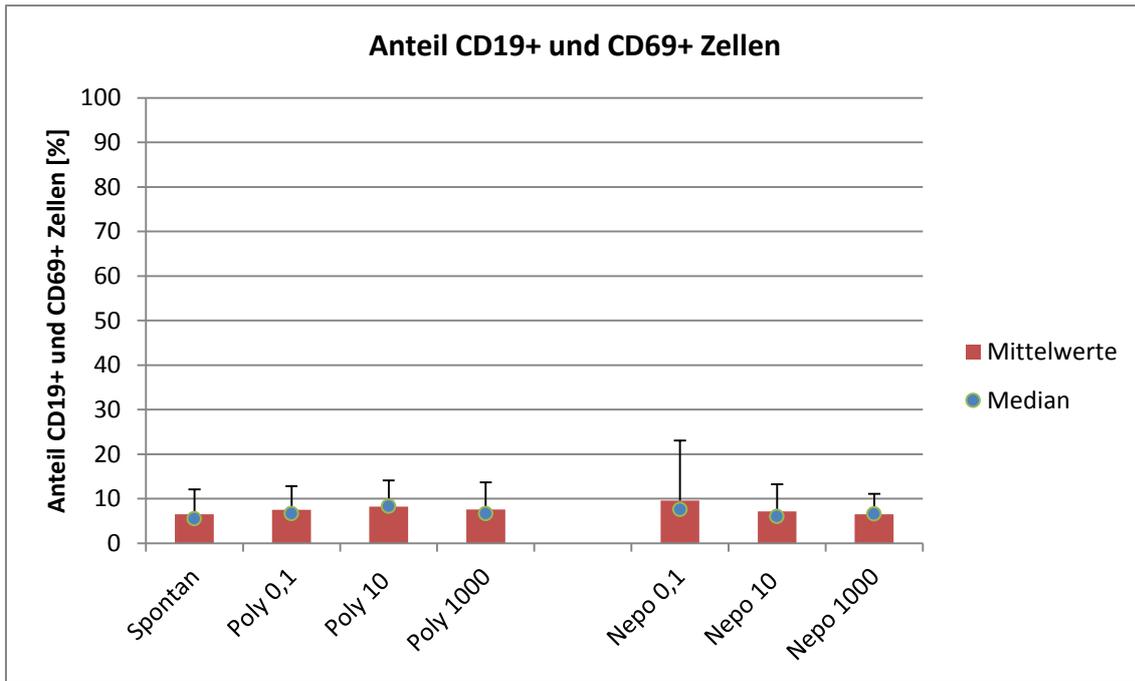


Abbildung 36: Anteil der aktivierten CD69+ Zellen am Gesamtanteil der CD19+ B-Zellen unter Einfluss von Poly und Nepo. Gemittelte Werte von 20 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

Kostimulation der PBMC mit BCG führte zu einem signifikanten Anstieg der CD69-Expression der CD19+ Zellen, die aber durch Poly oder Nepo nicht beeinflusst wurde (Abbildung 37).

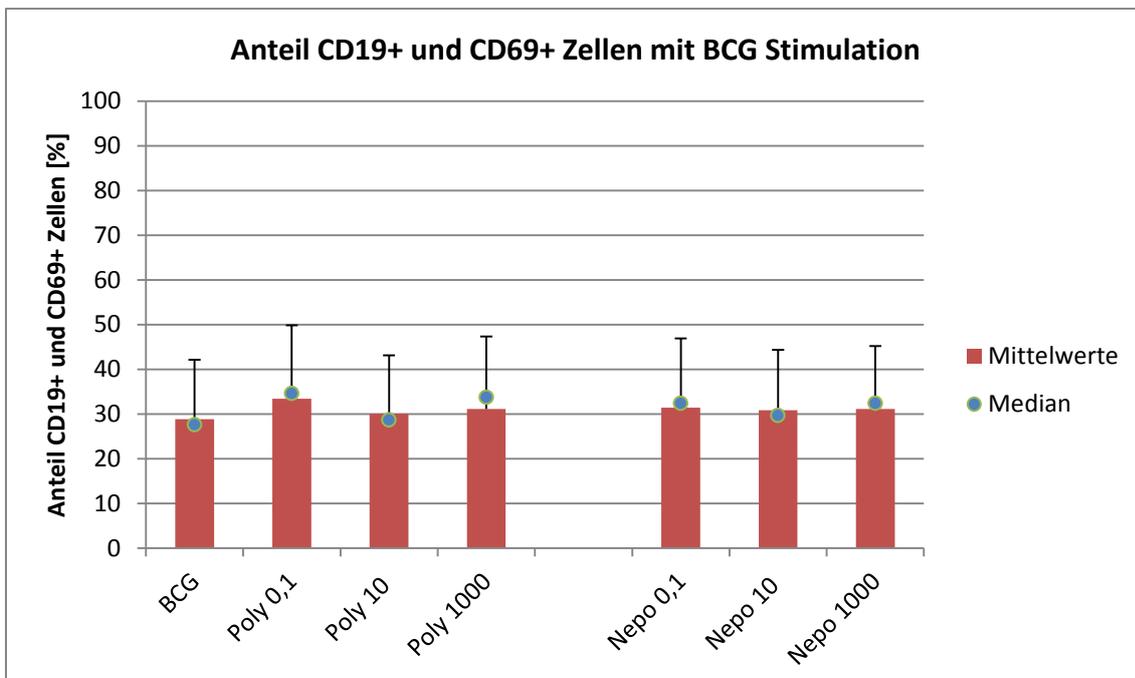


Abbildung 37: Anteil der aktivierten CD69+ Zellen am Gesamtanteil der CD19+ B-Zellen unter Einfluss von Poly und Nepo mit BCG Kostimulation. Gemittelte Werte von 20 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

Ergebnisse

Die TT- und PPD-induzierte CD69 Expression durch B-Zellen wurde ebenfalls weder durch Poly noch durch Nepo signifikant beeinflusst (Abbildung 38, Abbildung 39).

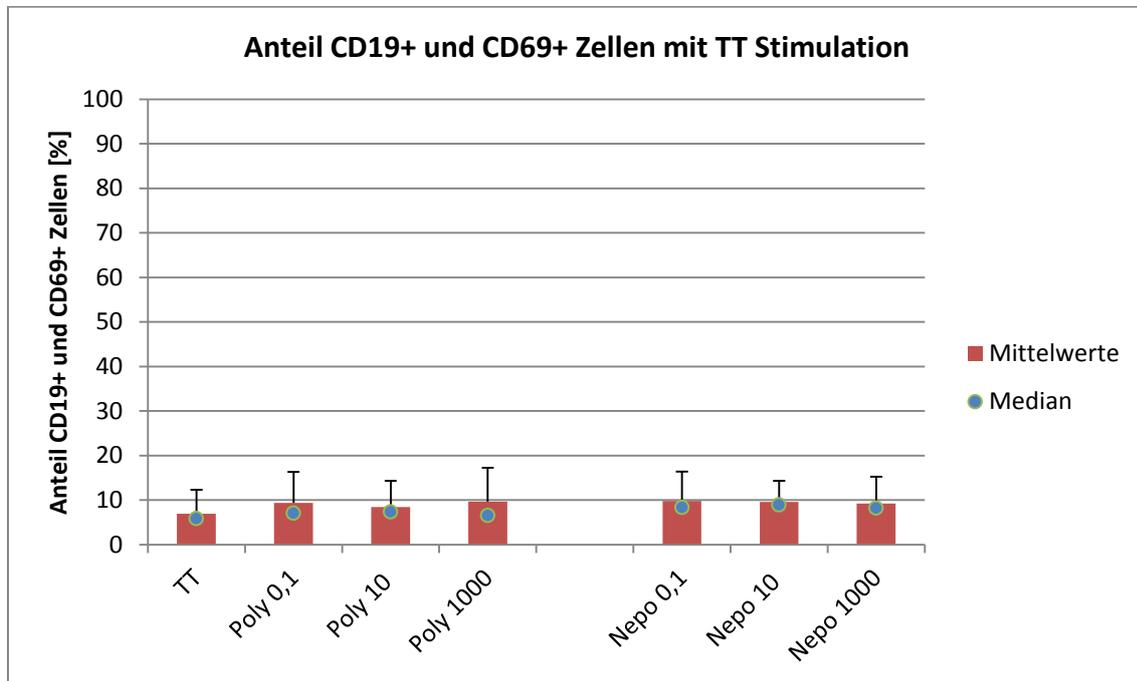


Abbildung 38: Anteil der aktivierten CD69+ Zellen am Gesamtanteil der CD19+ B-Zellen unter Einfluss von Poly und Nepo mit TT Kostimulation. Gemittelte Werte von 20 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

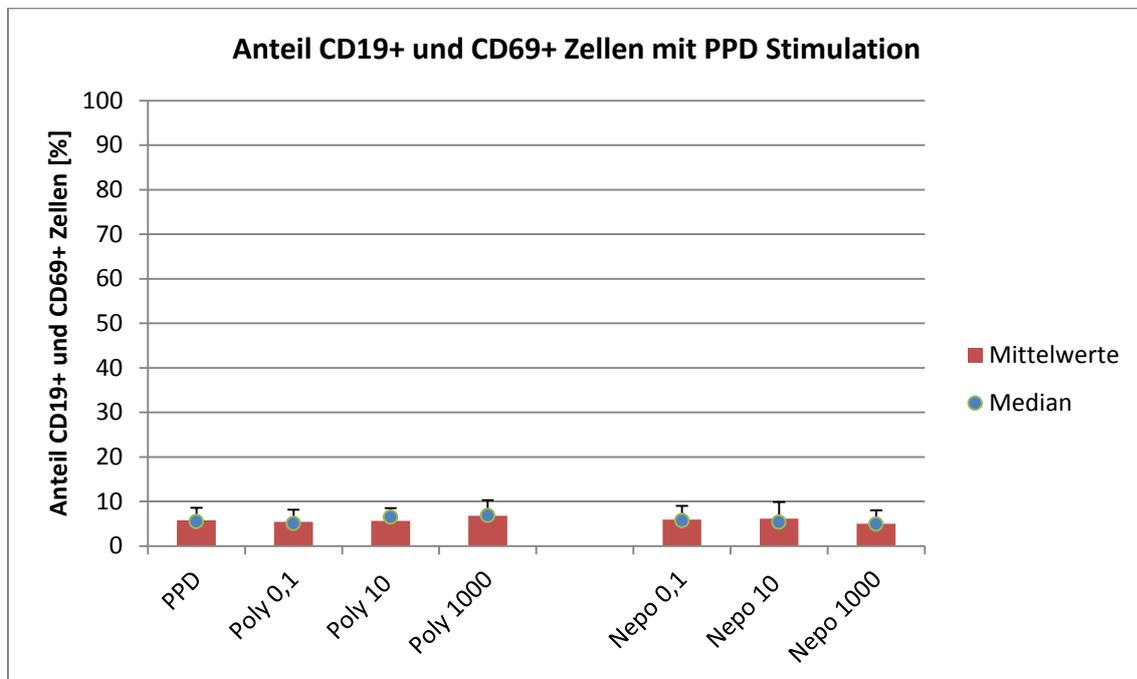


Abbildung 39: Anteil der aktivierten CD69+ Zellen am Gesamtanteil der CD19+ B-Zellen unter Einfluss von Poly und Nepo mit PPD Kostimulation. Gemittelte Werte von 20 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

3.4.4 Einfluss von Poly und Nepo auf die CD69-Expression von CD56+ Zellen

Sowohl Poly 10 ($p=0,006$) als auch Nepo 10 ($p=0,02$) führten zu einem signifikanten Anstieg der CD69-Expression durch NK-Zellen (Abbildung 40).

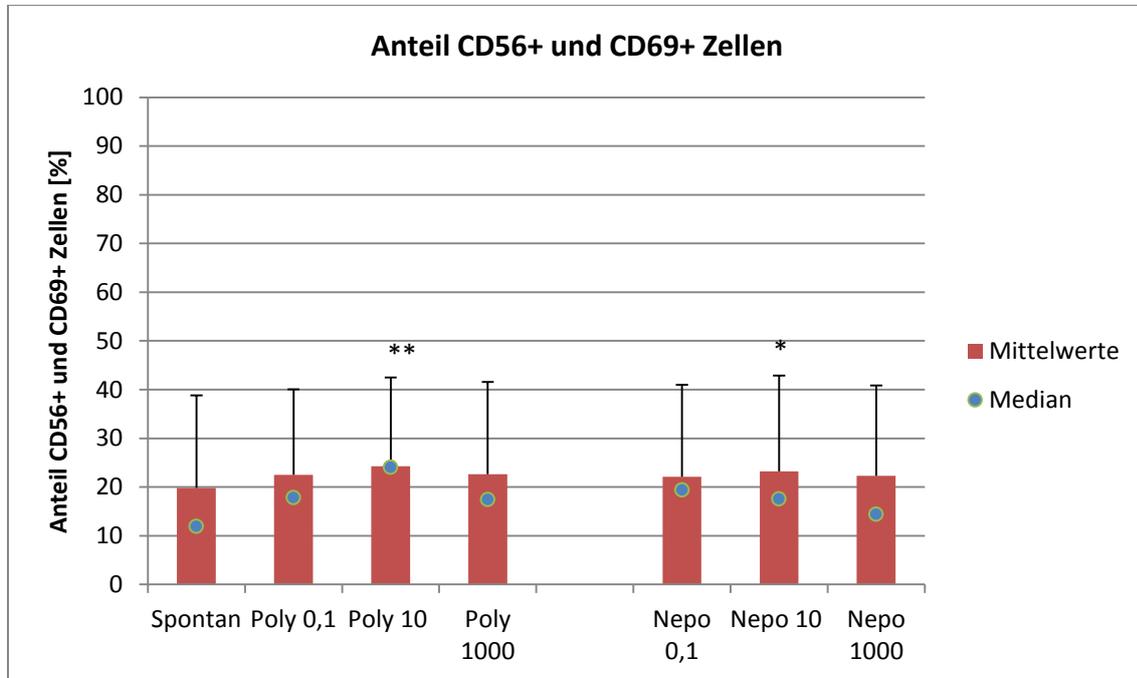


Abbildung 40: Anteil der aktivierten CD69+ Zellen am Gesamtanteil der CD56+ NK-Zellen unter Einfluss von Poly und Nepo. Gemittelte Werte von 20 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung. * $p < 0,05$ im Vergleich zur spontanen Expression von CD69. ** $p < 0,01$ im Vergleich zur spontanen Expression von CD69.

Inkubation der PBMC mit BCG oder TT induzierte eine signifikante Verstärkung der CD69-Expression durch CD56+ NK-Zellen ($p = 0,00089$ bzw. $p = 0,01$). Diese wird durch Poly oder Nepo aber nicht beeinflusst (Abbildung 41, Abbildung 42).

Ergebnisse

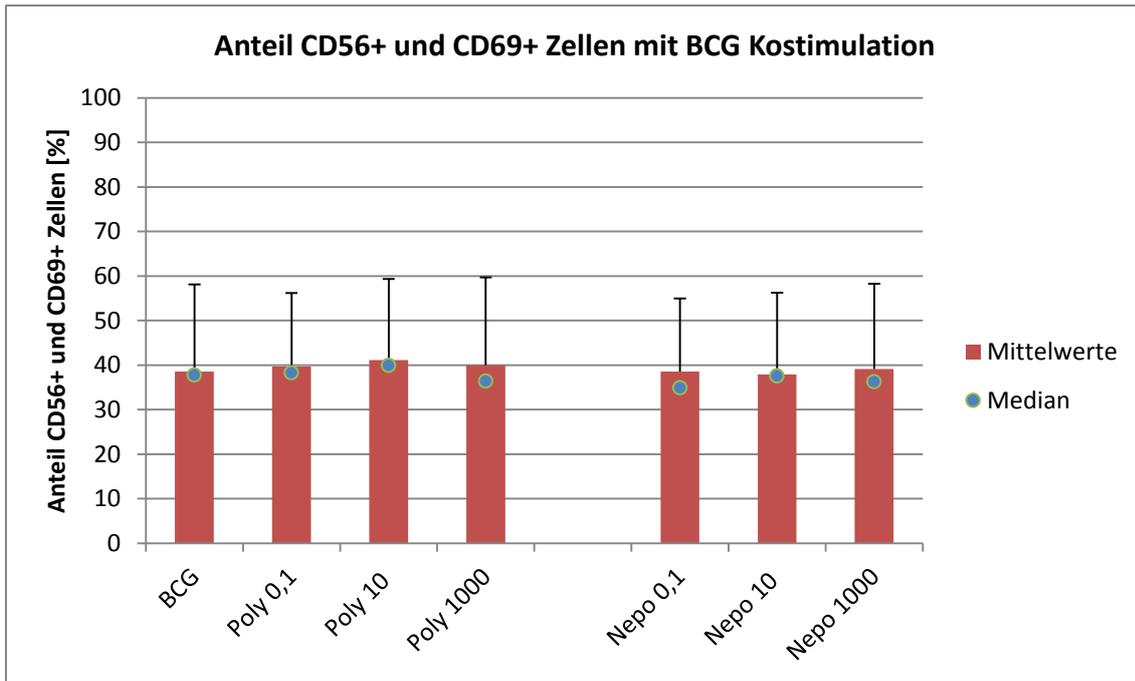


Abbildung 41: Anteil der aktivierten CD69+ Zellen am Gesamtanteil der CD56+ NK-Zellen unter Einfluss von Poly und Nepo mit BCG Kostimulation. Gemittelte Werte von 20 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

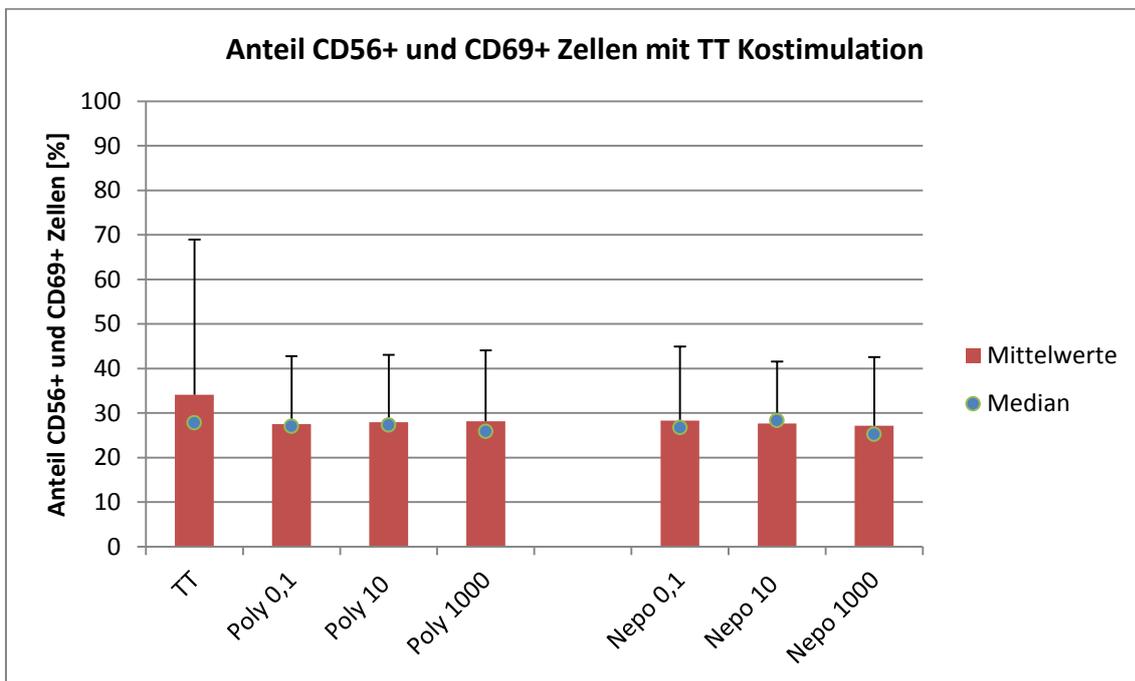


Abbildung 42: Anteil der aktivierten CD69+ Zellen am Gesamtanteil der CD56+ NK-Zellen unter Einfluss von Poly und Nepo mit TT Kostimulation. Gemittelte Werte von 20 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

Stimulation der PBMC mit PPD führte zu keiner Aktivierung der CD56+ NK-Zellen, und auch Kostimulation mit Poly oder Nepo hatte keinen weiteren Effekt (Abbildung 43).

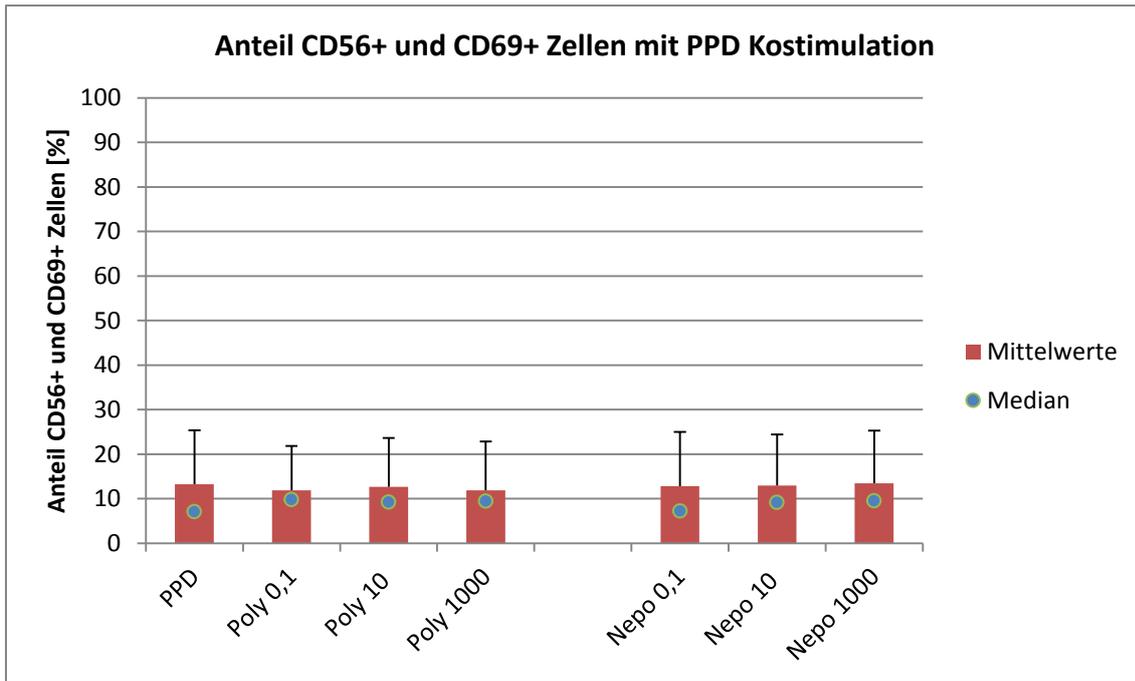


Abbildung 43: Anteil der aktivierten CD69+ Zellen am Gesamtanteil der CD56+ NK-Zellen unter Einfluss von Poly und Nepo mit PPD Kostimulation. Gemittelte Werte von 20 Probanden mit Angabe von Median und Standardabweichung

3.5 Endotoxin Detection Test (LAL)

Die vom Hersteller gelieferte Negativkontrolle wurde in eine Verdünnungsreihe gebracht, die je zwei Verdünnungstufen höher und tiefer als die angegeben Testsensitivität von 0,06 EU/ml umfassten (ET1 = 0,25 EU/ml, ET2 = 0,125 EU/ml, ET3 = 0,06 EU/ml, ET4 = 0,03 EU/ml, ET5 = 0,0125 EU/ml; EU = Endotoxin Units).

Die Ergebnisse der Positivkontrolle zeigten bei den beiden höheren Konzentrationen ET1 und ET2 eine deutliche Agglutination am Boden der Teströhrchen nach Inversion des Röhrchens um 180° (Abbildung 44). ET 4 und ET 5 waren klar negativ und bei ET3 gab es eine fragliche Agglutination, die als + / - gewertet wurde (Tabelle 4).

ET1	ET2	ET3	ET4	ET5
+	+	+ / -	-	-

Tabelle 4: Testergebnisse der Positivkontrollen in den Konzentrationen ET1-5

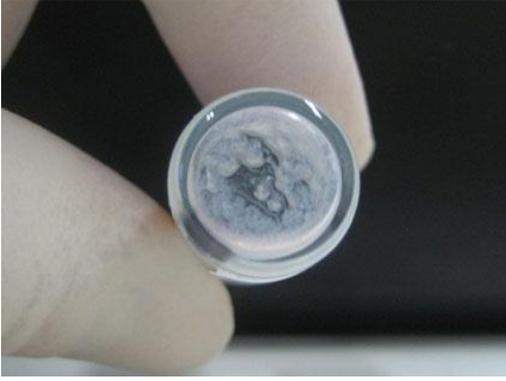


Abbildung 44: Positive LAL Testreaktion

Bei den beiden Negativkontrollen mit sterilem Wasser bzw. mit RPMI Medium zeigte sich keine Agglutination (hier nicht dargestellt).

Zugabe der Stammlösung von Poly und Nepo und je einer Verdünnungsstufe führte zu keiner Agglutination (hier nicht dargestellt).

Auch mit den Verdünnungsstufen 1000 – 0,1 (= 800 – 0,08 ng) von Poly und Nepo, die für die Untersuchungen herangezogen wurden, wurde keine Agglutination beobachtet (hier nicht dargestellt).

4. Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der Fullerene auf Zellen des Immunsystems an Hand von zwei Vertretern (Poly-C60 und Nepo-C60) untersucht. Dazu betrachteten wir den Einfluss auf die Proliferation von PBM Zellen, die Ausschüttung von spezifischen Zytokinen und die Aktivierung spezifischer Subpopulationen wie B-Zellen, T-Helfer-Zellen, T-Killer-Zellen und NK-Zellen. Bei der Auswahl der beobachteten Zytokine wurde ein breites Spektrum gewählt, das unspezifische makrophagentypische Zytokine enthält und eine Identifizierung der unterschiedlichen Immunreaktionstypen (T_{H1} , T_{H2} , T_{H1}/T_{H2}) zulässt.

4.1 Diskussion der Methodik

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Bestimmung der Proliferation durch einen Lymphozyten Transformationstest, die Zytokinbestimmung mit Hilfe eines Sandwich-ELISA und die Messung der Aktivierungs-Ratio bei Immunzellen mit Durchflusszytometrie sind Standardtestverfahren, die seit langem in der klinischen Anwendung etabliert sind. Sie werden auch seit Jahren im Routinebetrieb des immunpathologischen Labors eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde strikt nach den Protokollen der Testverfahren gearbeitet.

Der Test für die Bestimmung von Verunreinigungen (2.3.10) ist nicht standardmäßig im immunpathologischen Labor etabliert und wurde deshalb streng nach den Herstellerangaben durchgeführt.

4.1.1 Reinheit der Fullerene

Die Fullerene wurden in aufgereinigter Form beim Hersteller eingekauft und unter Schutzatmosphäre in Lösung mit RPMI Medium gebracht. Aus diesen Stammlösungen wurden die weiteren Konzentrationsstufen erstellt. Nach der Verwendung wurden Proben der Stammlösungen und Proben aller verwendeten Konzentrationsstufen mit dem in Abschnitt 2.3.10 beschriebenen Endotoxin Detection Test (LAL) auf Verunreinigungen, die zu einer ungewollten Stimulation der

Immunzellen führen könnten, getestet. Wir konnten eindeutig zeigen, dass es keine Kontamination in den Stammlösungen, den verschiedenen Verdünnungsstufen und den verwendeten Medien gab (siehe Abschnitt 3.5), d.h. es konnte mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, dass eventuelle Reaktionen der PBMC auf unspezifische Aktivierung durch Endotoxine zurückzuführen sind.

4.1.2 Konzentrationsstufen der Fullerene

In der vorliegenden Arbeit entschieden wir uns für die Konzentrationsstufen von Poly und Nepo von 800 ng/ml bis 0,08 ng/ml, die auch im Bereich der Konzentrationsstufen liegen, welche von Ryan et al. 2007 verwendet wurden (1000 – 0,1 ng/ml), um den Einfluss von Poly-C60 und Nepo-C60 auf menschliche Mastzellen und Basophile zu zeigen [13]. In Vorversuchen waren auch 10- und 100-fach höhere Konzentrationen ausgetestet worden, die sich aber von den 800 ng/ml nicht wesentlich unterschieden (insbesondere ergaben sich keine Hinweise auf Zytotoxizität), sodass wir, um Antigen einzusparen, 800 ng/ml als höchste Konzentrationsstufe wählten.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Einfluss von Poly-C60 und Nepo-C60 auf die Proliferation von immunkompetenten Zellen

PBM Zellen proliferierten unter Stimulation mit Poly-C60 und Nepo-C60 signifikant stärker als ohne Stimulation (Abbildung 7). Bei allen Konzentrationsstufen lag der statistische p-Wert und damit die Irrtumswahrscheinlichkeit im Wilcoxon-Rangsummentest bei $p < 0,05$. Lediglich die Konzentrationsstufen von Poly 1 und Poly 0,1 lagen mit $p = 0,052$ und $p = 0,054$ leicht über der gewählten Grenze.

In dieser Arbeit nicht differenziert, ob sich die gesamte Population der PBM Zellen vermehrt oder ob einzelne Subpopulationen proliferieren. Jedoch lässt sich mit den in

dieser Untersuchung gewonnenen Ergebnissen eindeutig ein negativer Effekt auf die Proliferation der PBM Zellen ausschließen, d.h. in den gewählten Konzentrationen hatten unsere konjugierten Fullerene keine zelltoxische Wirkung. Wir bestätigen damit die Studien von Dumortier et al. von 2006, die modifizierte Kohlenstoff Nanotubes (Teil der Fullerenfamilie) und deren Einfluss auf B-Zellen und T-Zellen sowie auf Makrophagen untersuchten [24].

Unter Stimulation mit BCG, Tetanus Toxin oder PPD (Abbildung 8-10) zeigten sich schon ohne Fullerene signifikant höhere Proliferationsraten im Vergleich zur Spontanproliferation. Diese wurden durch Zugabe von Poly-C60 oder Nepo-C60 nicht signifikant beeinflusst. Fullerene induzieren also nur bei unstimulierten Zellen eine verstärkte Proliferation.

4.2.2 Sekretion von Zytokinen unter Poly-C60 und Nepo-C60 Einfluss

Wir betrachten zunächst die Ergebnisse für die Zytokine, die jeweils für ein Immunreaktionsmuster stehen. Wir untersuchten für das T_H1 -Muster die Zytokine IFN- γ und TNF- β . Poly-C60 und Nepo-C60 führten zu keiner signifikanten Veränderung der Zytokinausscheidung der unstimulierten PBMC. Auch unter Kostimulation mit PPD, welches eine spezifische T_H1 -Antwort hervorruft, kam es zu keiner signifikanten Veränderung.

Die Sekretion der T_H2 -Zytokine IL-5 und IL-13 sowie von IL-10, das vor allem von regulatorischen T-Zellen produziert wird wurde ebenfalls durch die Fullerene nicht beeinflusst, weder bei unstimulierten noch bei stimulierten PBMC.

Diese Befunde belegen, dass Poly-C60 und Nepo-C60 keinen Einfluss auf die Sekretion von Zytokinen der spezifischen Immunzellen haben. Somit wird eine immunmodulatorische Wirkung durch T-Killer-Zellen, T-Helfer-Zellen und T-regulatorische Zellen unwahrscheinlich. Einschränkend ist zu bedenken, dass nicht alle spezifischen Zytokine getestet wurden.

Die Ergebnisse der Untersuchung von makrophagentypischen Zytokinen IL-6 und TNF- α zeigen, dass es unter der Stimulation mit Fullerenen bei nicht kostimulierten Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der IL-6 Sekretion (Abbildung 11), nicht

jedoch der TNF- α Produktion kommt. Bei Kostimulation mit BCG findet keine signifikante Veränderung beider Zytokinsekretionen statt. Diese Befunde weisen auf eine Stimulierung der Makrophagen im Ruhezustand hin. Jedoch verschwindet dieser Effekt, bei Aktivierung des Immunsystems. Dieser proliferationsanregende Effekt ist somit um ein vielfaches geringer als eine durch Antigene ausgelöste Immunantwort.

Festzuhalten ist: Fullerene führen nicht zu einer definierten Zytokinsekretion, die ein T_H-Muster begünstigt und in der Folge zu einem Immunshift durch Suppression einer T_H-Zellgruppe führen würde. Das vermutlich durch Makrophagen sezernierte IL-6 könnte im Gegenzug eine vermehrte Bildung von T-regulatorischen-Zellen verhindern, da vermehrte IL-6 Konzentrationen die Neubildung von T-regulatorischen-Zellen aus naiven T-Zellen verringern (Fujimoto et al. 2010 [25]). Poly-C60 und Nepo-C60 könnten somit eine vermehrte Bildung immunsuppressiver Zellen verhindern.

4.2.3 Aktivierung von immunkompetenten Zellen unter Poly-C60 und Nepo-C60

CD 69 ist ein Oberflächenmolekül, das nur von aktivierten Immunzellen exprimiert wird. Die Gene der Aktivierungskaskade lassen sich nach sofortiger, früher und später Expression einteilen. CD69 gehört zur Gruppe der frühen Aktivierungsgene (0,5-48 h) und wird nicht nur von T-Lymphozyten [26] sondern auch von NK-Zellen [27] und B-Zellen [28] in gleichem Maße bei Aktivierung exprimiert. Daher eignet sich CD69 speziell als Marker für eine früh ablaufende Aktivierung spezifischer Immunzellen. Es besteht daher nicht unbedingt eine Korrelation zwischen der CD69-Expression und einer verstärkten Proliferation, die erst nach 7 Tagen gemessen wird. Wie in Kapitel 3.4 beschrieben führen die Fullerene Poly-C60 und Nepo-C60 zu keiner signifikanten Veränderung des CD69 Anteils einer spezifischen Subpopulation (hier getestet T-Helfer-Zellen, zytotoxische T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen). Auch bei „künstlich“ induzierten Immunreaktionen vom T_H1- oder T_H2-Typ kommt es zu keiner Änderung des CD69 positiven Anteils im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Fullerene haben demnach keinen Einfluss auf den Aktivierungszustand in der frühen Phase einer Immunreaktion und deren Signalwege der spezifischen Immunzellen. Im Gegensatz dazu scheinen sie aber - wie bei Ryan et al. 2007 beschrieben - sehr

wohl einen Effekt auf die Zellen der unspezifischen Immunabwehr wie z.B. Mastzellen und - wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt – NK-Zellen zu haben (Signalkaskade über die Lyn- und Syk-Kinase der Mastzellen) [13].

Die Tatsache, dass Fullerene über unspezifische Endozytose in Immunzellen aufgenommen werden und nicht spezifisch gebunden werden, bekräftigt die These einer unspezifischen Stimulation.

Weder in der Arbeit von Dellinger et al. 2010 [29], noch in der Studie von Porter et al. von 2006 [30], die sich auch mit der Aufnahme und der Lokalisation der Fullerene im Inneren der Zelle befassen, ist eine Präsentation dieser Partikel durch MHC-Moleküle beschrieben.

4.2.4 Gesamtbewertung des Einflusses von Poly-C60 und Nepo-C60 auf immunkompetente Zellen

Betrachtet man die Ergebnisse, der Proliferation, der Zytokinsekretion und der CD69-Expression so fallen die Stimulation der IL-6 Sekretion und die Proliferation bei nicht kostimulierten PBM Zellen auf. Es kommt jedoch zu keiner T_H1/T_H2 spezifischen Zytokin-Stimulation. Das führt zu der Überlegung, ob es sich bei der beobachteten Proliferationserhöhung unter Poly-C60 und Nepo-C60 um eine Vermehrung der Makrophagen handeln könnte.

Die Ergebnisse der einzelnen Probanden zeigen jedoch keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen IL-6 Sekretion und vermehrter Proliferation. Vier der Spender wiesen dabei eine vermehrte IL6 Sekretion unter Poly-C60/Nepo-C60 auf. Bei fünf Spendern zeigte sich eine vermehrte Proliferation unter Poly-C60/Nepo-C60. Jedoch zeigten nur zwei Spender aus beiden Kollektiven eine Erhöhung der IL-6 Sekretion sowie eine vermehrte Proliferation. Diese beiden Probanden wiesen nicht das gleiche T_H -Muster auf. Ein Spender zeigte ein T_H1/T_H2 Muster und der zweite ein T_H2 Muster. Hier wäre eine Betrachtung der Proliferation einzelner Subpopulationen sicherlich weiterführend.

Ein Zusammenhang zwischen vermehrter IL-6 Sekretion und früher Aktivierung der NK-Zellen lässt sich nicht genau klären. Rabinowich et al. zeigten 1993, dass menschliche NK-Zellen durch Stimulation mit rekombinantem IL-6 nach 6 tägiger

Inkubation vermehrt Aktivierungsmarker (unter anderem CD69) exprimierten, jedoch mit deutlich geringerem Effekt als bei Stimulation durch IL-2 [31]. Fraglich ist, ob dieser Effekt ohne Zugabe von rekombinantem IL-6, nur durch von den PBMC produziertes IL-6 ausgelöst werden kann. Vermehrte IL-6 Sekretion der PBMC einzelner Probanden korrelierte jedenfalls nicht mit vermehrter NK-Zell Aktivierung.

Liu et al. zeigten 2009 im Tumormausmodell einen signifikanten Anstieg der TNF- α und IFN- γ Konzentrationen sezerniert durch T-Lymphozyten und Makrophagen nach Stimulation mit Poly-C60 [32]. Sie ermittelten auch einen signifikanten Anstieg der IL-6 Konzentrationen durch Mausmakrophagen nach Poly-C60 Stimulation. Allerdings verwendeten sie dazu wesentlich höhere Konzentrationen im Bereich von 0,01 bis 1 mg/ml. Die Inkubationszeit betrug 24-72 h und die Konzentrationen wurden im Mausserum sowie Tumorlysat gemessen. Trotz der höheren Poly-C60 Konzentrationen konnten auch Liu et al. eine Zytotoxizität ausschließen.

Der deutlich frühere Zeitpunkt und die höheren Poly-C60 Konzentrationen sind mögliche Erklärungen für das divergierende Zytokinprofil. Übereinstimmend ist die Tatsache, dass Poly-C60 zur signifikanten Erhöhung von IL-6 führt. Wir konnten jedoch keine erhöhten TNF- α und keinen IFN- γ Spiegel nachweisen. Das Tumormausmodell stellt von Grund auf andere Rahmenbedingungen dar. Auch erweist sich die Bestimmung von Zytokinkonzentrationen im Serum wesentlich schwieriger. Dies sind weitere mögliche Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse.

Aus den erhöhten TNF- α , IFN- γ und IL-6 Spiegeln schließen Liu et al. auf eine Verlagerung der Immunreaktion zu Gunsten eines T_H1-Musters. So erklären sie die von Ihnen beschriebene Anti Tumor Aktivität von Poly-C60.

Die spezielle Stimulation unserer PBM-Zellen mit T_H1 induzierenden Antigenen (BCG,PPD) und mit T_H2 induzierendem Antigen (Tetanus Toxin) sowie die solitäre Stimulation mit Fullerenen zeigen weder in einer provozierten Immunreaktion noch im Ruhezustand einen Shift zu Gunsten des T_H1-Musters. Dies scheint bei tumorinduzierten Reaktionen oder im Mausmodell anders zu sein.

Liu et al. konnten zusätzlich einen signifikanten Anstieg der CD4/CD8 Ratio nach 48-stündiger Inkubation mit Poly-C60 zeigen. Betrachtet man diese Aussage im Kontext mit unseren Ergebnissen so können wir eine frühe Aktivierung nach 24 Stunden, gemessen anhand des CD69 Oberflächenmarkers, ausschließen. Unsere signifikanten Proliferationserhöhungen unter Poly-C60 konnten auf Grund der

Testbedingungen keiner Subpopulation zugewiesen werden. Betrachtet man nun die von Liu beschriebene Erhöhung der CD4/CD8 Ratio, könnte man an eine vermehrte Proliferation der CD4-Zellen denken. Jedoch muss diese These noch experimentell bestätigt werden.

4.2.5 Abschließende Betrachtung und Schlussfolgerung

Die Tatsache, dass die getesteten Fullerene in keiner Studie eine Immunsuppression aufweisen und die Tatsache dass nur unkonjugierte Fullerene (Kolosnjaj et al. 2007 [33]) oder konjugierte Fullerene in deutlich höheren Dosen (Yamawaki et al. 2006 [5]) zelltoxisch wirken, schließt eine Hemmung/Schwächung der zellulären Immunabwehr durch die in dieser Studie verwendeten Fullerene aus. Diese These wird durch das unveränderte Zytokinprofil und den gleichbleibenden Anteil aktivierter Leukozyten bekräftigt.

Wir können keine Aussage darüber treffen, ob es zu einer humoralen Antwort kommt. Wie bei Chen et al. 1998 beschrieben, sind Antikörper gegen Fullerene möglich, jedoch wird die gezielte Bildung von Antikörpern nur durch Konjugation mit einem Fremdprotein (hier bovines Thyroglobulin) hervorgerufen [14]. Eine Stimulation der T_H2-typischen Zytokine und auch eine Aktivierung von CD19+ B-Zellen konnten wir nicht beobachten. Allerdings fanden wir eine verstärkte IL-6 Sekretion, das sowohl B-Zellen stimuliert, als auch von ihnen produziert wird.

5 Ausblick

Die Forschung im Bereich der relativ neuen Stoffklasse der Fullerene steht noch am Anfang.

Diese große Gruppe der Fullerene birgt noch viele Geheimnisse. Individuelle Eigenschaften, die reaktiven Gruppen, die Konzentration und äußere Einflüsse können das Bild bestimmen, wie Fullerene mit ihrer Umgebung interagieren.

Offensichtlich lassen sich keine allgemein gültigen Schlüsse für alle Fullerene ziehen. Dies birgt aber auch die Chance, dass die Fullerene viele der Erwartungen, die mit ihnen verbunden sind, erfüllen können.

Die Fullerene werden aber sicherlich Einzug in die Medizin halten. Sei es als Kontrastmittel (Bolskar et al. 2008 [34]), HIV-Medikamente wie Fullevir (Nosik et al. 2009 [35]), andere Medikamente oder als Drug-Carrier (Dutta et al. 2007 [36]).

Dazu bedarf es jedoch weiterer intensiver Forschung. Speziell gilt es den Einfluss auf das Immunsystem weiter zu klären.

Die in der vorliegenden Arbeit getesteten Fullerene scheinen immunologisch inert zu sein – zumindest auf Zellen des spezifischen Immunsystems. Inwieweit dies auch für andere Fullerene gilt muss jedoch offen bleiben.

6 Zusammenfassung

Seit ihrer Entdeckung wecken Fullerene auf Grund ihrer chemischen Struktur große Hoffnungen. Zunehmend werden Fullerene besser verstanden und in der Medizin eingesetzt. Dabei können sie vielfältige Rollen einnehmen: Sei es als Transporter, als Verbindungsstück zwischen Medikament und Targeting-Protein, als Kontrastmittel oder als eigenständiges Medikament.

Viele bisherige Studien schließen einen generell toxischen Effekt der Fullerene aus. Mehrere Studien beschreiben den Effekt von Fullerenen als Medikament oder als Kontrastmittel. Es gibt jedoch (außer den Zelltoxizitätsstudien) wenige Arbeiten, die sich mit der Interaktion dieser Stoffgruppe mit dem menschlichen Körper selbst beschäftigen. Für das Immunsystem gibt es nur vereinzelte Studien.

Auf Grund der geringen Datenlage und der Erkenntnis, dass Fullerene Einfluss auf die angeborene Immunantwort zu haben scheinen, sowie der zunehmenden Anwendung im klinischen Sektor ist es von großer Wichtigkeit, den Einfluss der Fullerene auf den Körper und das Immunsystem besser zu verstehen.

In diesem Kontext untersuchte die vorliegende Arbeit den Einfluss von zwei Vertretern der Fullerene (Polyhydroxy-C60 und N-ethyl-polyamin-C60) auf das Immunsystem. Dazu wurden die PBM Zellen aus dem Blut von 20 gesunden Probanden isoliert und kultiviert. In einem *in-vitro* Testsystem wurde der Einfluss der Fullerene auf diese Zellen getestet. Verschiedene Antigene (BCG, Tetanus Toxin und PPD) stimulierten die PBM Zellen zu unterschiedlichen Immunreaktionen vom T_H1-oder T_H2-Typ, um mögliche Effekte der Fullerene auch im aktivierten Immunsystem zu klassifizieren. Die Fullerene wurden in unterschiedlichen Konzentrationen zugeführt.

Untersucht wurde damit der Einfluss der Fullerene auf die Proliferation von PBM Zellen, die Zytokinproduktion an Hand von IL-1, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IFN- γ , TNF- α , TNF- β , GM-CSF mittels Sandwich-ELISA und die frühe Aktivierung der Immunzellen an Hand der CD69-Expression mittels Durchflusszytometrie.

Es konnte gezeigt werden, dass die zwei Fullerene die Proliferation von PBMC stimulieren. Eine verstärkte CD69-Expression fand sich aber nur auf NK-Zellen. Auch auf die Produktion T-Zell-assoziiertes Zytokine hatten sie keinen Einfluss, während sie die Sekretion von IL-6 signifikant verstärkten.

Zusammenfassend können wir sagen, dass die getesteten Fullerene keinen immunsuppressiven Effekt haben und nicht zelltoxisch sind und insbesondere Zellen des spezifischen Immunsystems nicht wesentlich beeinflussen. Dagegen weisen die Befunde durchaus auf eine Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems hin (z.B. NK-Zellen).

7 Literaturverzeichnis

1. Curl, R.F., R.E. Smalley, H.W. Kroto, J.R. Heath, and S.C. O'Brien, *C₆₀: Buckminsterfullerene*. Nature, 1985. **318**: p. 2.
2. Krusic, P.J., E. Wasserman, P.N. Keizer, J.R. Morton, and K.F. Preston, *Radical Reactions of C₆₀*. Science, 1991. **254**(5035): p. 1183-1185.
3. Moghimi, S.M., A.C. Hunter, and J.C. Murray, *Nanomedicine: current status and future prospects*. FASEB J, 2005. **19**(3): p. 311-30.
4. Sayes, C.M., A.M. Gobin, K.D. Ausman, J. Mendez, J.L. West, and V.L. Colvin, *Nano-C₆₀ cytotoxicity is due to lipid peroxidation*. Biomaterials, 2005. **26**(36): p. 7587-95.
5. Yamawaki, H. and N. Iwai, *Cytotoxicity of water-soluble fullerene in vascular endothelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **290**(6): p. C1495-502.
6. Chen, H.H., C. Yu, T.H. Ueng, S. Chen, B.J. Chen, K.J. Huang, and L.Y. Chiang, *Acute and subacute toxicity study of water-soluble polyalkylsulfonated C₆₀ in rats*. Toxicol Pathol, 1998. **26**(1): p. 143-51.
7. Zhao, B., Y.Y. He, P.J. Bilski, and C.F. Chignell, *Pristine (C₆₀) and hydroxylated [C₆₀(OH)₂₄] fullerene phototoxicity towards HaCaT keratinocytes: type I vs type II mechanisms*. Chem Res Toxicol, 2008. **21**(5): p. 1056-63.
8. McDevitt, M.R., D. Chattopadhyay, B.J. Kappel, J.S. Jaggi, S.R. Schiffman, C. Antczak, J.T. Njardarson, R. Brentjens, and D.A. Scheinberg, *Tumor targeting with antibody-functionalized, radiolabeled carbon nanotubes*. J Nucl Med, 2007. **48**(7): p. 1180-9.
9. Bosi, S., T. Da Ros, G. Spalluto, and M. Prato, *Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications*. Eur J Med Chem, 2003. **38**(11-12): p. 913-23.
10. Satoh, M. and I. Takayanagi, *Pharmacological studies on fullerene (C₆₀), a novel carbon allotrope, and its derivatives*. J Pharmacol Sci, 2006. **100**(5): p. 513-8.
11. Marcorin, G.L., T. Da Ros, S. Castellano, G. Stefancich, I. Bonin, S. Miertus, and M. Prato, *Design and synthesis of novel [60]fullerene derivatives as potential HIV aspartic protease inhibitors*. Org Lett, 2000. **2**(25): p. 3955-8.
12. Kasermann, F. and C. Kempf, *Photodynamic inactivation of enveloped viruses by buckminsterfullerene*. Antiviral Res, 1997. **34**(1): p. 65-70.
13. Ryan, J.J., H.R. Bateman, A. Stover, G. Gomez, S.K. Norton, W. Zhao, L.B. Schwartz, R. Lenk, and C.L. Kepley, *Fullerene nanomaterials inhibit the allergic response*. J Immunol, 2007. **179**(1): p. 665-72.
14. Chen, B.X., S.R. Wilson, M. Das, D.J. Coughlin, and B.F. Erlanger, *Antigenicity of fullerenes: antibodies specific for fullerenes and their characteristics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(18): p. 10809-13.

15. Monti, D., L. Moretti, S. Salvioli, E. Straface, W. Malorni, R. Pellicciari, G. Schettini, M. Bisaglia, C. Pincelli, C. Fumelli, M. Bonafe, and C. Franceschi, *C60 carboxyfullerene exerts a protective activity against oxidative stress-induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **277**(3): p. 711-7.
16. Janeway, C.A., P. Travers, M. Walport, and M. Shlomchik, *Immunologie*. 5 ed. 2002: Spektrum.
17. Mason, D., D. Simmons, and C. Buckley, *Leucocyte Typing VII*. 2002: Oxford University Press, USA (June 15, 2002). 1504.
18. Mosmann, T.R., H. Cherwinski, M.W. Bond, M.A. Giedlin, and R.L. Coffman, *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. *J Immunol*, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
19. Barth, H., P.A. Berg, and R. Klein, *Methods for the in vitro determination of an individual disposition towards TH1- or TH2-reactivity by the application of appropriate stimulatory antigens*. *Clin Exp Immunol*, 2003. **134**(1): p. 78-85.
20. Borges, O., G. Borchard, A. de Sousa, H.E. Junginger, and A. Cordeiro-da-Silva, *Induction of lymphocytes activated marker CD69 following exposure to chitosan and alginate biopolymers*. *Int J Pharm*, 2007. **337**(1-2): p. 254-64.
21. Bang, F.B., *A bacterial disease of Limulus polyphemus*. *Bull Johns Hopkins Hosp*, 1956. **98**(5): p. 325-51.
22. Levin, J. and F.B. Bang, *Clottable protein in Limulus; its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin*. *Thromb Diath Haemorrh*, 1968. **19**(1): p. 186-97.
23. Barth, H., K. Klein, A. Bortlein, A. Guseo, P.A. Berg, H. Wietholter, and R. Klein, *Analysis of immunoregulatory T-helper cell subsets in patients with multiple sclerosis: relapsing-progressive course correlates with enhanced T H1, relapsing-remitting course with enhanced T H0 reactivity*. *J Neuroimmunol*, 2002. **133**(1-2): p. 175-83.
24. Dumortier, H., S. Lacotte, G. Pastorin, R. Marega, W. Wu, D. Bonifazi, J.P. Briand, M. Prato, S. Muller, and A. Bianco, *Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells*. *Nano Lett*, 2006. **6**(7): p. 1522-8.
25. Fujimoto, M., M. Nakano, F. Terabe, H. Kawahata, T. Ohkawara, Y. Han, B. Ripley, S. Serada, T. Nishikawa, A. Kimura, S. Nomura, T. Kishimoto, and T. Naka, *The Influence of Excessive IL-6 Production In Vivo on the Development and Function of Foxp3+ Regulatory T Cells*. *J Immunol*.
26. Ullman, K.S., J.P. Northrop, C.L. Verweij, and G.R. Crabtree, *Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link*. *Annu Rev Immunol*, 1990. **8**: p. 421-52.

27. Lanier, L.L., D.W. Buck, L. Rhodes, A. Ding, E. Evans, C. Barney, and J.H. Phillips, *Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 activation antigen*. J Exp Med, 1988. **167**(5): p. 1572-85.
28. Risso, A., M.E. Cosulich, A. Rubartelli, M.R. Mazza, and A. Bargellesi, *MLR3 molecule is an activation antigen shared by human B, T lymphocytes and T cell precursors*. Eur J Immunol, 1989. **19**(2): p. 323-8.
29. Dellinger, A., Z. Zhou, S.K. Norton, R. Lenk, D. Conrad, and C.L. Kepley, *Uptake and distribution of fullerenes in human mast cells*. Nanomedicine.
30. Porter, A.E., K. Muller, J. Skepper, P. Midgley, and M. Welland, *Uptake of C60 by human monocyte macrophages, its localization and implications for toxicity: studied by high resolution electron microscopy and electron tomography*. Acta Biomater, 2006. **2**(4): p. 409-19.
31. Rabinowich, H., P. Sedlmayr, R.B. Herberman, and T.L. Whiteside, *Response of human NK cells to IL-6 alterations of the cell surface phenotype, adhesion to fibronectin and laminin, and tumor necrosis factor-alpha/beta secretion*. J Immunol, 1993. **150**(11): p. 4844-55.
32. Liu, Y., F. Jiao, Y. Qiu, W. Li, Y. Qu, C. Tian, Y. Li, R. Bai, F. Lao, Y. Zhao, Z. Chai, and C. Chen, *Immunostimulatory properties and enhanced TNF- alpha mediated cellular immunity for tumor therapy by C60(OH)20 nanoparticles*. Nanotechnology, 2009. **20**(41): p. 415102.
33. Kolosnjaj, J., H. Szwarc, and F. Moussa, *Toxicity studies of fullerenes and derivatives*. Adv Exp Med Biol, 2007. **620**: p. 168-80.
34. Bolskar, R.D., *Gadofullerene MRI contrast agents*. Nanomed, 2008. **3**(2): p. 201-13.
35. Nosik, D.N., I.K. Lialina, L.B. Kalnina, O.A. Lobach, M.S. Chataeva, and L.D. Rasnetsov, *[The antiretroviral agent Fullevir]*. Vopr Virusol, 2009. **54**(5): p. 41-3.
36. Dutta, R.C., *Drug carriers in pharmaceutical design: promises and progress*. Curr Pharm Des, 2007. **13**(7): p. 761-9.

8 Danksagung

Mein besonderer Dank für die freundliche Unterstützung und Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit geht an...

... meine Eltern, denen ich gar nicht genug danken kann für ihre uneingeschränkte Unterstützung, endlose Geduld in allen Anliegen und die Ermöglichung meiner Ausbildung.

... Frau Professor Reinhild Klein, für das mir entgegengebrachte Vertrauen, das Bereitstellen des Themas und der Arbeitsmöglichkeiten im immunpathologischen Labor der Universität Tübingen. Die motivierende und begeisternde Begleitung und die exzellente Betreuung.

... alle Mitarbeiter des immunpathologischen Labors. Insbesondere gilt mein Dank Sandra Plankenhorn für die Einarbeitung in die Arbeitsmethoden und die Unterstützung zu jeder Zeit.

... Herrn Professor Rammensee, für die Aufnahme und die Zeit im Graduiertenkolleg 794 „Zellbiologische Mechanismen immunassoziierter Prozesse“.

... alle Doktoranden aus dem immunpathologischen Labor und dem Graduiertenkolleg für interessante Diskussionen, Anregungen und Unterstützung.

... die Welt, die so schöne und spannende Dinge bereit und versteckt hält, dass wir sie finden und erforschen dürfen.