

**Wirkungen von Aminothalidomid und Suramin
auf die LPS-induzierte Zytokinbildung von TNF α , IL-12p40 und IL-10
in CD-14⁺-Monozyten**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Felicitas Thom geb. Priboth

aus Leipzig
2005

Berichtersteller: Prof. Dr. H. W. Klein
Prof. Dr. S. Waffenschmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 08. Juli 2005

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2001 bis März 2005 am Institut für Biochemie an der Universität zu Köln unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. W. Klein betreut. Die praktischen Arbeiten wurden in den Laboren der Abteilung Molekulare Pharmakologie der Grünenthal GmbH unter Betreuung von Herrn Dr. T. Germann durchgeführt.

Danke an alle, die auf vielfältige Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!

Herrn Prof. Dr. H. W. Klein danke ich sehr für die Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit. Insbesondere danke ich ihm für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen.

Bei Frau Prof. Dr. S. Waffenschmidt möchte ich mich herzlich für die Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten, bedanken. Prof. Plickert danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Der Grünenthal GmbH danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Möglichkeit die praktischen Arbeiten in den Laboren der Grünenthal GmbH durchzuführen. Hier möchte ich Herrn Dr. U. Jähnel und Frau Dr. U. Hennig für die Unterstützung bei der Umsetzung dieser Idee danken.

Herrn Dr. T. Germann danke ich für die Überlassung des Themas und die fachliche Unterstützung. Herrn Dr. E. J. Wade gebührt mein besonderer Dank für die ständige Bereitschaft zu wissenschaftlichen Diskussionen und die daraus resultierenden Anregungen für neue Fragestellungen. Bei Frau Dr. S. Frosch möchte ich mich ebenfalls für die gewährte Unterstützung bedanken.

Allen Mitarbeitern aus den Laboren der Grünenthal GmbH danke ich für die gute Zusammenarbeit. Bei Hannelore Stockhausen und Silke Vassen möchte ich mich besonders für das angenehme Arbeitsklima und die Unterstützung in praktischer Hinsicht bedanken. Gern denke ich an die gemeinsame Zeit im Labor zurück.

Bei Frau Dr. S. König bedanke ich mich herzlich für die Durchsicht der Arbeit.

Schließlich danke ich meinen Freunden für ihr Verständnis und ihre Hilfe während dieser Arbeit.

Der größte Dank gebührt jedoch Hans, meinen Eltern, Ute, meinen Schwiegereltern, meiner Schwester und allen anderen hier nicht namentlich genannten Mitgliedern meiner Familie. Sie alle gaben mir den nötigen Rückhalt und unterstützten mich auf vielfältige Weise.

Kurzzusammenfassung

Ein Ansatz zur Therapie von Autoimmunerkrankungen liegt in der Beeinflussung der fehlregulierten Zytokinbildung von Immunzellen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation der Bildung der pro-entzündlichen Zytokine TNF α und IL-12(p40) sowie des anti-entzündlichen Zytokins IL-10 im Modell der LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten durch Aminothalidomid und Suramin untersucht. In LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten verringerte Aminothalidomid die TNF α - und IL-12(p40)-Bildung fast vollständig, während die IL-10-Bildung gesteigert wurde (mRNA- und Protein-Ebene). Aminothalidomid veränderte die IL-12(p40)- bzw. IL-10-Bildung aufgrund einer veränderten Zahl an sezernierenden CD-14⁺-Monozyten. Die Wirkung von Aminothalidomid auf die IL-12(p40)-Bildung erfolgte unabhängig von der gleichzeitigen Steigerung der IL-10-Bildung und wurde nicht über die bekannte, hemmende Wirkung des IL-10-Proteins auf die IL-12-Bildung vermittelt.

Suramin führte zur Inaktivierung von biologisch aktivem IL-10-Protein, wodurch die hemmende Wirkung des IL-10-Proteins auf die TNF α - und IL-12-Bildung verhindert wurde. Dies führte zu einer gesteigerten TNF α - und IL-12(p40)-Bildung (mRNA- und Protein-Ebene).

Abstract

In many autoimmune diseases, a dysregulation of the production of the pro- and anti-inflammatory cytokines such as TNF α and IL-12 and the anti-inflammatory cytokine IL-10 has been observed. One possible approach to treating such diseases would be using immunomodulatory substances that change the rate of the production of these pro- and anti-inflammatory cytokines. The effect of 4-amino-thalidomide and suramine on the LPS-stimulated cytokine production of TNF α , IL-12 and IL-10 has been studied in CD-14⁺-monocytes.

4-amino-thalidomide decreased the production of TNF α , IL 12(p40) and raised the secretion of IL-10 in LPS-stimulated CD-14⁺-monocytes (on both mRNA and protein level). Staining of individual LPS-activated CD-14⁺-monocytes showed that most of the cells were IL-12-positive in the absence of 4-amino-thalidomide whereas only a few cells showed a weak signal in its presence. In contrast, the vast majority of LPS-activated CD-14⁺-monocytes had a strong staining for IL-10 in the presence of 4-amino-thalidomide. Time course analysis demonstrated that in the presence of 4-amino-thalidomide the IL-10-protein could be detected earlier than in the LPS-control group and higher amounts of IL-10 were measured in the supernatant. All in all, the experiments described here demonstrate the 4-amino-thalidomide modulates TLR4-signaling by LPS-activated CD-14⁺-monocytes, resulting in strong inhibition of TNF α , IL-12p40, and a pronounced upregulation of IL-10 synthesis at the protein as well as mRNA level and that both effects are regulated independently by 4-amino-thalidomide.

Suramine inactivated the biological activity of human IL-10 Protein. Therefore, no feedback-repression on the production of IL 12(p40) and TNF α occurred, resulting in an increased TNF α - and IL-12(p40)-production (on both mRNA and protein level). The 10-production (mRNA and protein) in LPS-stimulated CD-14⁺-monocytes was not affected by suramine.

INHALT

1	Einleitung	1
1.1	<i>Das Immunsystem und die unspezifische Immunabwehr.....</i>	<i>1</i>
1.1.1	Das mononukleär-phagozytäre System	1
1.1.2	Aktivierung von Monozyten durch Lipopolysaccharide	2
1.2	<i>Die Apoptose.....</i>	<i>5</i>
1.2.1	Apoptose und ihre Rolle im Immunsystem	5
1.2.2	Ablauf der Apoptose.....	5
1.3	<i>Die Zytokine TNFα, IL-12 und IL-10.....</i>	<i>7</i>
1.3.1	Bedeutung der Zytokine TNF α , IL-12 und IL-10.....	7
1.3.2	Tumornekrosefaktor α	8
1.3.3	Interleukin-12	9
1.3.4	Interleukin-10	10
1.4	<i>Das Modell der LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten.....</i>	<i>11</i>
1.5	<i>Die Wirkungen von Thalidomid, Aminothalidomid und Suramin.....</i>	<i>13</i>
1.6	<i>Aufgabenstellung.....</i>	<i>16</i>
2	Ergebnisse	17
2.1	<i>Das Modell der LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten.....</i>	<i>17</i>
2.1.1	Notwendigkeit des Modells der LPS-stimulierten CD-14 ⁺ -Monozyten.....	17
2.1.2	Isolierung und Stimulierung der CD-14 ⁺ -Monozyten	17
2.1.3	Messung der Zytokinbildung.....	18
2.1.4	Untersuchungen zur Apoptose, Nekrose und Viabilität	27
2.2	<i>Die Wirkungen von Aminothalidomid nach LPS-Stimulation</i>	<i>34</i>
2.2.1	Untersuchungen im Proteinarray	34
2.2.2	Proteinbildung von TNF α , IL-12p40 und IL-10.....	35
2.2.3	Untersuchungen zur IL-12p40-Hemmung durch Aminothalidomid	42
2.2.4	Beeinflussung der Zytokinbildung in unterschiedlichen Zellpopulationen ..	44
2.3	<i>Die Wirkungen von Suramin nach LPS-Stimulation</i>	<i>46</i>
2.3.1	Untersuchung im Proteinarray	46
2.3.2	Proteinbildung von TNF α , IL-12p40 und IL-10.....	46
2.4	<i>Die Wirkungen von Aminothalidomid und Suramin nach TNFα-Stimulation.....</i>	<i>56</i>
2.5	<i>Die Beeinflussung der MAPK.....</i>	<i>57</i>
2.5.1	Wirkung von MAPK-Inhibitoren	57
2.5.2	Wirkung des ERK1/2-Inhibitors und in Gegenwart des p38-MAPK-Inhibitors	61
2.5.3	Wirkung von Aminothalidomid in Gegenwart von MAPK-Inhibitoren.....	63
2.5.4	Suraminwirkung in Gegenwart des p38-MAPK-Inhibitors SB203580.....	67

2.6	<i>Die Beeinflussung der Phosphorylierung der p38α-MAPK</i>	68
2.6.1	LPS-induzierte p38 α -Phosphorylierung	68
2.6.2	Anisomycin-induzierte p38 α -Phosphorylierung.....	69
3	Diskussion	71
3.1	<i>Das Modell der LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten</i>	71
3.1.1	Zytokinbildung von LPS-aktivierten CD-14 ⁺ -Monozyten	71
3.1.2	Haushaltsgene und die Beeinflussung der Apoptose.....	72
3.1.3	Wirkung von Aminothalidomid und Suramin auf Apoptose und Viabilität der CD-14 ⁺ - Monozyten	74
3.2	<i>Die Wirkungen von Aminothalidomid nach LPS-Stimulation</i>	76
3.2.1	Wirkung im Proteinarray	76
3.2.2	Wirkung auf die TNF α -, IL-12p40- und IL-10-Bildung	77
3.3	<i>Die Wirkungen von Suramin nach LPS-Stimulation</i>	81
3.3.1	Wirkung von Suramin auf das IL-10-Protein	81
3.3.2	Wirkung von Suramin auf die TNF α - und IL-12p40-Bildung	83
3.4	<i>Wirkungen von Aminothalidomid und Suramin nach TNFα-Stimulation</i>	85
3.5	<i>Der Einfluss der MAPK-Kinasen auf die Zytokinbildung</i>	86
3.5.1	JNK-Signalweg.....	86
3.5.2	ERK1/2-Signalweg.....	87
3.5.3	p38-MAPK-Signalweg	87
3.5.4	Beeinflussung der MAPK durch Aminothalidomid und Suramin.....	90
3.6	<i>Ausblick</i>	92
4	Zusammenfassung	93
5	Material und Methoden	95
5.1	<i>Laborgeräte</i>	95
5.2	<i>Chemikalien</i>	95
5.3	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	97
5.4	<i>Zellkultur</i>	97
5.4.1	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität.....	97
5.4.2	Lösungen, Medien und Medienzusätze	98
5.4.3	Isolierung von PBMCs und CD14 ⁺ -Monozyten	98
5.4.4	Zellkultur und Stimulationsexperimente	99
5.5	<i>Nachweis der Zytokinproduktion</i>	100
5.5.1	ELISA	100
5.5.2	ELISpot.....	101
5.5.3	Proteinarray	101

5.6	<i>RNA-Isolierung und RT-PCR</i>	102
5.6.1	RNA-Isolierung	103
5.6.2	Bestimmung der Reinheit und Konzentration der RNA.....	103
5.6.3	Reverse Transkription.....	104
5.6.4	Real Time PCR.....	104
5.7	<i>Messung der Zytotoxizität und Apoptose</i>	106
5.7.1	AlamarBlue™.....	106
5.7.2	Cell Death Detection ELISA®	106
5.7.3	Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay.....	107
5.8	<i>Nachweis der Phosphorylierung der p38-MAPK</i>	107
5.8.1	Aufarbeitung der Proben.....	107
5.8.2	Untersuchung der MAPK-Phosphorylierung	108
5.9	<i>Statistik</i>	108
6	Literatur	109
7	Anhang	123

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Aminoth.	Aminothalidomid
Antikörper, anti-IL-10-Ak	Antikörper, neutralisierende IL-10–Antikörper
AP-1	Aktivierendes Protein 1
APCs	Antigen präsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
Bp (kBp)	Basenpaare, (Kilobasenpaare)
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CD	Oberflächenprotein CD (cluster of differentiation)
cDNA	kopierte Desoxyribonucleinsäure
d.h.	das heisst
Da (kDa)	Dalton (Kilodalton)
dd NTP	Didesoxyribonucleosidtriphosphat (didesoxy nucleosidtriphosphat)
DDT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E.K.	Endkonzentration
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FCS	fötale Kälberserum
GAPDH	Glycerin Aldehyde 3-phosphat Dehydrogenase
GB	Gesamtblut
h	Stunden
HK-Gene	Haushaltsgene
HPRT	Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase
IFN γ	Interferon- γ
IgG	Immunglobuline
IKK	IkappaB Kinase
IL	Interleukin
IL-10R	IL-10-Rezeptor
IL-1Ra	Interleukin-1 Rezeptor Antagonist
JNK	c-Jun Amino-Terminale Kinase
KM	Kulturmedium
LM	Lösungsmittel
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molekulargewicht
MAB	monoklonaler Antikörper
MACS	MAGnetic Cell Separation
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MHC	Major Histokompatibilitäts-Komplex
min	Minuten
Mono	CD-14 ⁺ -Monozyten
MOPS	3-Morpholinpropansulfonsäure
MPS	Mononukleär-Phagozytäres System
NF- κ B	Nuclear Faktor kappa B

NK	Negativkontrolle
¹ H-NMR	proton nuclear magnetic resonance
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAMP	pathogen-associated-molecular pattern
PBMCs	periphere blutmononukleäre Zellen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PI3-Kinase	phosphoinositide 3-kinase
PK	Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate
PPR	pattern recognition receptor
rh	rekombinantes in E.Coli hergestelltes humanes Protein
RNase	Ribonuklease A
RPK	Rezeptor Protein Kinase
RT	Reverse Transkription oder Raumtemperatur
SAC	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAP	Shrimp Alkalische Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SeICIDs™ bzw. ImiDS™	selective cytokine inhibitory drugs bzw. immunomodulatory drugs
STAT	signal transducers and activators of transcription
Th1 und Th2	Typ1 Helferzellen und Typ2 Helferzellen
TIR-Domäne	Toll/IL-1R homology domain
TLR	Toll Like Rezeptor
TNFR1 / TNFR2	Tumor Necrose Faktor Rezeptor I bzw. II
TNFα	Tumor Necrose Faktor α
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UE	Untereinheit
UV	Ultraviolett
v/v	volumen / volumen
w/v	weight / volumen

1 EINLEITUNG

1.1 Das Immunsystem und die unspezifische Immunabwehr

Zum Immunsystem (lat. immunis = frei, unberührt) werden Organe, Zellen und Eiweißkörper zusammengefasst, deren Funktion in der Erhaltung der Individualstruktur durch die Abwehr körperfremder Substanzen und Krankheitserreger besteht^{1,2}. Zusätzlich ist es in der Lage, krankhaft veränderte körpereigene Zellen zu erkennen und zu beseitigen. Dem Organismus stehen unspezifische und spezifische Abwehrmechanismen zur Verfügung, welche sich bei einer Immunantwort gegenseitig ergänzen (Tab. 1). Die angeborene, unspezifische Immunität ist vor allem bei der Bekämpfung bakterieller Infektionen von Bedeutung, während die erworbene, spezifische Immunität gegen Krankheitserreger wie Viren, Parasiten oder Pilze gerichtet ist.

Tab. 1 Das Immunsystem

Das Immunsystem lässt sich in die unspezifische und die spezifische Immunabwehr aufteilen, wobei sich die unspezifische Immunabwehr gegen körperfremde Bestandteile richtet, während die spezifische Immunabwehr den vorhergehenden Kontakt mit dem gleichen oder einem sehr ähnlichen Erreger voraussetzt. Die zelluläre Abwehr besteht ausschließlich aus Blutzellen, die der unspezifischen (Phagozyten) und spezifischen Abwehr (T-Lymphozyten) dienen. Die Stoffe der humoralen Abwehr befinden sich in Körperflüssigkeiten. Die humorale Abwehr unterteilt sich in das Komplement und die Antikörper. Das Komplement ist ein im Plasma vorhandenes Enzymsystem, das mit Antigen-Antikörper-Komplexen reagiert. Antikörper werden in den lymphatischen Organen (Thymus, Lymphknoten, Milz) von Plasmazellen und B-Zellen (B-Lymphozyten, Plasmazellen, B-Gedächtniszellen) gebildet.

Abwehr	zellulär	humoral
unspezifisch	Phagozyten Granulozyten Monozyten Makrophagen Killerzellen	Komplement Zytokine Lysozym
spezifisch	T-Lymphozyten zytolytische T-Zellen (CD8-Zellen) regulatorische T-Zellen/T-Helferzellen (CD4-Zellen / Th-Zellen)	Antikörper gebildet von Plasma- und B-Zellen

1.1.1 Das mononukleär-phagozytäre System

Die Monozyten gehören zur Gruppe der Phagozyten und damit zu den Zellen der unspezifischen Immunabwehr. Monozyten werden aus Vorläuferzellen (Monoblasten und Promonozyten) im Knochenmark gebildet³. Der Monozyt wechselt vom Knochenmark in den Blutkreislauf und tritt nach ein bis drei Tagen durch aktives Überbrücken des Endothels der Blutgefäße in angrenzende Gewebe bzw. Organe ein^{4,5}. Dort differenzieren Monozyten unter spezifischen lokalen Einflüssen zu Makrophagen aus und übernehmen, je nach Organ bzw. Gewebe spezifische Funktionen. Die Gesamtheit der Monozyten und Makrophagen wird als mononukleär-phagozytäres System (MPS) bezeichnet und spielt eine zentrale Rolle bei der unspezifischen Abwehr⁶.

Auf der Oberfläche von Zellen der angeborenen Immunabwehr befinden sich so genannte konservierte Rezeptoren (PPR = pattern recognition receptor), welche die Erkennung von unterschiedlichen Strukturmerkmalen von mikrobiellen Pathogenen (PAMP = pathogen-associated-molecular pattern) erlauben⁷. Das Oberflächenprotein CD14 (cluster of differentiation 14) und die Toll Like Rezeptoren (TLR) sind Beispiele für konservierte Rezeptoren auf den Monozyten⁸. Über die PPR werden Effektormechanismen der angeborenen Immunabwehr gestartet. So werden biologisch aktive Substanzen von den Zellen sezerniert, wodurch wiederum weitere Zellen des MPS aktiviert werden. Eindringlinge können durch die Zellen der unspezifischen Immunabwehr phagozytiert werden, wobei einzelne Bestandteile des phagozytierten Materials an der Oberfläche der Monozyten präsentiert werden. Dadurch werden die Zellen der spezifischen Immunabwehr aktiviert und die Bildung von Antikörpern wird in Gang gesetzt^{1,2}. Aufgrund dessen bilden die Monozyten eine Brücke zwischen der unspezifischen und der spezifischen Immunabwehr.

1.1.2 Aktivierung von Monozyten durch Lipopolysaccharide

Das CD14-Protein wird auf der Oberfläche von Monozyten exprimiert und ist über einen Glykosylphosphatidylinositol-Schwanz in der Membran verankert⁸. Monozyten erkennen gram-negative Bakterien (z.B. *Escherichia coli*) über Lipopolysaccharide (LPS), einem Bestandteil der äußeren Zellmembran der gram-negativen Bakterien⁸. Lipopolysaccharide bestehen aus einem hydrophoben Lipid A, welches das LPS in der äußeren Membran der gram-negativen Bakterien verankert und einem hydrophilen Zuckeranteil, dem Polysaccharid^{9,10}. Die Mechanismen zur Erkennung von LPS in CD-14⁺-Monozyten und die ausgelösten Signalwege sind in Abb. 1 vereinfacht zusammengefasst¹¹. Zuerst bindet ein Transferprotein lipid binding protein (LBP) das LPS am Lipid A und transportiert dieses an die Oberfläche des Monozyten zum CD14-Oberflächenprotein. Das Oberflächenprotein MD-2 bindet an den TLR4 und erlaubt die Bildung eines stabilen Rezeptorkomplexes von LPS, MD-2 und TLR4. Weitere Untersuchungen zum TLR-Signalweg in anderen Zellen, führten zu der Annahme, dass dieser Komplex in sogenannte Rezeptosomen zerfällt und es zur Rekrutierung des intrazellulären Adapterproteins Myd88 (Myd88 = myeloid differentiation marker 88) kommt. Anschliessend bindet Myd88 an die C-terminale Region des TLR4 und über die N-terminale Domäne an die IRAK (IRAK = interleukin-1 receptor-associated kinase) und TRAF6 (TRAF6 = tumor necrosis factor receptor associated factor 6), wodurch verschiedene Signalwege aktiviert werden¹². Wie in Abb. 1 gezeigt, werden in Monozyten hauptsächlich die MAPK-Signalwege (MAPK = mitogen activated protein kinases), der IKK-Signalweg (IKK = IκB Kinase) und der PI3K-Signalweg (PI3K = phosphoinositide 3-kinase) ausgelöst¹¹. Die Aktivierung des IKK-Signalweges und des PI3K-Signalweges in CD-14⁺-Monozyten führt zur Degradierung der IκB (IκB = inhibitory subunit of nuclear factor kappa B) und erlaubt so den Transport des Transkriptionsfaktors NF-κB (NF-κB = nuclear factor kappa B) in den Zellkern. Die Aktivierung der MAPK führt ebenfalls zur direkten oder indirekten Phosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, wodurch die Transkription verschiedener Gene, u.a. auch die Expression von TNFα, IL-12p40 und IL-10 reguliert wird¹¹.

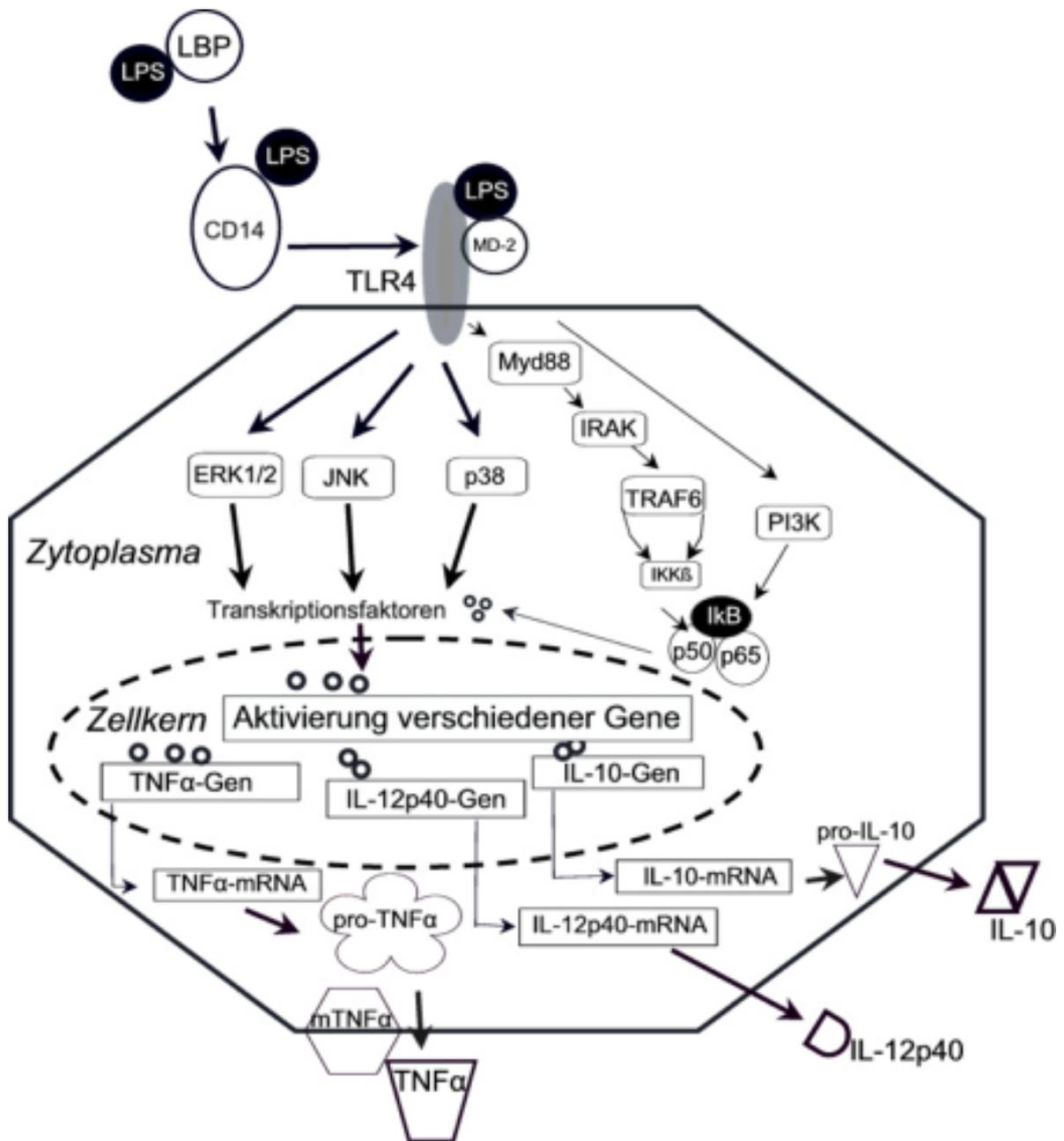


Abb. 1: LPS-Stimulation von CD14⁺-Monozyten (vereinfachte Darstellung aus Guha¹¹)

Dargestellt sind Bindung der LPS und die Aktivierung von CD-14⁺-Monozyten über den TLR4. In CD-14⁺-Monozyten werden hauptsächlich die MAPK-Signalwege (ERK1/2, JNK, p38), der IKK-Signalweg (über Myd88, IRAK, TRAF-6) und der PI3K-Signalweg aktiviert.

Erläuterungen: siehe im Haupttext.

Abkürzungen: LPS = Lipopolysaccharide, LBP = lipid binding protein, CD14 = cluster of differentiation 14, MD-2 = accessory protein of TLR4, TLR4 = toll like receptor4, Myd88 = myeloid differentiation marker 88, IRAK = interleukin-1-receptor associated kinase, TRAF6 = tumor necrosis factor receptor associated factor 6, IKK = I kappa B Kinase, IκB = inhibitory subunit of nuclear factor kappa B, PI3K = phosphoinositide 3-kinase, p50/65 = p50/65 subunit of nuclear factor kappa B, MAPK = mitogen activated protein kinases, ERK1/2 = extracellular signal-regulated kinase, JNK = c-Jun N-terminal kinase, p38 = p38 MAPK, TNFα = Tumornekrosefaktor α, IL-12p40 = Interleukin-12p40, IL-10 = Interleukin-10

1.1.2.1 MAPK-Signalwege und der Einfluss von Inhibitoren

Die durch LPS aktivierten MAPKKK (MAPKKK = mitogen activated protein kinases kinases) phosphorylieren die MAPKK (MAPKK = mitogen activated protein kinases kinases), welche wiederum die MAPK (MAPK = mitogen activated protein kinases) aktivieren. Zur Familie der MAPK gehören die extrazellulär-regulierten Kinasen (ERK1 und ERK2), die c-Jun-NH₂-Terminus Kinasen 1/2/3 (JNK1/2/3) sowie die p38-MAPK^{13;14,15,16}. Die MAPK sind Serin-/Threonin Proteinkinasen, die einen Prolin-Rest in der Substratregion erkennen und sowohl zytoplasmatische als auch nukleäre Proteine phosphorylieren können¹⁷.

ERK1/2 werden insbesondere durch Wachstumsfaktoren und Mitogene stimuliert und spielt bei Wachstum bzw. Differenzierungs- und Entwicklungsvorgängen eine Rolle¹⁸. Die p38-MAPK und JNK1/2/3 werden vor allem durch Stressfaktoren und teilweise durch inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert und sind insbesondere bei Entzündungsprozessen, der Apoptose und dem Wachstum sowie z.T. bei Differenzierungsprozessen beteiligt¹¹.

Die Untersuchung der Signalwege erfolgte durch den Einsatz von pharmakologischen Inhibitoren, welche insbesondere Kinasen spezifisch hemmen¹⁹. Die Aminosäuren in der ATP-Bindungstasche (ADP = Adenosintriphosphat) von Kinasen sind konserviert²⁰. Da die meisten eingesetzten Kinase-Inhibitoren kompetitiv mit ATP um die Bindung in der ATP-Bindungsstelle konkurrieren, wirken diese möglicherweise auch unspezifisch auf weitere Kinasen¹⁹. Die Tab. 2 gibt einen Überblick über Inhibitoren, welche bei der Untersuchung der drei MAPK-Signalwege verwendet werden.

Tab. 2: Überblick über pharmakologische Kinase-Inhibitoren^{19;21}

Name des Signalweges	Name des Inhibitors	Wirkprinzip
ERK1/2	PD 98059	bindet an die dephosphorylierte Form MEK1/2 verhindert die Phosphorylierung von ERK 1/2, keine Wirkung auf p38-MAPK oder JNK
ERK1/2	UO126	Selektiver Inhibitor der MAPK-Kinase MEK-1 verhindert die Aktivierung der MEK1 stärker als die bereits aktivierte MEK1 zu hemmen keine Effekt auf MAP-Kinase p38 oder JNK
p38-MAPK	SB 203580	blockiert selektiv die ATP-Bindungsstelle der p38α/β-MAPK kein Effekt auf MAP-Kinase ERK 1/2 oder JNK
p38-MAPK	SB202474	inaktive Kontrolle für SB203580
JNK1/2/3	SP600125	Inhibitor der JNK1/2/3

1.2 Die Apoptose

1.2.1 Apoptose und ihre Rolle im Immunsystem

Die Apoptose ist eine physiologische Form des Zelltodes und ein genetisch regulierter Vorgang, welcher die koordinierte Expression verschiedener Gene erfordert. Apoptotische Zellen sind durch eine Vielzahl von morphologischen Veränderungen (wie z.B.: Schrumpfen der Zelle, Aktivierung von DNAsen, DNA-Fragmentierung) geprägt. Kommt es zu Verletzungen der Zellen (z.B. mechanisch, chemisch) werden zytoplasmatische Enzyme und toxische Metabolite unkontrolliert freigesetzt, wodurch es zur Schädigung von benachbartem Gewebe kommt. Dieser Vorgang wird als Nekrose bezeichnet und im Gegensatz zur Apoptose von einer Entzündungsreaktion begleitet.

Der Organismus ist mittels Apoptose in der Lage, sich an die Umgebung anzupassen und überflüssige Zellen zu eliminieren. Störungen der Apoptose, die zu einer erniedrigten oder erhöhten Zelltodesrate führen, können zum Auftreten von Tumor- und Autoimmunerkrankungen führen²². Die Apoptose spielt während der Entwicklung des Immunsystems sowie dem Abtöten von Immunzellen eine wichtige Rolle und dient u.a. der Regulation der Anzahl an Monozyten und Makrophagen. In Abwesenheit von spezifischen Stimuli fallen Monozyten *in vitro* spontan dem Prozess des programmierten Zelltods (spontane Apoptose) anheim²³⁻²⁵. Da apoptotische Zellen die Bildung von Zytokinen beeinflussen können²⁶, ist es notwendig die CD-14⁺-Monozyten auf ihre Viabilität bzw. auf apoptotische/nekrotische Vorgänge zu untersuchen.

1.2.2 Ablauf der Apoptose

Jede Körperzelle besitzt die zur Apoptose notwendigen Proteine, welche konstitutiv exprimiert werden. Die unkontrollierte Apoptose wird dadurch verhindert, dass die Proteine als inaktive Vorstufen vorliegen oder sich in Kompartimenten befinden, in welchen sie nicht wirksam werden. Durch einen spezifischen Stimulus wird der apoptotische Prozess initiiert. Apoptose kann in Abhängigkeit vom Stimulus über mindestens zwei verschiedene Wege ausgelöst werden (siehe Abb. 2):

- über spezifische Liganden membranständiger Todesrezeptoren (extrinsischer Signalweg oder extrinsic pathway) oder
- durch den Mangel an Überlebensfaktoren oder durch zytotoxische Faktoren, wodurch über verschiedene Mechanismen Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt wird (mitochondrial pathway oder intrinsic pathway).

Am Prozess der Apoptose sind verschiedene Enzyme, wie Endonukleasen oder Caspasen beteiligt. Endonukleasen spalten doppelsträngige DNA an der internukleosomalen Linker-Region. Hierdurch entstehen mono- und oligonukleosome DNA-Fragmente von 180 Bp, welche in der Gelelektrophorese aufgetrennt werden können und zum typische Bild der DNA-Leiter führen. Die Anreicherung von mono- und oligonukleosomen DNA-Fragmenten erfolgt über mehrere Stunden, bevor die Plasmamembran aufreißt, sodass bei ausgelöster Apoptose -im Gegensatz zur Nekrose- kein sofortiger Verlust der Zellpermeabilität und damit eine unkontrollierte Zerstörung der Plasmamembran erfolgt.

Die Familie der Caspasen (Casp.), welche in Initiator-Caspasen und Effektor-Caspasen werden, gehören zu den die Schlüsselenzyme der Apoptose^{27,28}. Caspasen, sind intrazelluläre Proteasen und hydrolysieren ihre Substrate am Carboxy-Terminus eines Aspartat-Restes. Überwiegend führt erst die Spaltung der Substrate der Effektor-Caspasen zu einer direkten oder indirekten Zerstörung der strukturellen Integrität der Zellen. Eine Hemmung der Effektor-Caspasen verhindert in den meisten Zellen die Apoptose. Durch den Einsatz von synthetisch hergestellten Caspase-Inhibitoren wie DEVD-CHO bzw. DEVD-FMK (hemmt Caspase-3/-7) oder zVAD-FMK (hemmt Caspase-8 und ein breites Spektrum an Caspasen), ist eine spezifische Hemmung von Caspasen möglich (Abb. 2)²⁹.

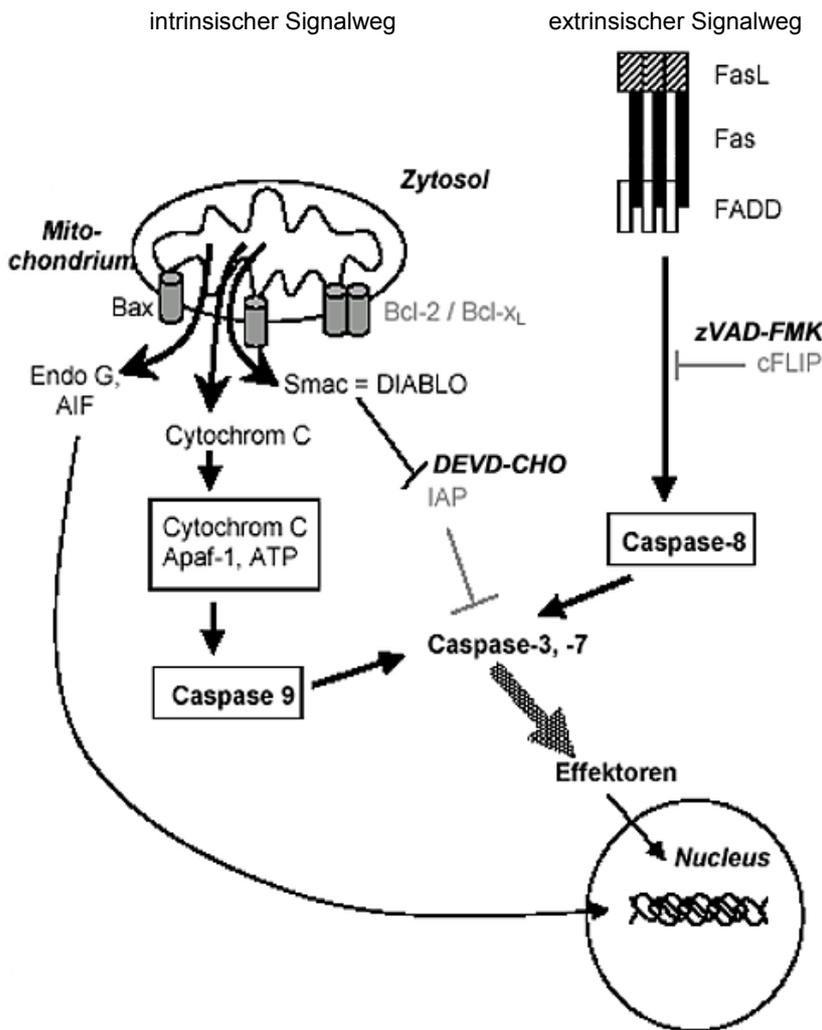


Abb. 2: Schematische Darstellung der intrazellulären Vorgänge in der Apoptose

Die schwarzen Pfeile markieren die beiden Signalwege (extrinsischer Signalweg und mitochondrial pathway). Der extrinsische Signalweg wird durch Liganden der TNF-Rezeptorfamilie initiiert, wodurch die Rezeptoren aktiviert werden. Es erfolgt eine Trimerisierung des Rezeptors und eine Rekrutierung der Proform der Initiator-Caspase-8 und die Bildung des DISC (Death Inducing Signaling Complex, nicht gezeigt). Innerhalb des DISC erfolgt durch autokatalytische Spaltung der Pro-Caspase 8 die Bildung der aktiven Caspase-8. Diese löst dann wiederum eine Aktivierung der Effektor-Caspasen-3/-7 aus, wodurch es zur Auslösung der Apoptose kommt. Im intrinsischen Signalweg diffundieren Proteine, wie u.a. das Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytosol. Im Zytosol bindet Cytochrom C an Apaf-1 (apoptosis protease-activating factor-1) und ATP. Es erfolgt eine ATP-abhängige Aktivierung der Caspase-9. Die Caspase-9 aktiviert dann wiederum die Effektor-Caspasen-3/-7, welche auch beim extrinsischen Signalweg aktiviert werden. Der Apoptose-Signalweg wird durch verschiedene Proteine (z.B. Flice Inhibitory Protein = FLIP, Bcl-2-Familie (Bcl-2, Bcl-xL und Bax), Inhibitor of Apoptosis Proteins = IAP) an unterschiedlichen Stellen des Apoptose-Signalweges reguliert^{27,30}.

1.3 Die Zytokine TNF α , IL-12 und IL-10

Zytokine sind Proteine, die u.a. von Leukozyten produziert werden, verschiedene Zellen des Immunsystems beeinflussen und somit entzündliche Prozesse innerhalb eines Zytokinnetzwerks regulieren³¹. Zytokine wirken, indem sie an ihre Rezeptoren binden und so eine intrazelluläre Signalweiterleitung auslösen, welche in einer veränderten Genexpression resultiert (siehe auch Abb. 6).

Zytokine können über verschiedene Nachweismöglichkeiten detektiert werden. So kann die biologische Aktivität *in vitro* (über einen Bioassay), die Zytokinkonzentration in Zellkulturüberständen/Seren (über ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), Proteinarray, oder ELISpot) gemessen werden³²⁻³⁴. Ebenfalls ist ein Nachweis der Zytokine über die Transkriptmenge (mRNA) in Zelllysaten oder in Einzelzellen möglich³⁵.

Die Einteilung der Zytokine kann durch drei verschiedene Klassifizierungen (funktionelle Klassifizierung, aufgrund der Struktur oder ihrer Zuordnung zu ihren Zytokinrezeptoren) erfolgen³⁶. In Bezug auf den Prozess der Entzündung können die Zytokine vereinfachend entweder der Gruppe der pro- (z.B. TNF α , IL-12) oder der Gruppe der anti-inflammatorischen Zytokine (z.B. IL-10) zugeordnet werden.

1.3.1 Bedeutung der Zytokine TNF α , IL-12 und IL-10

Die Modulation des Gleichgewichts zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen spielt vermutlich eine bedeutende Rolle bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen³⁷⁻⁴¹. Bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen, sollen die unerwünschten Entzündungsaktivitäten gestoppt, und die Neubildung von Autoantikörpern verhindert werden. Dies wird über eine Beeinflussung der Aktivität der Immunzellen erreicht. Hierbei werden Immunsuppressiva, Immunmodulatoren oder Blutaustauschverfahren eingesetzt.

Bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise der Rheumatoiden Arthritis, entzündlichen Darmerkrankungen oder der Multiplen Sklerose wurde die chronische Bildung von Zytokinen nachgewiesen⁴²⁻⁴⁴. So wird insbesondere eine Fehlregulation der Bildung des Zytokins Tumornekrosefaktor α (TNF α) für das Auftreten dieser Erkrankungen verantwortlich gemacht^{45,46}. Die entzündlichen Darmerkrankungen sind u.a. durch eine erhöhte Produktion der Zytokine TNF α und Interleukin-12 (IL-12) im Verdauungstrakt charakterisiert⁴⁷. In Tiermodellen für Rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose und entzündliche Darm-, Haut- und Schleimhaut-Erkrankungen, wurde die pathophysiologische Bedeutung von IL-12 gezeigt. Daher ist davon auszugehen, dass bei diesen Autoimmunerkrankungen zuviel IL-12 vorliegt⁴⁸⁻⁵¹. Das anti-inflammatorische Zytokin Interleukin-10 (IL-10) liegt hingegen zuwenig vor. Wird es bei entzündlichen Darmerkrankungen gegeben, so scheint IL-10 im Verdauungstrakt als ein genereller Immunmodulator zu wirken^{52,53}.

1.3.2 Tumornekrosefaktor α

Nach Stimulation durch LPS wird das TNF α -Protein hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen sowie von Neutrophilen sezerniert, wobei auch T-Zellen, aktivierte Killerzellen oder Mastzellen nach Stimulation durch Antigene TNF α -Protein bilden können⁵⁴. Die TNF α -Bildung kann ebenfalls durch andere Zytokine wie beispielsweise durch IFN γ (IFN γ = Interferon gamma) ausgelöst werden⁵⁵.

Das TNF α -Gen ist auf dem Chromosom 6 (6p23-6q12) lokalisiert. Die Synthese von TNF α erfolgt in zwei Schritten. Nicht-glykosylierte Transmembranproteine (233 Aminosäuren, 26 kDA) werden synthetisiert und assoziieren in der Membran zu Homotrimeren. Von jeder Untereinheit des membranständigen TNF α 's kann durch membranständige Metalloproteasen das lösliche Zytokin (157 Aminosäuren, 17 kDA) abgespalten werden. Dadurch entsteht das sezernierte, biologisch aktive homotrimere TNF α -Protein mit 51 kDa⁵⁵. In Abb. 3 ist die dreidimensionale Struktur der sezernierten Form des TNF α -Proteins gezeigt. Die Bildung von humanem TNF α -Protein nach Stimulation mit LPS wird in Monozyten auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene reguliert^{56;57}.



Abb. 3: Dreidimensionale Struktur der sezernierten Form des TNF α -Proteins⁵⁸

In unterschiedlichen Farben die drei Untereinheiten des Homotrimers TNF α .

Das TNF α -Protein kann an den TNF-Rezeptor-I (TNF-RI, 55kDa) und den TNF-Rezeptor-II (TNF-RII, 75k Da) binden. Monozyten exprimieren hauptsächlich den TNF-RII auf ihrer Oberfläche (siehe Abb. 6)⁵⁹. Das TNF α -Protein kann durch die Bindung an seine Rezeptoren, die Bildung von Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-10 in Monozyten oder T-/B-Lymphozyten induzieren^{45;60;61}. TNF α -Protein kann durch Interaktion mit dem TNF α -RI Apoptose induzieren⁴⁵.

TNF α -Protein interferiert mit der Angiogenese, Zelladhäsion und der Infiltration von Tumoren mit Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten⁶². Tumorzellen werden durch TNF α -Protein in ihrem Wachstum verlangsamt oder abgetötet⁶³. Bei Überexpression von TNF α -Protein in transgenen Mäusen wurde gezeigt, dass das TNF α zu chronischer inflammatorischer Arthritis führt, welche durch die Behandlung der Tiere mit monoklonalen Antikörpern gegen TNF α verhindert werden konnte⁶⁴.

1.3.3 Interleukin-12

Hauptsächlich wird IL-12 von Phagozyten (d.h. Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen Zellen) oder Dendritischen Zellen durch Stimulation mit Pathogenen über die TLR produziert⁶⁵.

IL-12 ist ein heterodimeres Protein (75 kDA), dessen Polypeptidketten (p40 und p35) über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind⁶⁶⁻⁶⁸. Die beiden Gene für die Polypeptidketten befinden sich auf verschiedenen Chromosomen und werden unabhängig voneinander reguliert⁶⁹. Die Expression von IL-12p40 wird, im Gegensatz zur Expression von IL-12p35, stark reguliert. Die Transkripte für IL-12p40 wurden nur in Zellen nachgewiesen, welche das biologisch aktive IL-12p70 Heterodimer sezernieren^{60;66,70}. Daher ist die Bildung von IL-12p40 ein Indikator für die Bildung des biologisch aktivem IL-12-Heterodimers⁷¹. Für die Regulation von IL-12p40 werden verschiedene Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise NF- κ B diskutiert⁷²⁻⁷⁴. Abb. 4 zeigt die dreidimensionale Struktur des IL-12p40-Proteins.

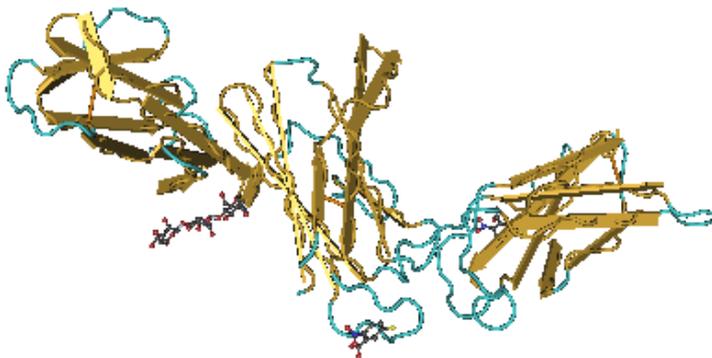


Abb. 4: Dreidimensionale Struktur der IL-12p40-Untereinheit⁶⁹

Dargestellt ist die IL-12p40 Untereinheit des Heterodimers IL-12p70

Das aktive IL-12p70 wird von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten nur unter zusätzlicher Gabe von Interferon gamma (IFN- γ) produziert⁷⁶. Das IL-12-Protein wirkt, wenn es von Monozyten sezerniert wird nur parakrin, da der IL-12-Rezeptor (IL-12R) nur auf T-Zellen, Killerzellen und Dendritischen Zellen, aber nicht auf Monozyten exprimiert wird⁷⁷.

IL-12 spielt eine signifikante Rolle in der Entwicklung der zell-vermittelnden Immunität gegen intrazelluläre Pathogene⁷⁴. Die biologische Aufgabe von IL-12 liegt in der Steuerung der Differenzierung von T-Lymphozyten⁷⁴. Unter dem Einfluss von IL-12 entstehen aus Vorläuferzellen Th1-Zellen, welche zur Sekretion von anderen Zytokinen wie IFN- γ , Interleukin-2 und TNF α angeregt werden^{74;78}. Als pleiotropes Zytokin erfüllt IL-12 jedoch weitere Eigenschaften, wie gesteigertes Wachstum von aktivierten T-Zellen und eine Erhöhung ihrer zytotoxischen Aktivität⁷⁴. Aufgrund dieser Wirkungen spielt IL-12 beim Schutz vor Infektionen mit intrazellulären Bakterien und Viren eine wichtige Rolle⁷⁹.

1.3.4 Interleukin-10

IL-10 wird von LPS aktivierten Monozyten und Mastzellen und von einigen T-Lymphozyten nach Antigen-Stimulation produziert^{80,81}.

Das humane IL-10-Gen befindet sich auf dem Chromosom 1q31-32 und wird aus einem Vorläuferprotein (178 Aminosäuren) synthetisiert⁸². Das reife IL-10-Protein besteht aus 160 Aminosäuren (ca. 18 kDa), mit 6-Helices und enthält –im Gegensatz zum IL-10-Protein der Maus- keine potentiellen N-verbundenen Glykosylierungsstellen⁸²⁻⁸⁴. Das biologisch aktive IL-10-Protein bildet eine V-ähnliches Homodimer aus zwei identischen IL-10-Monomeren, welche nicht über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Zwei Disulfidbrücken wurden innerhalb der α -Helices nachgewiesen, welche für die Erhaltung der Struktur des IL-10-Proteins und damit für die Erhaltung seiner biologischen Aktivität als notwendig erachtet werden⁸⁵. Abb. 5 zeigt die Struktur des IL-10-Monomers.

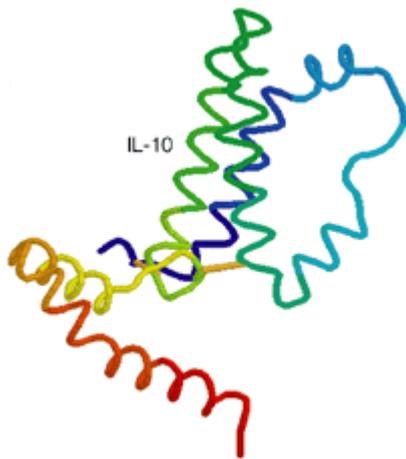


Abb. 5: Struktur des IL-10-Monomers⁸⁶

Das IL-10-Protein bindet an einen der zwei IL-10-Rezeptoren (IL-10RI oder IL-10RII)⁸⁴, wobei auf Monozyten der IL-10RI nachgewiesen wurde (siehe Abb. 6)⁸⁷.

Das IL-10-Protein besitzt überwiegend anti-entzündliche Eigenschaften^{88,84}.

Die hemmende Wirkung von IL-10-Protein auf die Produktion entzündungsfördernder Zytokine zeigt sich auch in vivo, da die Letalität von Mäusen im Tierexperiment für den septischen Schock durch IL-10-Protein erniedrigt wurde⁸⁹. Die Bedeutung von IL-10-Protein für entzündliche Darmerkrankungen zeigten Untersuchungen von IL-10 Knockout-Mäusen, welche spontan eine Kolitis entwickelten⁹⁰.

1.4 Das Modell der LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten

Die Beeinflussung des Zytokinnetzwerkes, insbesondere des Gleichgewichts zwischen TNF α /IL-12 und IL-10 erfolgt durch die Zellen der angeborenen Immunabwehr, wie beispielsweise durch Monozyten. Humane Monozyten können aufgrund der Stärke der Expression ihrer spezifischen Oberflächenmarker (CD14⁺ und CD16⁺) in zwei Untergruppen eingeteilt werden⁹¹. CD-14⁺-Monozyten sind insbesondere bei Infektionen durch Pathogene beteiligt⁹². Aufgrund der Bedeutung der CD-14⁺-Monozyten ist das ex vivo in vitro Modell der LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten für Untersuchungen zur Regulation der pro- und anti-inflammatorischen Zytokinbildung geeignet. Ebenfalls können Wirkungen von pharmakologischen Substanzen auf die Zytokinbildung untersucht werden.

Monozyten sezernieren nach Stimulation mit LPS in vitro zunächst verschiedene pro-inflammatorische Zytokine, wie TNF α , IL-1 β , IL-6 und IL-12 in den Kulturüberstand^{93,70,94,88}. Es folgt die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine (IL-10, löslicher TNF α -Rezeptor (sTNFR) oder IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1Ra)). In LPS-stimulierten Monozyten reduziert IL-10-Protein die Expression verschiedener Oberflächenproteine (z.B. CD86, CD54, CD40) und die Sekretion verschiedener Zytokine wie Interleukin-1 α /-1 β , TNF α , IL-6, IL-10 selbst, IL-12, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) und verschiedener Chemokine wie MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) und Interleukin-8^{95,80,96}.

IL-10 kann –unabhängig von der LPS-Stimulation– die Bildung anderer anti-inflammatorischer Zytokine (sTNFR, IL-1Ra, TNF-RI und TNF-RII) induzieren, welche pro-inflammatorische Zytokine antagonisieren können (TNF α , IL-1 β)^{88;97-101,96,80;95}. Die Kinetik der Zytokinbildung spielt bei der Regulation des Zytokinnetzwerkes eine entscheidende Rolle. Die Abb. 6 zeigt den LPS-Signalweg und daraus resultierende Wirkungen der Zytokine TNF α und IL-10 nach Bindung an ihre Rezeptoren in CD14⁺-Monozyten.

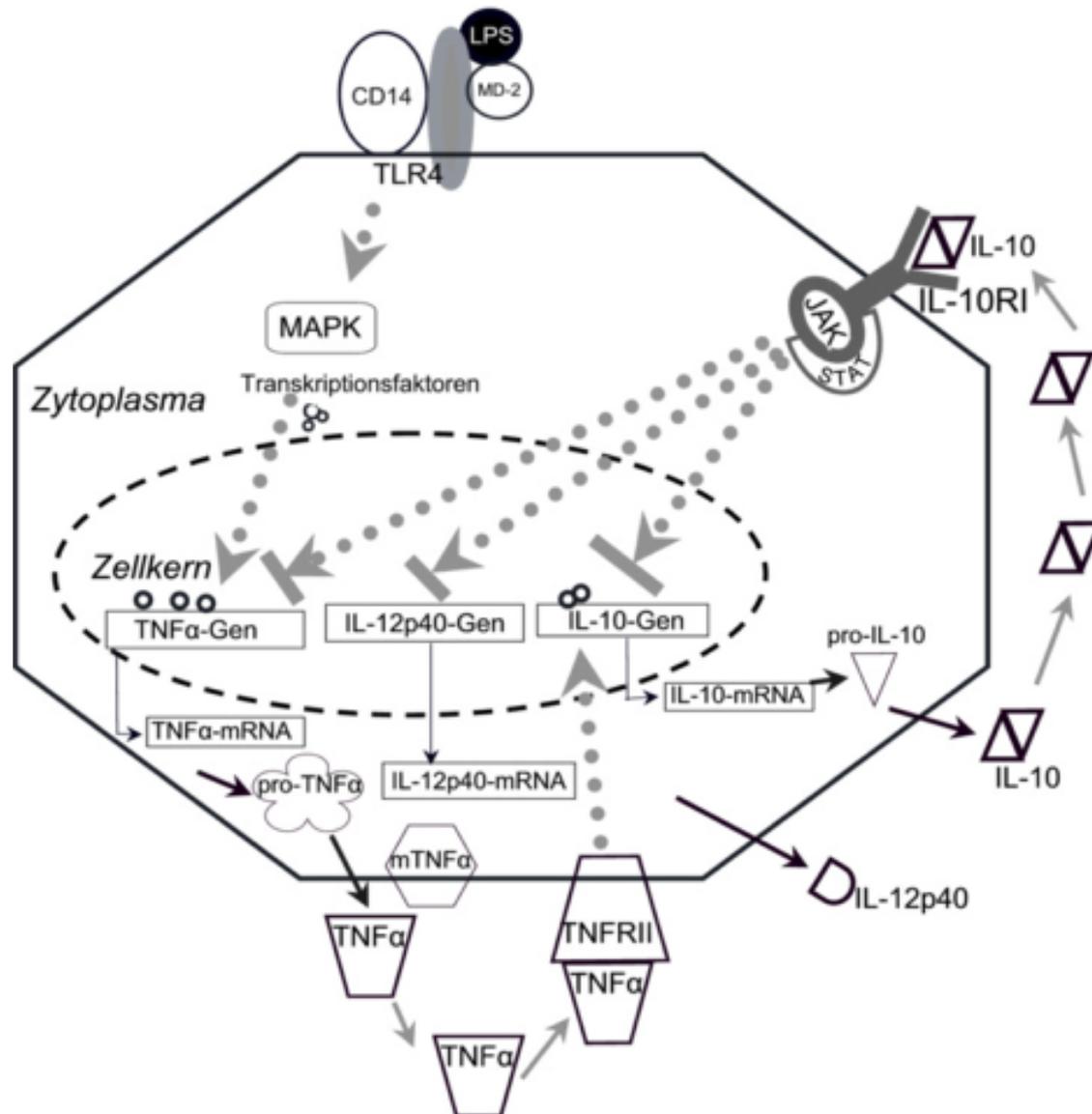


Abb. 6: LPS-Signalweg und daraus resultierende Wirkungen der Zytokine TNF α und IL-10 nach Bindung an ihre Rezeptoren in CD14⁺-Monozyten (vereinfachte Darstellung)

Nach Bindung der LPS und Aktivierung der MAPK-Signalwege (ERK1/2, JNK, p38) in CD-14⁺-Monozyten werden die Proteine TNF α , IL-12p40 und IL-10 in den Kulturüberstand sezerniert. Das TNF α bindet an den TNF-RII auf den CD-14⁺-Monozyten⁵⁹. Das TNF α -Protein kann dadurch u.a. die Bildung von Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) und IL-10 in Monozyten induzieren^{45;60;61}.

Das IL-10-Protein bindet an den IL-10RI auf den CD-14⁺-Monozyten und stoppt dadurch die Synthese von TNF α , IL-12p40 und IL-10^{87;96}.

Humane Monozyten werden entweder aus frisch isolierten Blut oder Blutkonserven, welche dann meist ü.N. bei 4°C zwischengelagert werden, über verschiedene Methoden isoliert^{26;102;103}. Hierdurch unterscheiden sich die Monozyten je nach Isolierungsmethode in ihrem Alter und ihrer Zusammensetzung. Das Alter der Monozyten ist entscheidend, da humane Monozyten den Prozess der spontanen Apoptose durchlaufen^{104;23;24;105}. Aus dem Blut humaner Spender kann nur eine begrenzte Zahl an CD-14⁺-Monozyten isoliert werden¹⁰⁶. Anstelle von Monozyten wurden daher oft humane Zelllinien, wie die monozytäre-Zelllinie THP-1 (transformed human promonocytic) oder die Makrophagen-Zelllinie HL-60 (human leukemic cell line) zur Untersuchung der Regulation von Zytokinen verwendet¹⁰⁶⁻¹⁰⁹.

1.5 Die Wirkungen von Thalidomid, Aminothalidomid und Suramin

Thalidomid wurde erstmals 1956 in Deutschland als Sedativum zugelassen, jedoch 1961 aufgrund schwerwiegender Beeinträchtigung der fetalen Entwicklung vom Markt zurückgenommen (Abb. 7)^{110,111}.

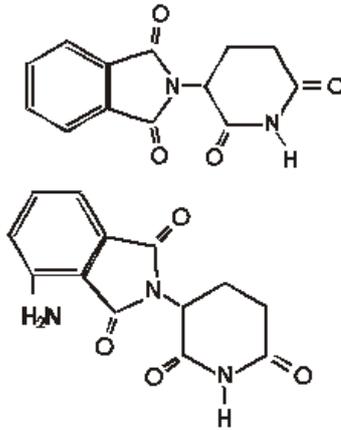


Abb. 7: Strukturformel von Thalidomid (M = 258,23g/mol, oben) und Aminothalidomid (M = 273,24g/mol, unten)¹¹²

Thalidomid wurde 1954 als alpha-N-Phthalimido-glutarimid synthetisiert. Aminothalidomid besitzt eine zusätzliche NH₂-Gruppe am Phthalimidring¹¹².

Die immunologischen Wirkungen von Thalidomid bei der Behandlung der Autoimmunerkrankung *erythema nodosum leprosum* (ENL) führten dazu, dass Thalidomid 1998 für diese Indikation in den USA zugelassen wurde. Bei verschiedenen Erkrankungen, wie Entzündungen des Verdauungstraktes, dermatologischen- und onkologischen Erkrankungen wurde Thalidomid „off-Label“ eingesetzt¹¹³. Thalidomid zeigte Wirkungen gegen Cachexia, gegen Tumorwachstum, gegen Angiogenese, gegen Zelleinwanderung, gegen Viren, hypoglykemische Effekte und bei der Hemmung verschiedener Enzyme wie beispielsweise der Phosphodiesterasen (PDE)^{114;115}. Bisher wurde die molekulare Basis für diese beobachteten Effekte jedoch noch nicht aufgeklärt.

1991 zeigte Thalidomid erstmals die selektive Inhibierung der TNF α -Freisetzung in LPS-aktivierten Monozyten¹¹⁶. Thalidomid reguliert die Produktion weiterer Zytokine, wobei sich die Wirkung von Thalidomid in Abhängigkeit von der Art des Stimulus und den untersuchten Zellen unterschied. So steigerte Thalidomid die TNF α -Produktion in HL-60-Zellen, während die TNF α -Produktion in den THP-1-Zellen verringert wurde¹¹⁴.

Lange bestand die Meinung, dass die beschriebenen Effekte von Thalidomid hauptsächlich durch die Erniedrigung der TNF α -Proteinmenge erreicht werden¹¹⁷.

Wie jedoch durch Studien von Thalidomid im Vergleich zu Substanzen anderer pharmakologischer Substanzklassen mit bekannter Wirkung gezeigt werden konnte, können die vielseitigen Effekte von Thalidomid nicht allein der Regulation der TNF α -Produktion zugeschrieben werden. Thalidomid scheint vielmehr die verschiedenen Wirkungen durch eine Beeinflussung unterschiedlicher Signalwege zu bewirken¹¹⁴. Hierbei könnte Thalidomid sowohl direkt als auch indirekt wirken, da die Substanz chemisch nicht sehr stabil ist und im Körper in verschiedene Metabolite zerfallen kann¹¹⁸.

Die Wirkung von Thalidomid auf die Bildung verschiedener Zytokine nach LPS-Stimulation wurde in Monozyten, PBMCs (PBMCs = blood peripheral mononuclear cells), Gesamtblut oder THP-1-Zellen untersucht und ist in Tab. 3 zusammengefasst.

Tab. 3: Vergleich der wichtigsten Wirkungen von Thalidomid auf die LPS-induzierte Sekretion von Zytokinen in den Kulturüberstand

Erklärung der Zeichen: ↓ = Verringerung, ↔ = keine Veränderung, ↑ = Anstieg

Zytokinproteinmenge	Wirkung von Thalidomid	Zellpopulation
TNFα	↓ bzw. ↑	in LPS-stimulierten PBMC/Monozyten bzw. THP-1 ^{116;114;119}
IL-1β	↓ bzw. ↔	in LPS-stimulierten PBMC ^{120,117}
IL-1β	↓ bzw. ↔	in LPS-stimulierten Monozyten ^{116,121}
IL-1β	↔ bzw. ↓	in LPS-stimulierten Gesamtblut ¹²²
IL-6	↓	in LPS-stimulierten PBMCs ¹²³
IL-6	↔ bzw. ↓	in LPS-stimulierten Monozyten ¹¹⁷
IL-10	↔ bzw. ↑	in LPS-stimulierten PBMC/Monozyten bzw. Gesamtblut ^{119;122;124}
IL-12	↓	in LPS-stimulierten PBMCs ¹²⁴
IL-12	↓	in LPS-stimulierten Monozyten ¹¹⁷
MCP-1	↔ bzw. ↑	in LPS-stimulierten Monozyten und Gesamtblut ^{117,122}

Für die Wirkung von Thalidomid auf die Zytokinbildung wurden verschiedene Mechanismen beschrieben. So wurde ein erhöhter Abbau der TNFα-mRNA aufgrund einer verringerten Stabilität der TNFα-mRNA für Thalidomid beschrieben, wobei dieser Effekt bisher nicht bestätigt wurde^{125,122}. Weiterhin wurde berichtet, dass Thalidomid die Bindung von NF-κB in Kernektrakten von HIV-infizierten Makrophagen verringerte und die Aktivierung von NF-κB in Kernektrakten von Endothelzellen dezimierte^{126;127}. Es wurde ebenfalls beschrieben, dass Thalidomid die Aktivierung von NF-κB in Jurkat-Zellen nach TNFα-Stimulation durch Unterdrückung der Aktivität der IκB-Kinase verringerte^{128,129}.

Um die pharmakologischen Eigenschaften von Thalidomid zu verbessern, wurden verschiedene Thalidomidabkömmlinge synthetisiert. Die Thalidomidabkömmlinge mit selektiven TNFα-inhibierenden Eigenschaften werden in die Gruppe der PhosphodiesteraseIV-Inhibitoren (SelCIDs™ = selective cytokine inhibitory drugs) oder in die Gruppe der Immunmodulierenden Substanzen (ImiDS™ = immunomodulatory drugs) eingeteilt^{130;131}.

Aminothalidomid besitzt eine zusätzliche NH₂-Gruppe am Phthalimidring, gehört zu der Gruppe der ImiDS™ und hemmt die Bildung des TNFα-Protein und IL-12p40-Proteins in LPS-stimulierten PBMCs/Monozyten potenter als Thalidomid¹¹². Ebenfalls soll Aminothalidomid die IL-10-Proteinmenge in LPS-stimulierten PBMCs steigern¹¹⁷. Die Strukturformel von Aminothalidomid ist gemeinsam mit der Strukturformel von Thalidomid in Abb. 7 gezeigt.

Der Einsatz von **Suramin** begann 1921 mit der Behandlung von parasitären Krankheiten, die durch Trypanosomen verursacht werden¹³². Für Suramin wurden anti-proliferative, angiostatische und anti-neoplastische Eigenschaften festgestellt. Suramin war bei der Behandlung von Nebennierenrindencarcinomen wirksam und war erfolgreich in der Klinischen Prüfung bei der Behandlung von Prostata-Krebs^{133;134}. Aufgrund verschiedener toxischer Nebenwirkungen wurde für Suramin jedoch keine Zulassung für die Behandlung von Prostata-Krebs erteilt¹³⁴.

In Abb. 8 ist die Strukturformel für Suramin gezeigt.

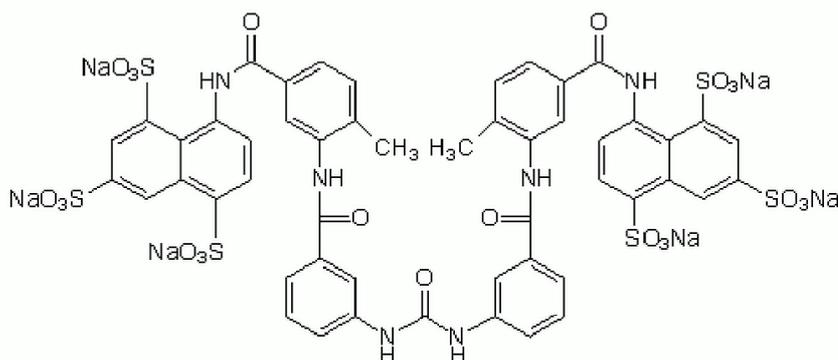


Abb. 8: Strukturformel Suramin
(M =1429,2 g/mol)¹³⁵

Suramin kann in Lösung in mehr als zwei verschiedenen Konformationen auftreten, wodurch die Interaktion mit verschiedenen Proteinen, wie beispielsweise Serumproteinen, möglich ist¹³⁶. Diesen Interaktionen werden die unerwünschten Nebenwirkungen von Suramin zugeschrieben¹³⁷. Das Suraminmolekül verhindert die Bindung von Zytokinen an ihre Rezeptoren, indem Suramin aufgrund seiner Konformation sterisch die Rezeptorbindungsregion blockiert, so wie es für die Bindung von PDGF an seinen Rezeptor gezeigt wurde¹³⁶. Diese und weitere Wirkungen von Suramin sind in Tab. 4 zusammengefasst.

Tab. 4: Wirkungen von Suramin

Extrazelluläre Wirkungen	<ul style="list-style-type: none"> • Interaktion mit Proteinen, wie beispielsweise Serumproteinen¹³⁶ • verhindert das Binden vieler Wachstumsfaktoren (PDGF (PDGF = platelet-derived growth factor) and bFGF (bFGF = basic fibroblast growth factor) oder Zytokine an ihre Rezeptoren (TGF-β (TGF-β = transforming growth factor-beta) and IL-2)¹³⁸⁻¹⁴² • Suramin wirkt antagonistisch, indem es um die Bindungsstellen von Agonisten, wie z.B. Heparin konkurriert¹³⁶ • inhibiert Rezeptor/G-Protein Verbindungen (un-coupling)¹⁴³⁻¹⁴⁵
Zytoplasmatische Wirkungen	<ul style="list-style-type: none"> • unterdrückt die Guanin-Nukleotidabhängige Aktivierung der Adenylat-Zyklase¹⁴⁶ • inhibiert Protein-Tyrosin-Phosphatasen¹⁴⁷ • inhibiert verschiedene Kinasen¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ • inhibiert Reverse Transkriptase¹⁵¹ • unterschiedliche Effekte von Suramin auf Protein Kinase C^{149;150}
Andere Wirkungen	<ul style="list-style-type: none"> • Beeinflussung von Zellbewegung und Metastatisierung¹⁵² • anti-angiogenetische Eigenschaften¹⁵³ • induziert Zelldifferenzierung¹⁵⁴, Antitumor-Aktivität¹⁵⁵

1.6 Aufgabenstellung

Bei vielen Autoimmun- und chronischen Entzündungserkrankungen wurde eine Fehlregulation der entzündungsfördernden Zytokine TNF α , IL-12 und des entzündungshemmenden Zytokin IL-10 beobachtet. Ein gezielter Eingriff in das Verhältnis von entzündungsfördernden und entzündungshemmenden Zytokinen durch pharmakologische Substanzen könnte ein Ansatz für die Therapie solcher Erkrankungen sein. Der vorrangige Schwerpunkt dieser Dissertation liegt in der Untersuchung der Wirkung der beiden pharmakologischen Substanzen **Aminothalidomid** und **Suramin** auf die Zytokinbildung von TNF α , IL-12 und IL-10 in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten als Modell für eine Infektion durch gramm-negative Bakterien.

In Vorversuchen wurde eine verringerte IL-10-Proteinmenge in Gegenwart von Suramin festgestellt.

Im Hinblick auf die beschriebenen Literaturbefunde für Thalidomid und Aminothalidomid sowie die beobachtete Wirkung von Suramin, sollte die Wirkung beider Substanzen auf die Bildung der Zytokine TNF α , IL-12 und IL-10 in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten in dieser Arbeit untersucht werden:

1. Zunächst sollte die Wirkung von Aminothalidomid im Vergleich zu Thalidomid auf die Bildung von Zytokinen durch Monozyten untersucht werden.
2. Anschließend sollte die Regulation der entzündungsfördernden Zytokine TNF α , IL-12 und des entzündungshemmenden Zytokins IL-10 durch Aminothalidomid charakterisiert werden. Hierbei interessierte im Detail die Beeinflussung der Protein- und mRNA-Bildung der o.g. Zytokine.
3. Die Wirkung von Suramin in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten auf die Bildung der Zytokine TNF α , IL-12 und IL-10 sollte charakterisiert werden (Protein- und mRNA-Bildung).

2 ERGEBNISSE

2.1 Das Modell der LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten

Im folgenden Kapitel werden die Notwendigkeit des verwendeten Modells der LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten, die Isolierung der CD-14⁺-Monozyten, die Methoden zur Messung der induzierten Bildung von Zytokinen (Protein, mRNA) und zur Zellviabilität (Apoptose, Nekrose) beschrieben, um die isolierte Monozytenpopulation zu charakterisieren.

2.1.1 Notwendigkeit des Modells der LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten

Die verwendete monozytäre-Zelllinie THP-1 unterschied sich von frisch isolierten CD-14⁺-Monozyten im Muster der Zytokinbildung (Abb. 9). Im Kulturüberstand von LPS-stimulierten THP-1-Zellen wurden im Vergleich zu LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten gleiche Mengen an IL-12p40-Protein nachgewiesen (Kap. 5.5.1). Von LPS-stimulierten THP-1-Zellen wurden nur 10 % der IL-10-Proteinmenge von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten detektiert. Daher eigneten sich LPS-stimulierte THP-1-Zellen zur Untersuchung der Beeinflussung der Zytokinbildung durch Aminothalidomid und Suramin nicht und die Versuche wurden mit frisch isolierten CD-14⁺-Monozyten durchgeführt.

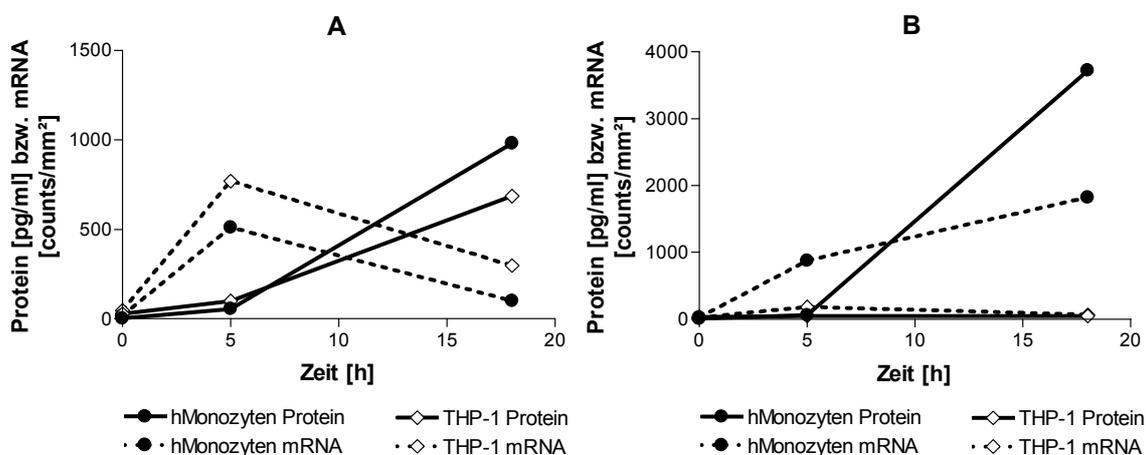


Abb. 9: mRNA- und Proteinbildung von IL-12p40 (A) und IL-10 (B) nach LPS-Stimulation in humanen Monozyten (CD-14⁺-Monozyten) und THP-1-Zellen

Nach LPS-Stimulation sezernieren frisch isolierte CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 2) und THP-1-Zellen bei gleicher Anzahl an eingesetzten Zellen IL-12p40-, aber kein IL-10-Protein in den Kulturüberstand. Die Bildung der mRNA für IL-12p40 ist in beiden untersuchten Zellarten nachweisbar. Die gebildete IL-10-mRNA lässt sich nur in frisch isolierten CD-14⁺-Monozyten und nicht in THP-1-Zellen nachweisen.

2.1.2 Isolierung und Stimulierung der CD-14⁺-Monozyten

Aus dem venösen Blut gesunder Spender wurden PBMCs über eine Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert, wobei tote Zellen entfernt wurden (Kap. 5.4.3). Die Viabilität der PBMCs wurde mit der Methode der Trypanblau-Exklusionsmethode (Kap. 5.4.1) überprüft und nur PBMCs mit einer Viabilität > 97 % wurden weiter aufgereinigt.

Im Durchschnitt wurden aus 250 ml Blut $4,8 \cdot 10^8$ PBMCs isoliert, aus welchen mittels Magnetischer Zellseparation (MACS) die CD-14⁺-Monozyten aufgrund der Expression des spezifischen Oberflächenproteins CD14 isoliert wurden (Kap. 5.4.3)^{26;103}. Im Durchschnitt wurden $5,8 \cdot 10^7$ CD-14⁺-Monozyten isoliert. Bezogen auf die Anzahl der isolierten PBMCs betrug die durchschnittliche Ausbeute 13,2 %.

Die frisch isolierten Zellen wurden in Kulturplatten kultiviert und in den Experimenten mit LPS, Anisomycin, rekombinant hergestelltem humanen (rh) IL-10- oder rhTNF α -Protein aktiviert (Kap. 5.4.4). In dieser Arbeit wurde die Bildung der LPS-induzierten Zytokine über die Messung des Zytokinpiegels (Kap. 5.5) und die Messung der Menge an Transkript (mRNA, Kap. 5.6) bestimmt.

2.1.3 Messung der Zytokinbildung

Die Messung des Zytokinpiegels im Kulturüberstand erfolgte durch den qualitativen und quantitativen Nachweis des Zytokins als Antigen über den Einsatz von spezifischen Antikörpern. Hierfür wurde die Methode des Proteinarrays auf Membrantechnologie und die Methode des ELISA/ELISpot verwendet^{32,33,34}. Mit dem Proteinarray und dem ELISA wird die Summe der Zytokinmenge detektiert, welche von allen Zellen in den Kulturüberstand sezerniert wird. Mit der Methode des ELISpot kann die sezernierte Zytokinmenge einzelner Zellen bestimmt werden.

2.1.3.1 Untersuchungen im Proteinarray

Im Proteinarray sind unterschiedliche Antikörper, welche gegen verschiedene Zytokine gerichtet sind, in abgegrenzten Feldern auf einer geeigneten Membran fixiert, wodurch verschiedene Zytokine gleichzeitig quantifiziert werden können³². Die relative Menge der einzelnen Zytokine wurde im Vergleich zu den Positivkontrollen auf den einzelnen Membranen bestimmt (Kap. 5.5.3). Die Tab. 5 demonstriert, wie sich der Coefficient of Variation (CV) zwischen den einzelnen Membranen um bis zu 29 % unterscheiden kann, während der durchschnittliche CV für einen Spender, mit 19 % bzw. 12 % im gleichen Größenbereich lag.

Tab. 5: „Coefficient of Variation“ im Proteinarray

Die Tabelle zeigt den individuellen Coefficient of Variation und den durchschnittlichen Coefficient of Variation für 4 Membranen von je einem Spender, von welchen der Kulturüberstand von CD-14⁺-Monozyten untersucht wurde.

	einzelne Membranen				Durchschnitt
	1	2	3	4	
Spender 1	29 %	28 %	12 %	6 %	19 %
Spender 2	16 %	22 %	2 %	8 %	12 %

Die Abb. 10 zeigt die Membranen des Proteinarrays vom Kulturüberstand von unstimulierten und LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten. Im Kulturüberstand von unstimulierten CD-14⁺-Monozyten wurde IL-8-Protein detektiert.

Im Kulturüberstand von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten wurden die Proteine MCP-1, TNF α , IL-6, IL-8, IL-10 und IL-1 β verstärkt gegenüber der unstimulierten Kontrolle nachgewiesen. Nach LPS-Stimulation wurden die Zytokine GRO (Wachstumsonkogen) und IL-12p70 mit geringer Stärke im Proteinarray detektiert. Andere Zytokine wurden im Kulturüberstand der CD-14⁺-Monozyten nach LPS-Stimulation nicht detektiert.

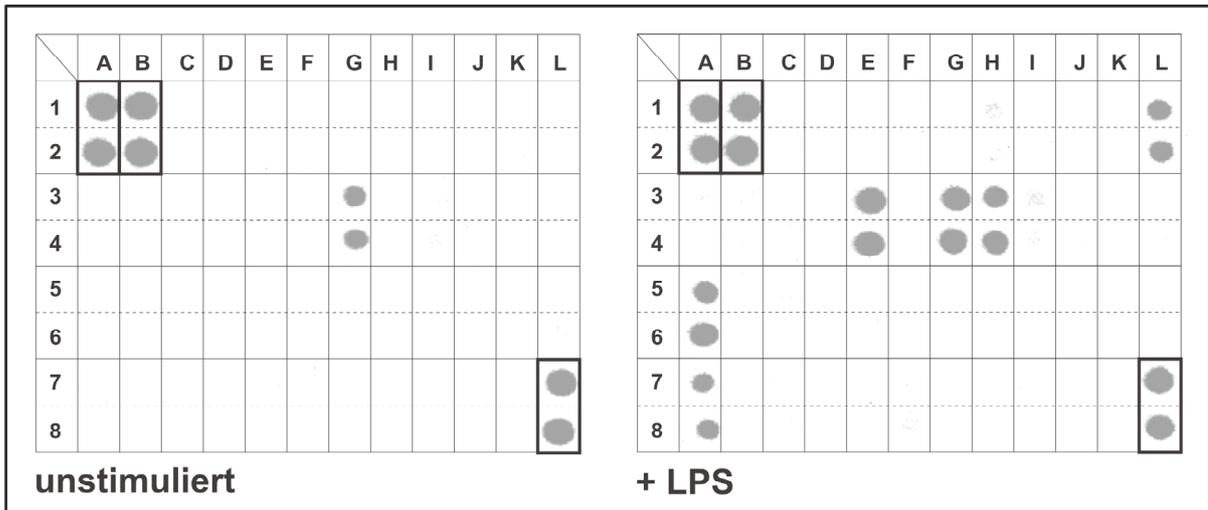


Abb. 10: Membranen des Proteinarrays

Dargestellt ist die Membran des Proteinarrays, auf welcher der Kulturüberstand (Ansatz 2) von unstimulierten CD14⁺-Monozyten (links) und von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten (rechts) analysiert wurde. Die Stärke der Spotintensität wurde relativ zu den 6 Positivkontrollen jeder Membran (eingerahmte Kästchen) bestimmt und entsprach der sezernierten Zytokinmenge. Folgende Proteine wurden mittels Proteinarray (von links nach rechts) nachgewiesen: GRO (H1/2), IL-1 β (L1/2), IL-6 (E3/4), IL-8 (G3/4), IL-10 (H3/4), IL-12p70 (I3/4), MCP-1 (A5/6) und TNF α (A7/8).

2.1.3.2 Untersuchungen im ELISA

Mit dem ELISA ist eine Quantifizierung der gebildeten Zytokine über ein Standardprotein möglich (Kap. 5.5.1). Durch die Inkubation der pharmakologischen Substanzen mit dem Standardprotein des ELISA's wurde der Einfluss der Substanzen auf die Erkennung der Zytokine im ELISA überprüft (Kap. 5.5.1).

2.1.3.2.1 TNF α - und IL-12p40-ELISA

Wie die Abb. 11 zeigt, störten Aminothalidomid und Suramin die Erkennung von **TNF α - und IL-12p40-Protein** im ELISA nicht.

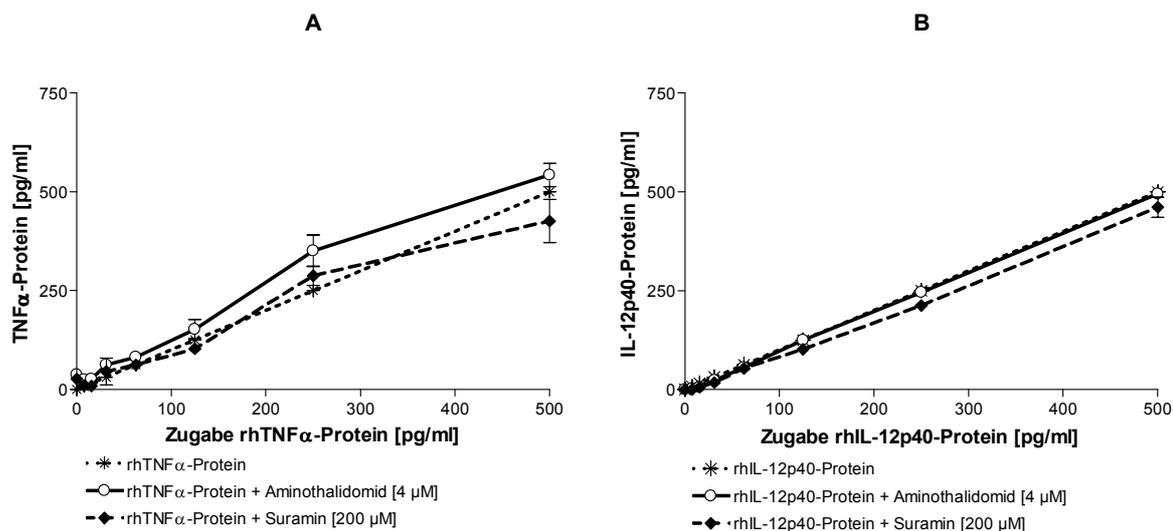


Abb. 11: Der Einfluss von Aminothalidomid und Suramin auf die Erkennung von TNF α - (A) und IL-12p40-Protein (B)

Dargestellt ist die Erkennung von rhTNF α - (A) und rhIL-12p40-Protein (B) im ELISA in Gegenwart von Aminothalidomid [4 μ M] und Suramin [200 μ M].

2.1.3.2.2 IL-10-ELISA

Wie in Abb. 12A zu sehen, störte Aminothalidomid die Erkennung von IL-10-Protein im Biosource-ELISA nicht, während in Gegenwart von Suramin nur noch 24 % des IL-10-Proteins nachweisbar war. Um zu auszuschliessen, dass die Erkennung von IL-10-Protein im Biosource-ELISA durch Suramin gestört wurde, wurde die IL-10-Proteinmenge mit einem zweiten ELISA (R&D-ELISA) gemessen (Kap. 5.5.1). Wie Abb. 12B demonstriert, wurde die Erkennung des IL-10-Proteins im R&D-ELISA weder durch Suramin noch durch Aminothalidomid beeinflusst.

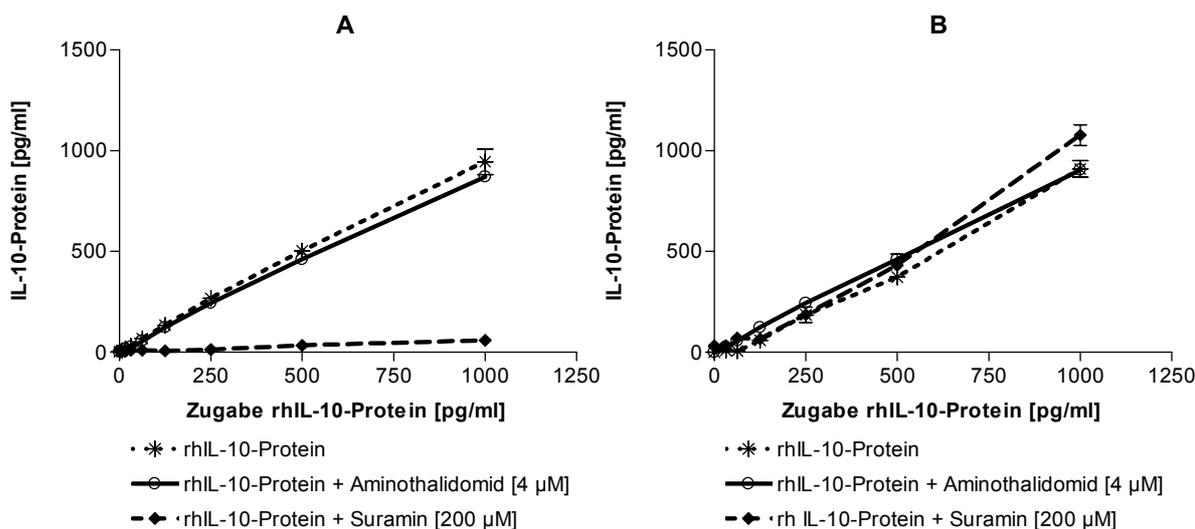


Abb. 12: Der Einfluss von Aminothalidomid und Suramin auf die Erkennung von IL-10-Protein

Dargestellt ist die Erkennung von rhIL-10-Protein im Biosource-ELISA (A) und im R&D-ELISA (B) in Gegenwart von Aminothalidomid [4 μ M] und Suramin [200 μ M].

Innerhalb der α -Helices der IL-10-Monomere wurden zwei Disulfidbrücken nachgewiesen, welche für die Erhaltung der biologischen Aktivität des IL-10-Homodimers notwendig sind⁸⁵. Durch chemische oder thermische Denaturierung, wie beispielsweise über eine Temperaturerhöhung oder DTT-Zugabe (DTT=Dithiothreitol) kann die Struktur von Proteinen zerstört werden^{156;157}. Um festzustellen, welchen Einfluss die Denaturierung des IL-10-Proteins auf die Erkennung in beiden IL-10-ELISA'S hat, wurde rhIL-10-Protein chemisch und thermisch inaktiviert. Die Abb. 13 zeigt, dass chemisch denaturiertes IL-10-Protein nicht im Biosource-ELISA (Abb. 13A), jedoch mit einer ca. zweifach höheren Menge im R&D-ELISA gemessen wurde (Abb. 13B). Das gleiche Resultat wurde beobachtet, wenn das rhIL-10-Protein thermisch denaturiert wurde (Abb. 13C+D).

Mit diesem Versuch wurde gezeigt, dass mit dem Biosource-ELISA kein chemisch oder thermisch denaturiertes IL-10-Protein detektiert wurde, während im R&D-ELISA das IL-10-Protein sowohl in denaturierter als auch nicht denaturierter Form gemessen wurde.

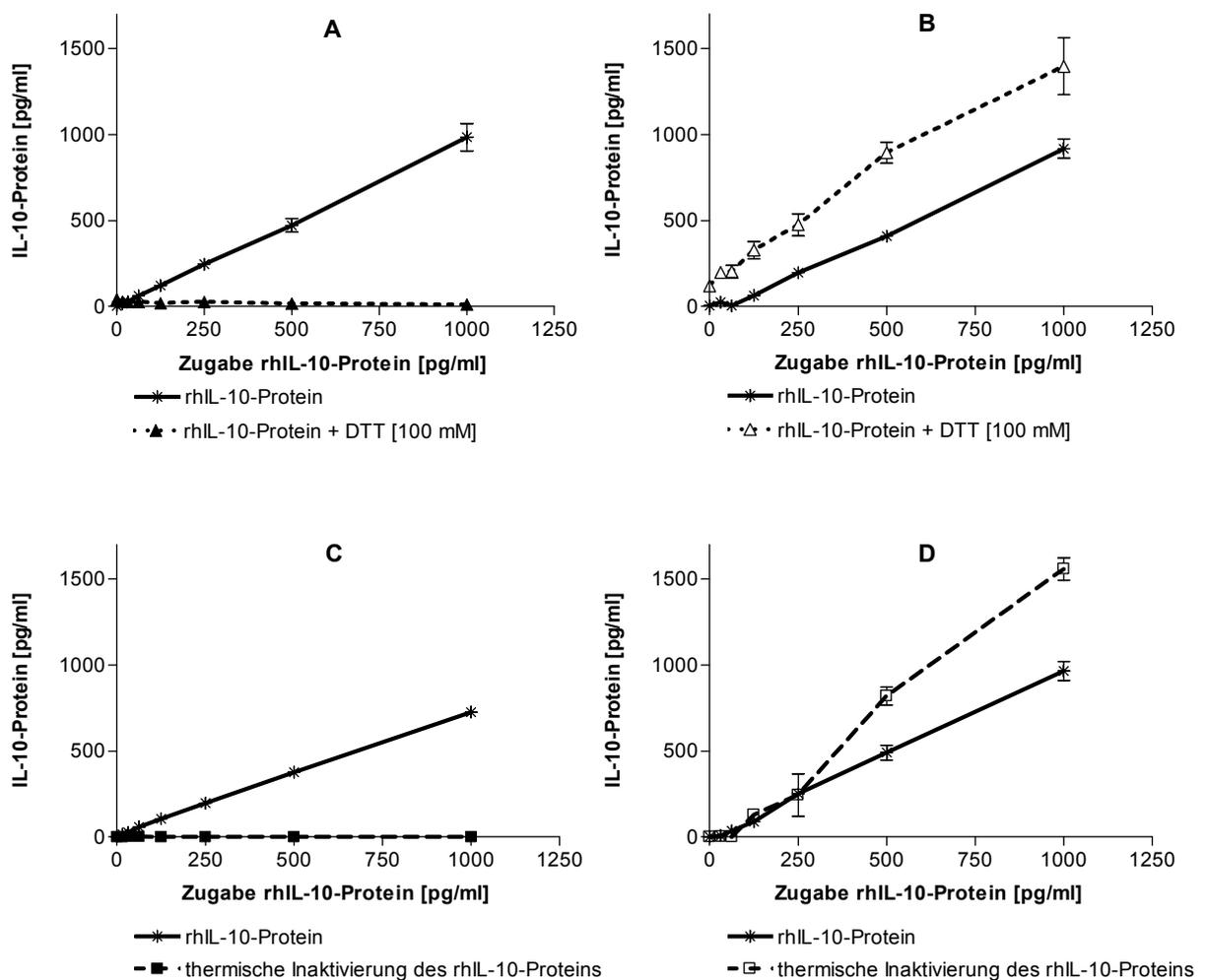


Abb. 13: Messung von rhIL-10-Protein nach chemischer (A+B) oder thermischer Denaturierung (C+D)

Gezeigt ist die Menge an rhIL-10-Protein (biologisch aktiv), welches nach chemischer Denaturierung (durch Zugabe von 100 mM DTT) im Biosource-ELISA (A) bzw. R&D ELISA (B) und, welches nach thermischer Denaturierung im Biosource-ELISA (C) bzw. R&D ELISA (D) gemessen wurde. Abkürzungen: DTT = Dithiothreitol

Um zu untersuchen, ob Suramin durch eine Reduktion der Disulfidbrücken die Erkennung von IL-10-Protein im Biosource-ELISA verhindert, wurden Suramin und DTT in Kombination zu rhIL-10-Protein gegeben und die IL-10-Proteinmenge wurde mit dem ELISA der Fa. Biosource gemessen (Kap. 5.5.1). Wie Abb. 14 darstellt, verringerte Suramin auch in Gegenwart von DTT die Erkennung von IL-10-Protein konzentrationsabhängig. Somit wurde eine additive Wirkung von Suramin und DTT bei der Verringerung des nachzuweisenden IL-10-Proteins gezeigt.

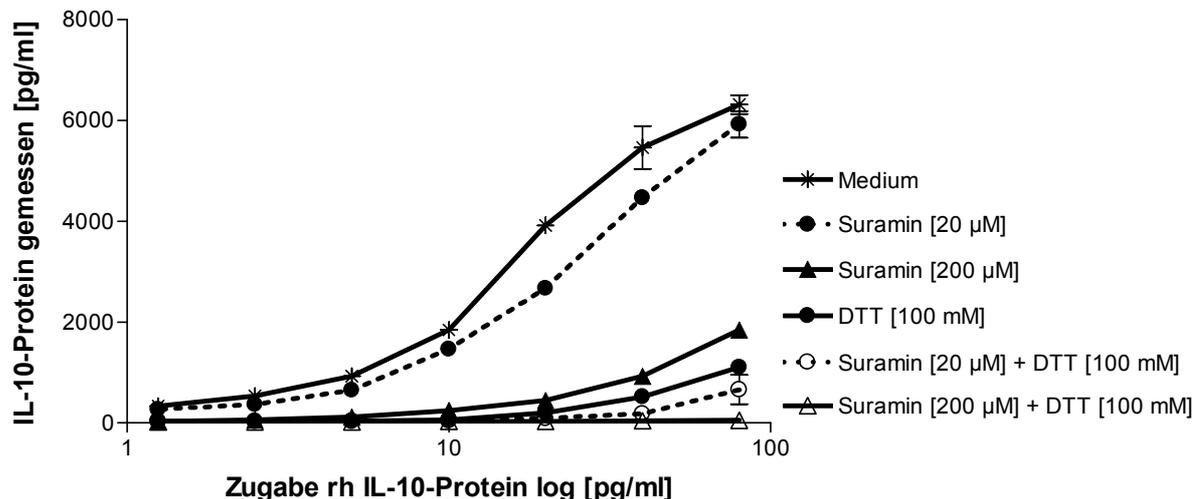


Abb. 14: Wirkung von Suramin [20 µM und 200 µM] auf rhIL-10 [40 pg/ml-1,25 pg/ml]

Dargestellt ist die Menge an rhIL-10-Protein (biologisch aktiv), wenn dieses mit Suramin für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ in An- und Abwesenheit von DTT inkubiert und dann im Biosource-ELISA gemessen wurde. Abkürzungen: DTT=Dithiothreitol

2.1.3.2.3 Messung von TNFα-, IL-12p40-, und IL-10-Protein

Um die LPS-Konzentration für eine optimale Zytokinbildung zu bestimmen, wurden die CD-14⁺-Monozyten mit unterschiedlichen Konzentrationen an LPS stimuliert und die Zytokinsekretion der oben genannten Zytokine nach 24 h LPS-Stimulation bestimmt (Kap. 5.4.4 und Kap. 5.5.1). Zur Messung des biologisch aktiven IL-10-Proteins wurde der Biosource-ELISA verwendet. Die Tab. 6 fasst die Bildung der Zytokine TNFα, IL-12p40 und IL-10 in unstimulierten CD-14⁺-Monozyten und nach Stimulation mit LPS zusammen.

Im Kulturüberstand von unstimulierten CD-14⁺-Monozyten wurden nur geringe Mengen an TNFα, IL-12p40 und IL-10 gemessen, sodass eine Stimulation durch unspezifische Stimuli ausgeschlossen werden konnte.

Mit 10 µg/ml LPS wurde die größte Menge an TNFα, IL-12p40 und IL-10 in den Kulturüberstand sezerniert. Daher wurden die nachfolgenden Versuche mit einer LPS-Konzentration von 10 µg/ml LPS durchgeführt.

Tab. 6: TNF α -, IL-12p40- und IL-10-Protein im Kulturüberstand von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten

Dargestellt sind die Werte für das TNF α -, IL-12p40- und IL-10-Protein im Kulturüberstand von CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 2) nach 24 h LPS-Stimulation [0,001 μ g/ml–10 μ g/ml].

LPS [μ g/ml]	TNF α [pg/ml]	IL-12p40 [pg/ml]	IL-10 [pg/ml]
20	> 25000	1555 \pm 237	1035 \pm 97
10	8857 \pm 989	2133 \pm 200	1146 \pm 22
1	6753 \pm 643	1275 \pm 47	866 \pm 85
0,1	5428 \pm 691	849 \pm 82	640 \pm 83
0,01	5789 \pm 399	919 \pm 139	527 \pm 47
0,001	4638 \pm 430	788 \pm 96	456 \pm 80
unstimuliert	716 \pm 263	24 \pm 1	2 \pm 0

Da Zytokine sich gegenseitig beeinflussen^{60;158}, wurde die zeitliche Freisetzung der Zytokine TNF α , IL-12p40 und IL-10 in den Kulturüberstand untersucht. Die Abb. 15 zeigt, dass die Zytokine in der Reihenfolge TNF α , IL-12p40 und IL-10 sezerniert wurden. Die maximale Menge an TNF α -Protein wurde innerhalb der ersten 9 h nach LPS-Stimulation im Kulturüberstand nachgewiesen. Im Zeitraum von 9 h bis 24 h LPS-Stimulation wurden 82 %-87 % der Zytokinmenge gegenüber 9 h an TNF α im Kulturüberstand detektiert. Der größte Anteil an IL-12p40- und IL-10-Protein wurde innerhalb der ersten 24 h gebildet. Nach 24 h LPS-Stimulation erfolgte eine kontinuierliche Abnahme der TNF α -Proteinmenge im Kulturüberstand. Nach 24 h erfolgte eine kontinuierliche Abnahme aller drei Zytokinmengen im Kulturüberstand.

Nach 24 h LPS-Stimulation war die größte Menge aller drei Zytokine im Kulturüberstand nachweisbar. Daher wurde der konzentrationsabhängige Einfluss der Substanzen auf die Bildung aller drei Zytokine nach 24 h LPS-Stimulation untersucht (Kap. 2.2.2.1.1 und Kap. 2.3.2.1.1).

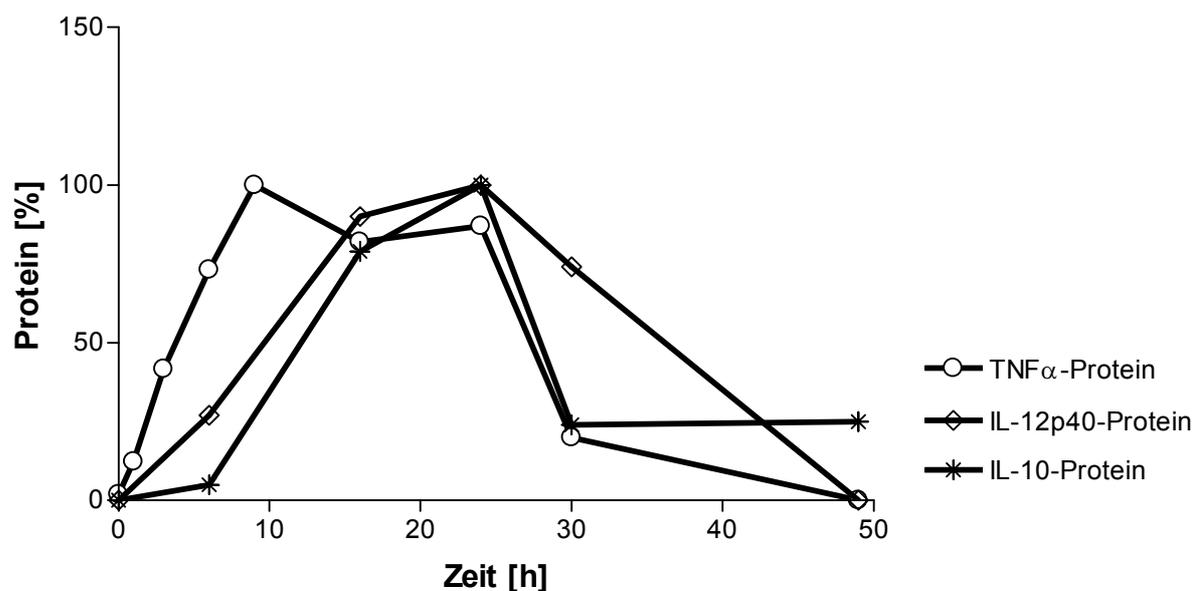


Abb. 15: Kinetik der LPS-induzierten Sekretion von TNF α -, IL-12p40- und IL-10-Protein

Dargestellt ist die zeitliche Freisetzung der Proteine TNF α , IL-12p40 und IL-10 in den Kulturüberstand von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 2) über den Zeitraum von 49 h.

2.1.3.3 Untersuchungen mittels RT-PCR

Die Zytokinbildung der CD-14⁺-Monozyten wurde über die gebildete mRNA der Zytokine TNF α , IL-12p40 und IL-10 mit der Technik der RT-PCR bestimmt (Kap. 2.1.3.3). Aus $4 \cdot 10^6$ CD-14⁺-Monozyten wurden im Durchschnitt 1,5 μ g total RNA isoliert. Es erfolgte die Reverse Transkription und die Synthese eines komplementären DNA-Stranges aus der mRNA-Matrize mit der Methode der Real-Time PCR (Kap. 2.1.3.3).

Zunächst wurde die cDNA- und somit die mRNA-Menge am Haushaltsgen GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) in unstimulierten- bzw. LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten bestimmt, um diese zur Normierung der Proben zu verwenden^{159;160}. Die Abb. 16 zeigt die Amplifikation der cDNA (PCR-Reaktion GAPDH) nach 1,5 h und 7,5 h Kultivierung sowie die Schmelzkurve der synthetisierten Produkte. In Abb. 17 ist das amplifizierte Produkt nach 1,5 h Kultivierung der unstimulierten CD-14⁺-Monozyten, welches in der Gel-Elektrophorese aufgetrennt wurde, dargestellt. Da nur ein Peak in der Schmelzkurve/Gel-Elektrophorese ersichtlich wurde und kein Produkt in der RT-Kontrolle der Schmelzkurve (Kontrolle der Reversen Transkriptase ohne Enzym RT) sichtbar war, erfolgte die Amplifikation der cDNA der GAPDH spezifisch, d.h. ohne die Bildung unspezifischer Produkte. Die GAPDH in den unstimulierten und LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten nach 1,5 h Kultivierung sowie nach 7,5 h Kultivierung wurde nach dem gleichen Muster amplifiziert. Die Stimulation mit LPS beeinflusste die Amplifikation der GAPDH nicht. Nach 7,5 h Kultivierung (\pm LPS) wurde deutlich weniger GAPDH als nach 1,5 h Kultivierung (\pm LPS) nachgewiesen.

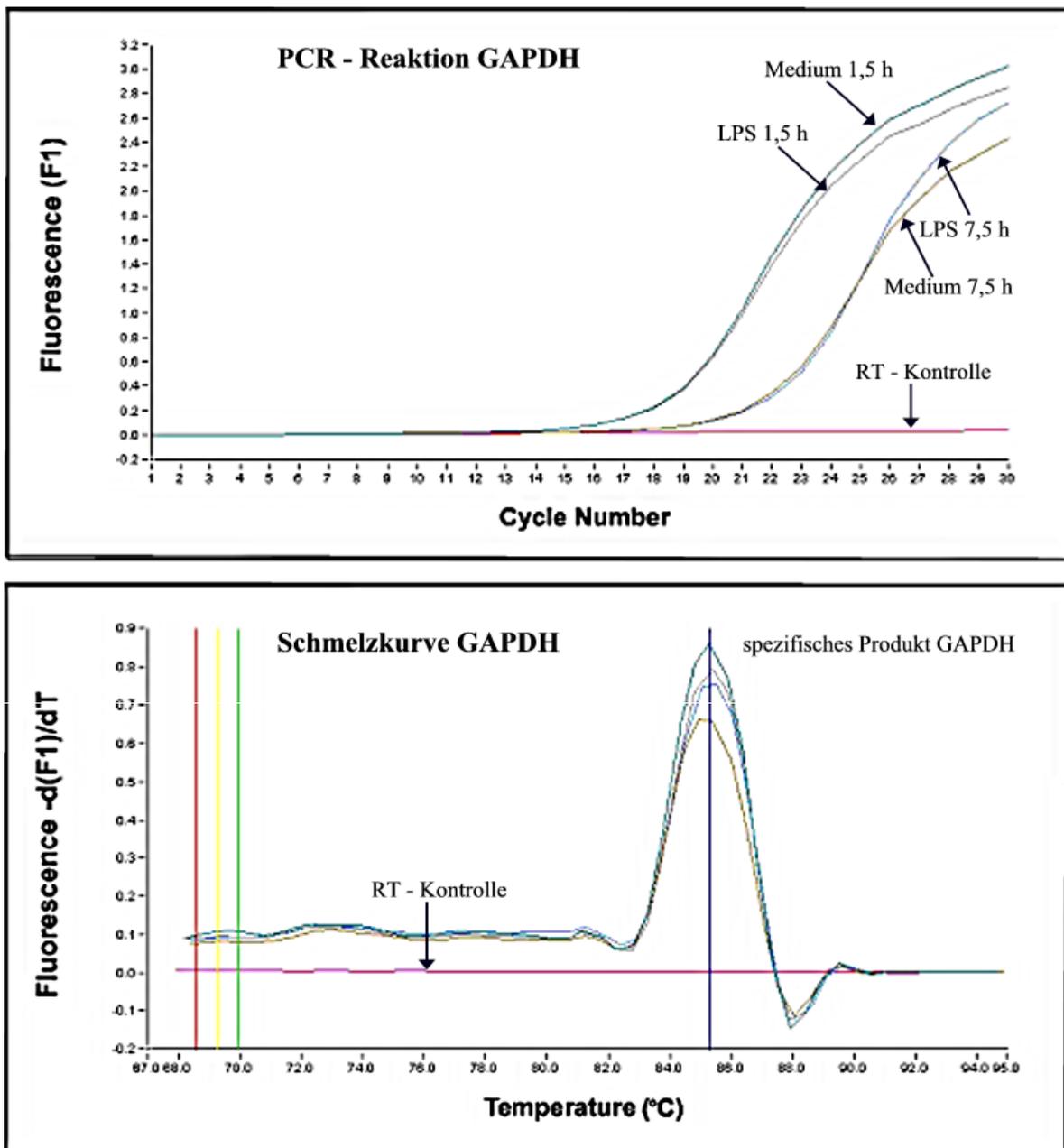


Abb. 16: Amplifikation der mRNA (PCR-Reaktion GAPDH) und die Schmelzkurve der GAPDH

Gezeigt ist der Verlauf der Amplifikation der cDNA der GAPDH (oben) in CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 2, unstimuliert und LPS-stimuliert) nach 1,5 h und 7,5 h Kultivierung. Es wurde die cDNA der CD-14⁺-Monozyten verschiedener Spender gepoolt und als 4-Punkt Standard¹⁶¹ zur Qualifizierung verwendet. Die Schmelzkurve für das amplifizierte Produkt der GAPDH (unten) zeigt ein Produkt mit einer Schmelztemperatur von 84,6°C.

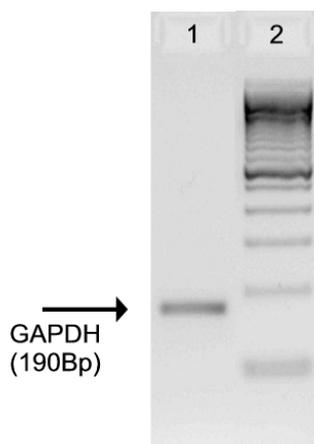


Abb. 17: Auftrennung der GAPDH-mRNA in der Agarose-Gelelektrophorese

Dargestellt ist die Auftrennung des amplifizierten Produkts (cDNA der GAPDH) von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten nach 1,5 h (Spur 1). Der in Spur 2 verwendete DNA-Marker zeigt (100 Bp), dass die errechnete Länge des amplifizierten Fragments der cDNA der GAPDH mit einer Fragmentlänge von 190 BP in der Gel-Elektrophorese bestätigt wurde.

Zur Normierung der Proben ist es erforderlich, dass die Expressionsmenge auf die mRNA-Menge eines unregulierten Gens (Haushaltsgens) bezogen wird^{33;35;162}. Um auszuschließen, dass die GAPDH-mRNA-Bildung und damit das Haushaltsgen reguliert wird, wurde zusätzlich zur GAPDH die Expression weiterer Haushaltsgene, wie β -Aktin, β_2 -Mikroglobulin und HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) untersucht.

Die Abb. 18 zeigt die mRNA-Menge verschiedener Haushaltsgene in CD14⁺-Monozyten in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. Innerhalb der ersten 5 h nach LPS-Stimulation verringerte sich die mRNA-Menge um ca. 75 % im Vergleich zu 1 h nach LPS-Stimulation. Die Verringerung der mRNA-Menge erfolgte in allen vier untersuchten Haushaltsgenen mit der gleichen Stärke (visuelle Abschätzung). Mögliche Gründe für die Verringerung der mRNA-Menge werden in Kap. 3.1.2 ausführlich diskutiert.

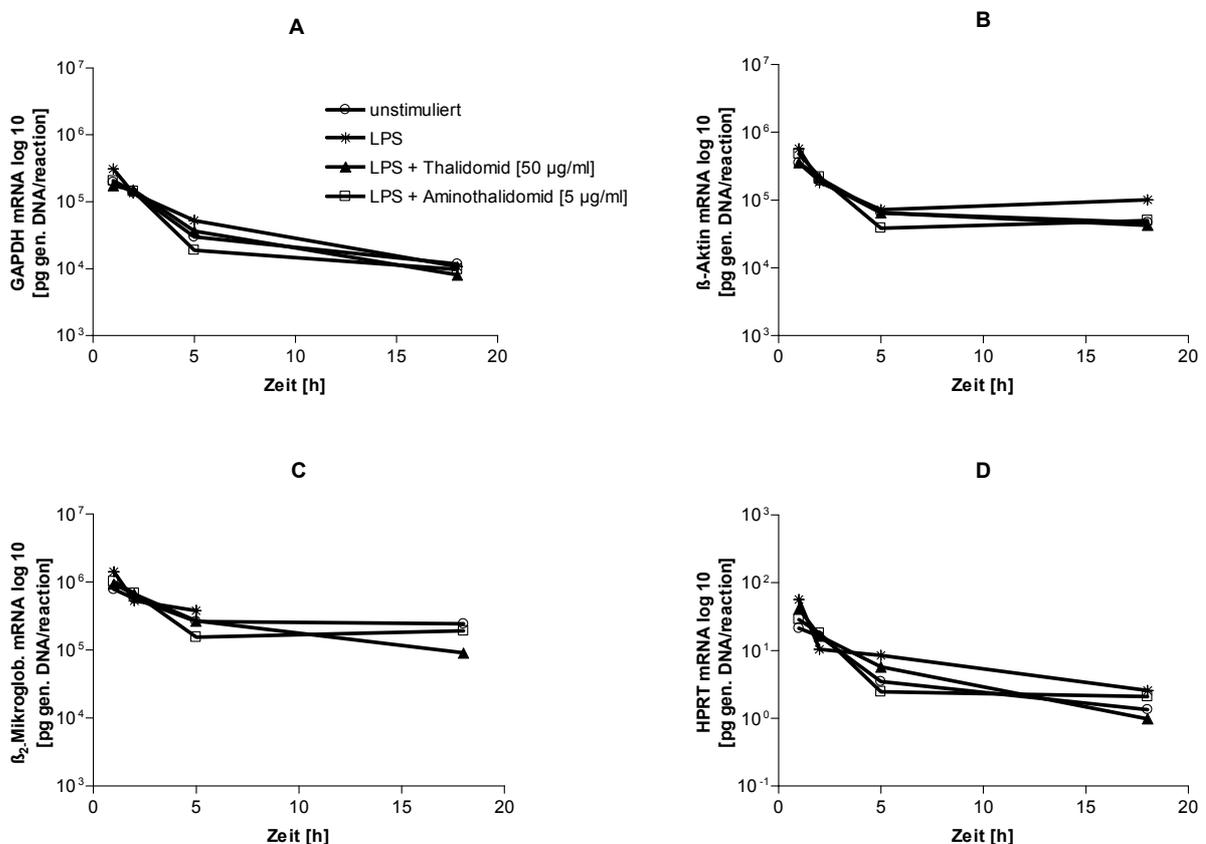


Abb. 18: mRNA-Menge verschiedener Haushaltsgene in CD14⁺-Monozyten in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer

Gezeigt ist die mRNA-Menge für GAPDH (A), β -Aktin (B), β_2 -Mikroglobulin (C) und HPRT (D) über den Zeitraum von 18 h in CD-14⁺-Monozyten, welche in An- und Abwesenheit von Thalidomid [50 µg/ml] und Aminothalidomid [5 µg/ml] stimuliert worden sind (Ansatz 2). Abkürzungen: GAPDH = glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, HPRT = hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase

Zusätzlich zur GAPDH-mRNA-Bildung wurde die Menge an 18S rRNA zum Vergleich der Proben überprüft. Die amplifizierte Menge an cDNA wurde gegen einen Standard aus dem cDNA-pool verschiedener Spender quantifiziert (Kap. 5.6.4). Die Abb. 19 zeigt die GAPDH-mRNA-Menge in CD-14⁺-Monozyten (A) und die 18S rRNA-Menge (B) in Gegenwart von Aminothalidomid und Suramin. Die 18S rRNA-Menge war in unstimulierten und LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten gleich.

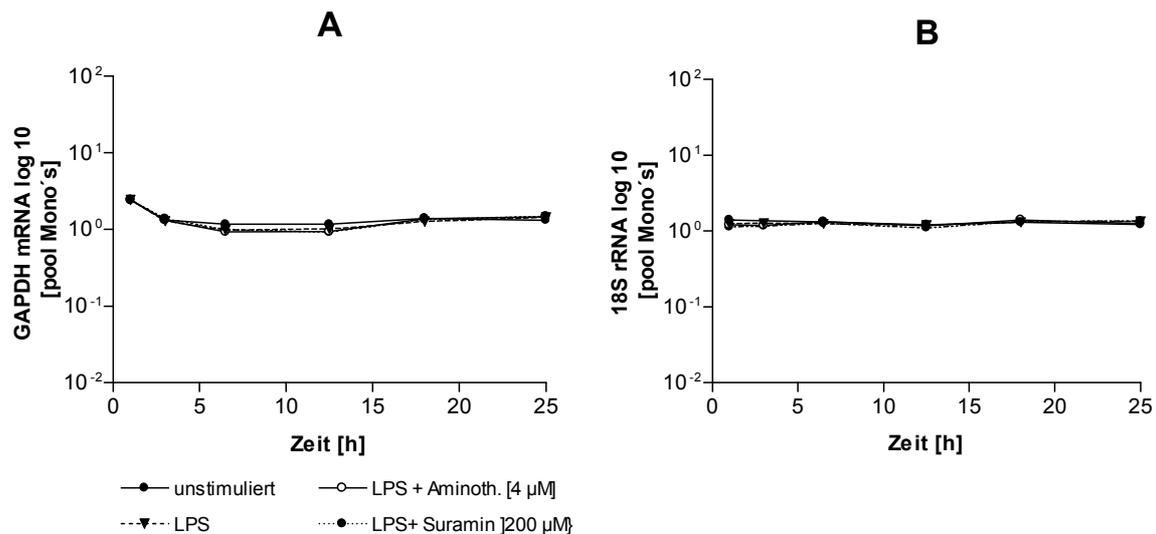


Abb. 19: mRNA-Mengen an GAPDH (A) und 18S rRNA (B) in CD14+-Monozyten in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer

Gezeigt ist die mRNA-Menge für GAPDH (A) und 18S rRNA (B) über den Zeitraum von 18 h in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 2).

Da weder eine Regulation der GAPDH-mRNA durch den Stimulus LPS, noch durch die Substanzen Thalidomid und Aminothalidomid (Abb. 18) bzw. Suramin (Abb. 19) erfolgte, wurde die Expressionsmenge der GAPDH-mRNA zur Normierung der Proben verwendet.

2.1.4 Untersuchungen zur Apoptose, Nekrose und Viabilität

Monozyten spielen bei der Initiierung, der Entwicklung und dem Verlauf der Immunantwort eine bedeutende Rolle^{92,163,63}. Eine Beeinflussung der Apoptose in Monozyten könnte die Immunantwort bedeutend verändern. Aufgrund der berichteten spontanen Apoptose von Monozyten in vitro wurden die CD-14⁺-Monozyten auf ihre Viabilität und auf apoptotische sowie nekrotische Vorgänge in An- und Abwesenheit von Aminothalidomid und Suramin untersucht²³⁻²⁵.

Die Apoptose/Nekrose bzw. Viabilität mit vier Methoden gemessen:

- Untersuchung der Apoptose mit dem Cell Death Detection ELISA™ (Kap. 5.7.2)
- Untersuchung der Apoptose über die Beeinflussung der Caspase 3/7-Aktivität (Kap. 5.7.3)
- Untersuchung der Nekrose mit dem Cell Death Detection ELISA™ (Kap. 5.7.2)
- Überprüfung der Viabilität mit dem Test AlamarBlue™ (Kap. 5.7.1).

2.1.4.1 Untersuchungen zur Apoptose

Untersuchung der Apoptose mit dem Cell Death Detection ELISA™

Die Apoptose der CD-14⁺-Monozyten wurde zunächst über mono- und oligonukleosomen DNA-Fragmente im Zytoplasma (Kap. 5.7.2) nachgewiesen. Die Abb. 20A zeigt, die im Zytoplasma nachgewiesenen mono- und oligonukleosomen DNA-Fragmente. Für **unstimulierte und LPS-stimulierte CD14⁺-Monozyten** erfolgte nur innerhalb der ersten 8 h der Kultivierung ein Anstieg der Apoptose, was sich an der erhöhten Menge an mono- und oligonukleosomen DNA-Fragmenten zeigte. Im Zeitraum von 8 h bis 18 h wurden in den unstimulierten als auch in den LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten keine zusätzlichen mono- und oligonukleosomen DNA-Fragmente und somit kein weiterer Anstieg der Apoptose nachgewiesen.

Die Apoptose der LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten wurde durch den **Einsatz von Caspase-Inhibitoren** (Hemmung der Caspase-3/7 durch den Inhibitor Z-DEVD FMK und der Caspase-8 sowie weiterer Caspasen durch den Inhibitor Z-VAD FMK) verringert. Nach 8 h LPS-Stimulation war keine Wirkung der Caspase-Inhibitoren zu beobachten. Allerdings wurde nach 18 h eine erhöhte Menge an mono- und oligonukleosomen DNA-Fragmenten in den CD-14⁺-Monozyten in Gegenwart der Caspase-Inhibitoren nachgewiesen. In Gegenwart des inaktiven Caspase-Inhibitors erfolgte innerhalb der ersten 8 h nach LPS-Stimulation keine Veränderung der Menge an mono- und oligonukleosomen DNA-Fragmenten. Zu den späteren Zeiten (18 h und 22 h nach LPS-Stimulation) zeigte die Negativkontrolle eine erhöhte Menge an mono- und oligonukleosomen DNA-Fragmenten im Zytoplasma.

Wie in Abb. 20B zu sehen, veränderte **Aminothalidomid** die Menge an mono- und oligonukleosomen DNA-Fragmenten über den beobachteten Zeitraum von 22 h im Vergleich zur LPS-stimulierten Kontrollgruppe nicht und beeinflusste daher nicht die Apoptose. **Suramin** verringerte innerhalb der ersten 5 h nach LPS-Stimulation die Menge an mono- und oligonukleosomen DNA-Fragmenten bis um die Hälfte gegenüber der LPS-Kontrolle und führte damit zu einer Verringerung der Apoptose. Diese frühe Wirkung von Suramin entsprach der Wirkung des Caspase-Inhibitors Z-DEVD-FMK. Im Gegensatz zum Caspase-Inhibitor nahm in Anwesenheit von Suramin die Menge an mono- und oligonukleosomen DNA-Fragmenten über die späteren Zeiten (5 h bis 22 h nach LPS-Stimulation) nicht zu.

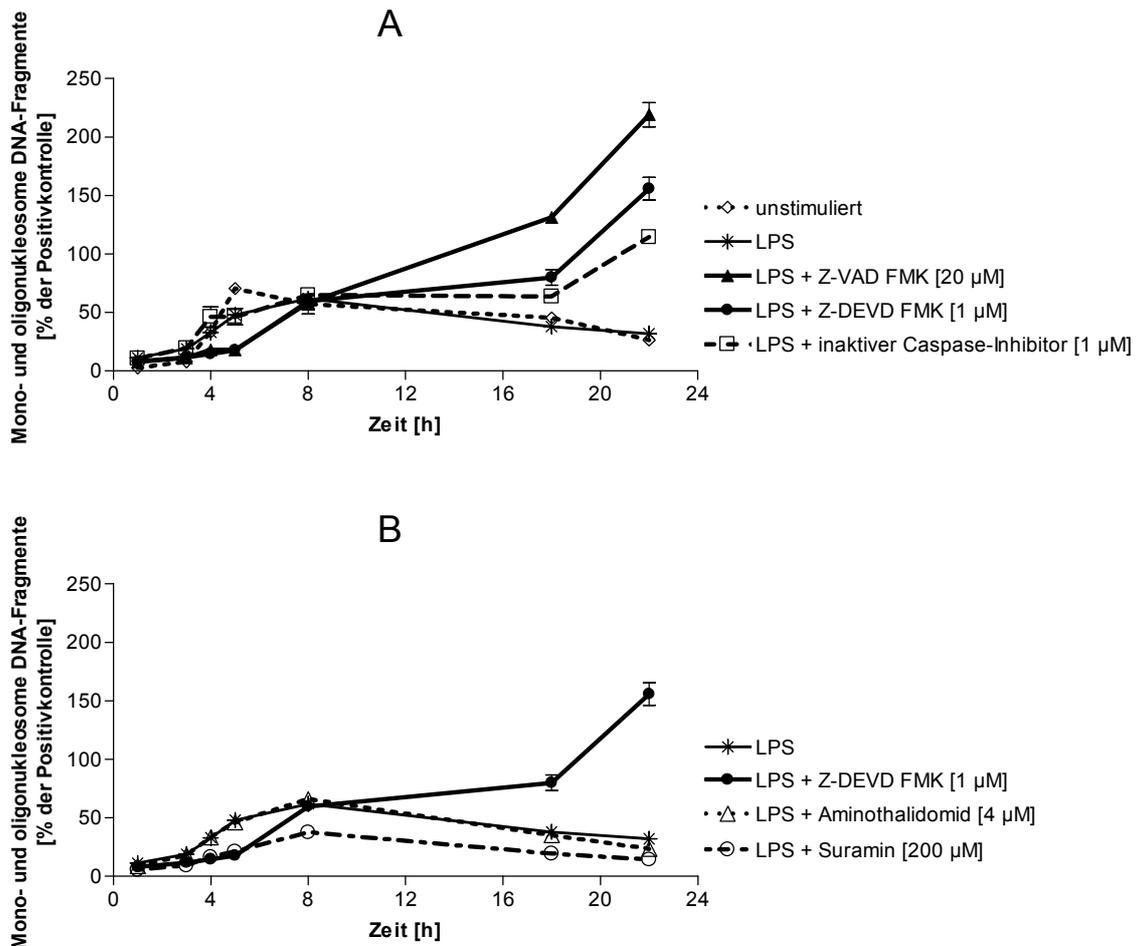


Abb. 20: Mono- und oligonucleosomale DNA-Fragmente im Zytoplasma von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten

Der Anteil an mono- und oligonucleosomen DNA-Fragmenten im Zytoplasma von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 1) wurde über den Zeitraum von 22 h untersucht. Die erhöhte Menge an mono- und oligonucleosomen DNA-Fragmenten im Zytoplasma zeigt die Stärke der Apoptose.

Untersuchung der Apoptose über die Beeinflussung der Caspase 3/7-Aktivität

In Abb. 21 ist die Aktivität der Caspase-3/7, welche mit dem Apo-ONE[®] Homogeneous Caspase-3/7 Assay gemessen wurde (Kap. 5.7.3) dargestellt.

Das Prinzip der Messung beruht darauf, dass die Caspase-3/7 einen Aspartat-Rest vom prä-fluoreszierendem Caspase-3/7-Substrate Rhodamine 110 abspaltet, wodurch ein messbares fluoreszierendes Produkt entsteht.

In **unstimulierten als auch in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten** wurde innerhalb der ersten 6 h-8 h eine erhöhte Caspase-3/7-Aktivität beobachtet, welche sich nach 8 h-18 h Kultivierung nicht veränderte.

Die **Caspase-Inhibitoren** (Z-DEVD FMK bzw. Z-VAD FMK) verringerten die Caspase-3/7-Aktivität um 97 % bzw. 99 % nach 4 h LPS-Stimulation und führten zu einer anhaltenden Hemmung der Caspase-3/7. Die Negativkontrolle führte in den ersten 4 h zu einer 2 %-igen Hemmung der Caspase-3/7 im Vergleich zu LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten. Nach 4 h LPS-Stimulation bewirkte die Negativkontrolle ebenfalls ein Hemmung der Caspase-3/7-Aktivität. Diese verringerte Caspase-3/7-Aktivität blieb bis 22 h nach LPS-Stimulation erhalten.

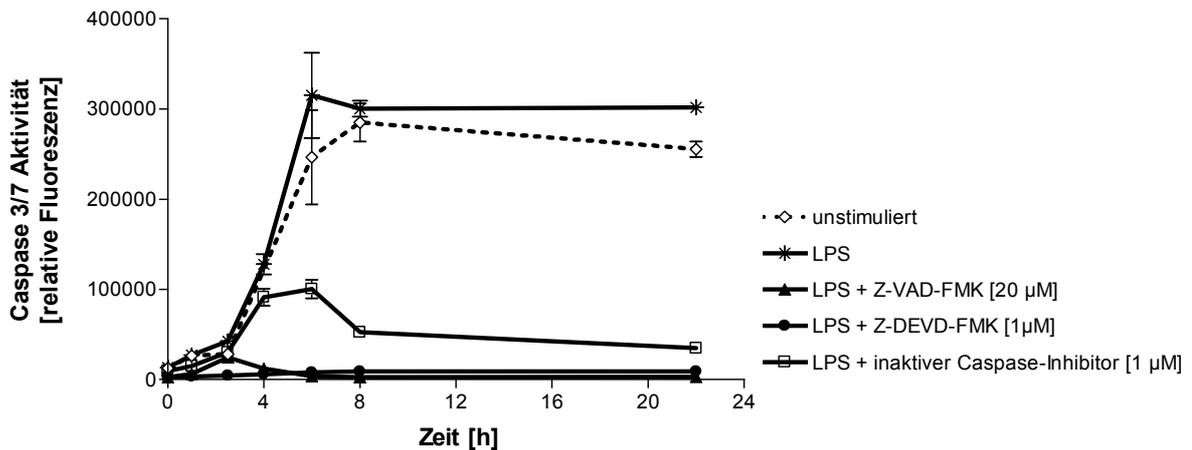


Abb. 21: Aktivität des Caspase-3/7 Enzyms in CD-14⁺-Monozyten

Die Abbildung zeigt die Aktivität des Caspase-3/7 Enzyms in CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 1) über den Zeitraum von 22 h. Die Aktivität des Caspase-3/7 Enzyms wurde indirekt über den Substratumsatz von Rhodamine 110 anhand der relativen Fluoreszenz gemessen.

Die Abb. 22 zeigt den Einfluss von Aminothalidomid und Suramin auf die Caspase-3/7-Aktivität nach 4 h LPS-Stimulation. **Aminothalidomid** beeinflusste die Caspase-3/7-Aktivität in der gleichen Stärke wie die Negativkontrolle des Caspase-3/7 Inhibitors. Der Caspase-Inhibitor Z-DEVD FMK führte zu einer fast vollständigen Hemmung der Caspase-3/7, während **Suramin** die Caspase-3/7-Aktivität konzentrationsabhängig minderte. Durch 200 µM Suramin wurde die Caspase-3/7-Aktivität auf 40 % im Vergleich zur LPS-Kontrollgruppe verringert.

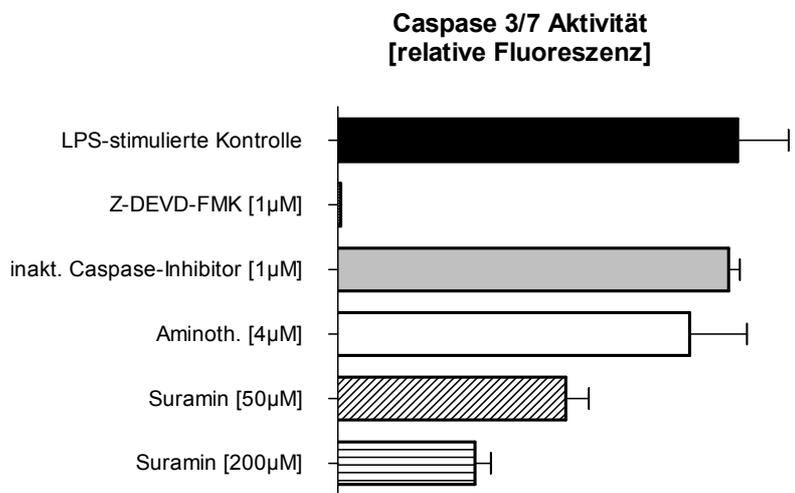


Abb. 22: Einfluss verschiedener Substanzen auf die Aktivität des Caspase-3/7 Enzyms in CD-14⁺-Monozyten

Dargestellt ist die Caspase 3/7 Aktivität, welche anhand des Substratumsatzes und der daraus resultierenden Änderung der Fluoreszenz in An- und Abwesenheit des Caspase-Inhibitors Z DEVD-FMK [1 µM], von Aminothalidomid [4 µM], Suramin [50 µM/200 µM] und des inaktiven Caspase-Inhibitors [1 µM] nach 4 h (Ansatz 2) bestimmt wurde. Abkürzungen: inakt. = inaktiv

2.1.4.2 Untersuchungen zur Nekrose

Untersuchung der Nekrose mit dem Cell Death Detection ELISA™

Der Vorgang der Nekrose wird, unter anderem von einer Zerstörung der Plasmamembran begleitet, wodurch der Inhalt der Zelle wie beispielsweise DNA-Fragmente innerhalb weniger Minuten in den Kulturüberstand freigesetzt wird. Diese DNA-Fragmente können im Kulturüberstand mit dem Cell Death Detection ELISA® nachgewiesen werden (Kap. 5.7.2). Die Abb. 23 zeigt, dass in **unstimulierten als auch in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten** eine geringe Menge an mono- und oligonukleosomen DNA-Fragmenten im Kulturüberstand vorhanden war. Ebenfalls wurde eine ca. 10-fach geringere Menge an mono- und oligonukleosomen DNA-Fragmenten im Kulturüberstand als im Zytoplasma (s. Abb. 20) detektiert. Es wurde kein Einfluss der **Caspase-Inhibitoren** (Z-DEVD FMK und Z-VAD FMK), des inaktiven Caspase-Inhibitors, **Aminothalidomid**'s oder des **Suramin**'s auf die, im Kulturüberstand befindliche Menge an mono- und oligonukleosomen DNA-Fragmenten und damit auf die Nekrose festgestellt.

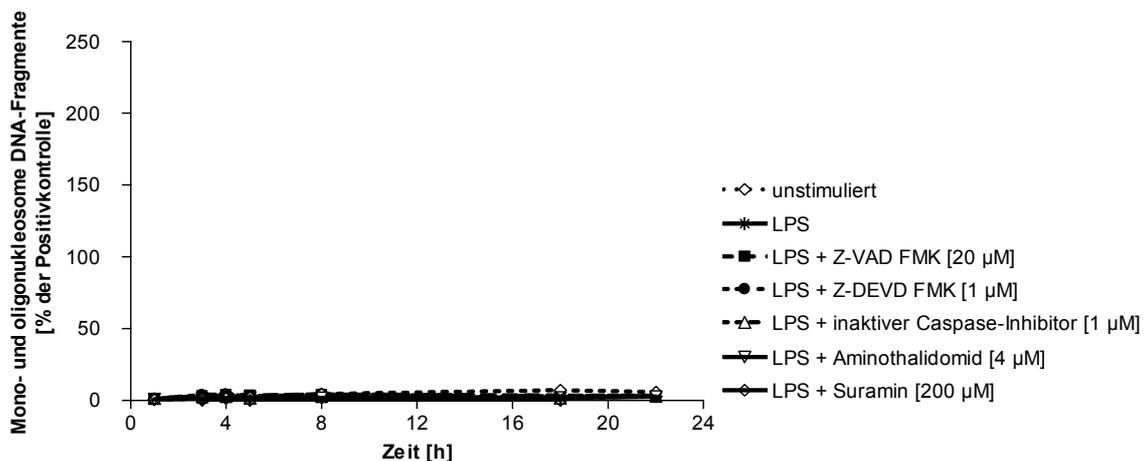


Abb. 23: Mono- und oligonukleosome DNA-Fragmente im Kulturüberstand von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten

Der Anteil an mono- und oligonukleosomen DNA-Fragmenten im Kulturüberstand von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 1) wurde über den Zeitraum von 22 h untersucht. Die Menge an mono- und oligonukleosomen DNA-Fragmenten im Kulturüberstand gilt als Mass für die Stärke der Nekrose.

2.1.4.3 Untersuchungen zur Viabilität

Überprüfung der Viabilität und Test auf Toxizität mit dem Test AlamarBlue™

Die chemische Reduktion von AlamarBlue™, welche sich an einer erhöhten Fluoreszenz messen lässt, erfolgt in lebenden Zellen proportional zum zellulären Metabolismus. Je höher die Differenz zwischen der Fluoreszenz vor Inkubation mit AlamarBlue™ und der Fluoreszenz nach 4 h Inkubation ist, um so mehr lebende Zellen sind aktiv (Kap. 5.7.1). Daher ist der AlamarBlue™ geeignet, um eine toxische Wirkung auf die CD-14⁺-Monozyten durch die Substanzen Aminothalidomid und Suramin auszuschliessen.

Wie in Abb. 24 zu sehen, beeinflusste **Aminothalidomid** verglichen zur LPS-Kontrollgruppe die Messung im AlamarBlue™ nicht. **Suramin** erhöhte gegenüber der LPS-Kontrollgruppe die Viabilität über den gesamten Zeitraum im AlamarBlue™, wobei sich ein Anstieg der Viabilität um ca. 60 % zwischen 4 h und 18 h nach LPS-Stimulation zeigte.

Bereits in den ersten 4 h nach LPS-Stimulation wurde durch Suramin die Viabilität um das 32- bzw. um das 33-Fache gegenüber der LPS-Kontrollgruppe gesteigert. Die Ergebnisse aus dem AlamarBlue™ weisen darauf hin, dass in Gegenwart von Suramin die Viabilität der CD-14⁺-Monozyten erhöht wurde.

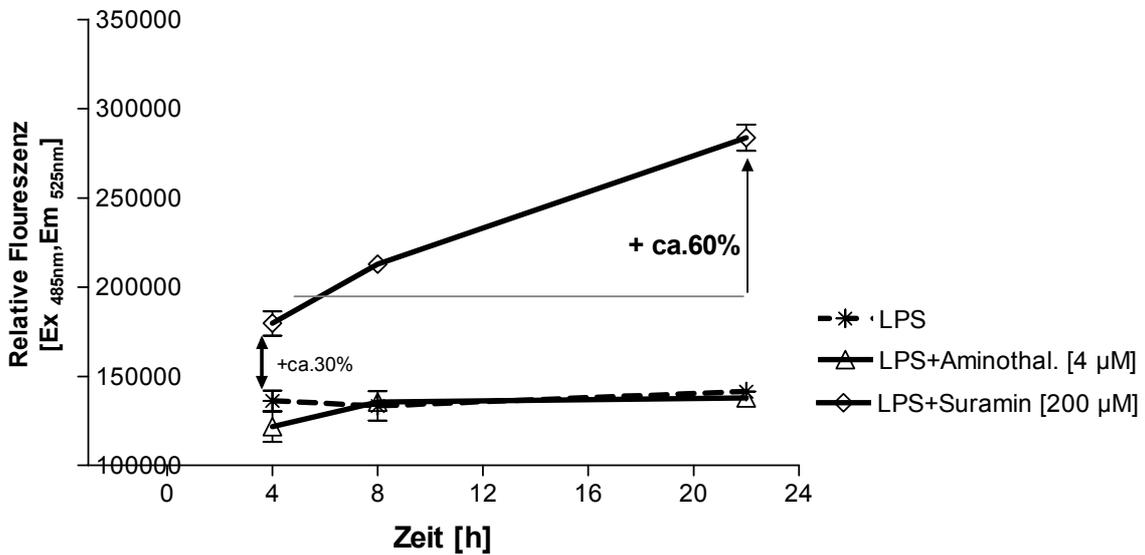


Abb. 24: Wirkung von Aminothalidomid und Suramin auf die Relative Fluoreszenz

Gezeigt ist die Wirkung von Aminothalidomid [4 µM] und Suramin [200 µM] auf die relative Fluoreszenz des Farbstoffs AlamarBlue™ in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 2) über einen Zeitraum von 22 h. Abkürzungen: Aminoth. = Aminothalidomid

Zusammenfassung zum Modell der LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten:

Das Modell der LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten eignet sich zur Untersuchung der Zytokinbildung von TNF α , IL-12p40 und IL-10. Die Zytokine wurden in der Reihenfolge TNF α , IL-12p40 und IL-10 in den Kulturüberstand sezerniert. Bei einer Konzentration von 10 μ g/ml LPS und nach 24 h LPS-Stimulation wurde die größte Menge an TNF α , IL-12p40 und IL-10 in den Kulturüberstand sezerniert.

Die Erkennung von TNF α - und IL-12p40-Protein wurde durch Aminothalidomid [4 μ M] und Suramin [200 μ M] nicht beeinflusst. Aminothalidomid beeinträchtigte die Erkennung von IL-10 im Biosource-ELISA nicht, während kein IL-10-Protein in Gegenwart von Suramin nachzuweisen war. Die Erkennung von IL-10-Protein im R&D-ELISA wurde durch Aminothalidomid und Suramin nicht gestört. Wie die Untersuchungen zur Erkennung von denaturiertem IL-10-Protein zeigten, erkannten die Antikörper im Biosource-ELISA nur IL-10-Protein in seiner biologisch aktiven Form. Das IL-10-Protein im R&D-ELISA wurde hingegen sowohl in biologisch aktiver als auch in denaturierter Form detektiert. Daher wurde der Biosource-ELISA zur Detektion von biologisch aktivem IL-10-Protein verwendet.

Die Untersuchung der Expression der Haushaltsgene GAPDH, β -Aktin, β 2-Mikroglobulin und HPRT in frisch isolierten CD-14⁺-Monozyten zeigte eine verringerte mRNA-Menge in allen 4 untersuchten Haushaltsgenen innerhalb der ersten 5 h nach Kultivierung. Diese Verringerung erfolgte unabhängig von einer Stimulation der CD-14⁺-Monozyten durch LPS oder dem Einfluss von Thalidomid bzw. Aminothalidomid. Da kein Einfluss des Stimulus LPS oder der zu untersuchenden pharmakologischen Substanz in den Versuchen beobachtet wurde, wurde zur Messung der Menge an Transkript (mRNA) der LPS-induzierten Zytokine die mRNA-Menge der GAPDH zur Normierung der Proben verwendet.

In frisch isolierten CD-14⁺-Monozyten erfolgte ein Anstieg der Menge an mono- und oligonukleosomen DNA-Fragmenten im Zytoplasma sowie eine verstärkte Aktivität der Caspase-3/7 innerhalb der ersten 6 h-8 h nach Kultivierung, welche im Zeitraum von 8 h-18 h nicht weiter verändert wurde. Durch die spezifische Hemmung der Caspase-3/7 und die Hemmung der Caspase-8 sowie weiterer Caspasen durch entsprechende Caspase-Inhibitoren, konnte die Menge an mono- und oligonukleosomen DNA-Fragmenten im Zytoplasma und damit die Apoptose verringert werden. Die erhöhte Menge an mono- und oligonukleosomen DNA-Fragmenten sowie die verstärkte Caspase-3/7-Aktivität bestätigten, dass in frisch isolierten CD-14⁺-Monozyten spontan die Apoptose auftritt²³⁻²⁵. Die ca. 10-fach geringere Menge an mono- und oligonukleosomen DNA-Fragmenten im Kulturüberstand der CD-14⁺-Monozyten in An- und Abwesenheit der getesteten Substanzen zeigte, dass über den beobachteten Zeitraum von 22 h keine Nekrose zu beobachten war.

Die Untersuchungen zur Wirkung von Aminothalidomid auf die Apoptose/Viabilität in frisch isolierten CD-14⁺-Monozyten haben gezeigt, dass Aminothalidomid weder die Apoptose (Menge an mono- und oligonukleosomen Fragmenten und Caspase 3/7-Aktivität) noch die Viabilität (AlamarBlue™) der CD-14⁺-Monozyten beeinflusst. Suramin war in der Lage die Apoptose in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten zu hemmen (Menge an mono- und oligonukleosomen Fragmenten und Caspase 3/7-Aktivität) sowie die Viabilität der CD-14⁺-Monozyten zu erhöhen.

2.2 Die Wirkungen von Aminothalidomid nach LPS-Stimulation

2.2.1 Untersuchungen im Proteinarray

Die Abb. 25 zeigt die Membran des Proteinarray vom Kulturüberstand LPS-stimulierter CD-14⁺-Monozyten unter Einfluss von 4 µM Thalidomid oder 4 µM Aminothalidomid. Die Intensität der einzelnen Spots zeigt die Konzentration der nachgewiesenen Zytokine an (Kap. 5.5.3). In Gegenwart von Thalidomid und Aminothalidomid wurde die Bildung der Zytokine MCP-1, TNFα, IL-6, IL-8, IL-10 und IL-1β verringert. Aminothalidomid hemmte die Bildung der Zytokine MCP-1, TNFα und IL-1β um das Doppelte bis Dreifache stärker als Thalidomid und verringerte die Bildung des TNFα-Proteins am Stärksten (93 % Hemmung). Die Sekretion von IL-6, IL-8 und IL-10-Protein wurde durch Thalidomid oder Aminothalidomid nicht wesentlich gegenüber der LPS-Kontrolle beeinflusst (im Bereich von 0,5 %-9 % Hemmung). Die nach LPS-Stimulation schwach detektierten Zytokine GRO und IL-12p70, wurden durch Thalidomid oder Aminothalidomid in der Intensität der einzelnen Spots nicht beeinflusst.

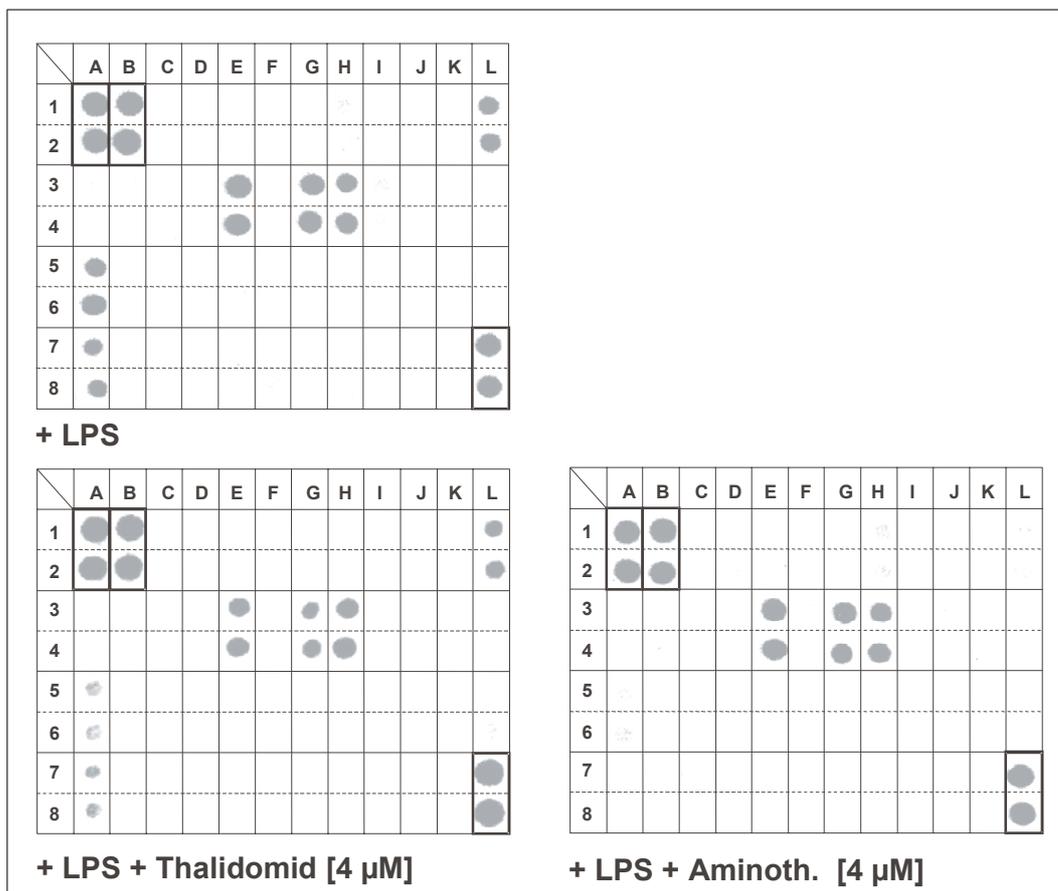


Abb. 25: Membranen des Proteinarrays unter der Wirkung von Thalidomid und Aminothalidomid

Dargestellt ist die Membran des Proteinarrays, auf welcher der Kulturüberstand (Ansatz 5) von LPS-stimulierten CD14⁺-Monozyten (oben links), von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten unter Wirkung von Thalidomid [4 µM] (unten links) und von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten unter Wirkung von Aminothalidomid [4 µM] (unten rechts) analysiert wurde. Die Stärke der Spotintensität wurde relativ zu den 6 Positivkontrollen jeder Membran (eingerahmte Kästchen) bestimmt und entspricht der sezernierten Zytokinmenge. Folgende Proteine wurden mittels Proteinarray (von links nach rechts) nachgewiesen: GRO (H1/2), IL-1β (L1/2), IL-6 (E3/4), IL-8 (G3/4), IL-10 (H3/4), IL-12p70 (I3/4), MCP-1 (A5/6) und TNFα (A7/8).

2.2.2 Proteinbildung von TNF α , IL-12p40 und IL-10

2.2.2.1 Untersuchungen im ELISA und mittels RT-PCR

2.2.2.1.1 Konzentrationswirkungskurven von Thalidomid und Aminothalidomid

Der IC₅₀-Wert von Thalidomid für die Hemmung der LPS-induzierten TNF α -Sekretion in Monozyten ist für 50 μ g/ml beschrieben¹¹⁷. Daher wurde die Wirkung von Thalidomid und Aminothalidomid auf die Sekretion von TNF α , IL-12p40 und IL-10 im Konzentrationsbereich 0.003 ng/ml–50 μ g/ml beider Substanzen untersucht (Kap. 5.5.1).

Die Konzentrations-Wirkungskurven für Thalidomid (gepunktete Linie) und für Aminothalidomid (durchgezogene Linie) auf die Sekretion der LPS-induziertem Zytokine dienten der Berechnung der IC₂₅-Werte bzw. IC₅₀-Werte (Kap. 5.5.1). Thalidomid und Aminothalidomid beeinflussten die Erkennung der Proteine TNF α , IL-12p40 und IL-10 im ELISA nicht (Daten nicht gezeigt).

Wie die Abb. 26 zeigt, verringerten Thalidomid und Aminothalidomid die Proteinmenge an sezerniertem TNF α im Kulturüberstand nach 24 h LPS-Stimulation signifikant. Beide Konzentrations-Wirkungskurven zeigten einen sigmoidalen Verlauf. Bei der maximal eingesetzten Konzentration von 50 μ g/ml verringerte Thalidomid die LPS-induzierte TNF α -Sekretion um maximal 48 % (52 % Zytokinproduktion), während Aminothalidomid die Freisetzung von TNF α um maximal 93 % hemmte (7 % Zytokinproduktion). Für Thalidomid wurde kein IC₅₀-Wert für die TNF α -Freisetzung berechnet, da keine 50 %ige Hemmung erfolgte. Der IC₅₀-Wert auf die TNF α -Freisetzung für Aminothalidomid betrug 0,9 ng/ml (50 % Zytokinproduktion). Die IC₂₅-Werte für die TNF α -Freisetzung zeigten, dass Aminothalidomid mit 0,3 ng/ml potenter (700-fach stärker) als Thalidomid mit einem IC₂₅-Wert von 0,21 μ g/ml wirkte.

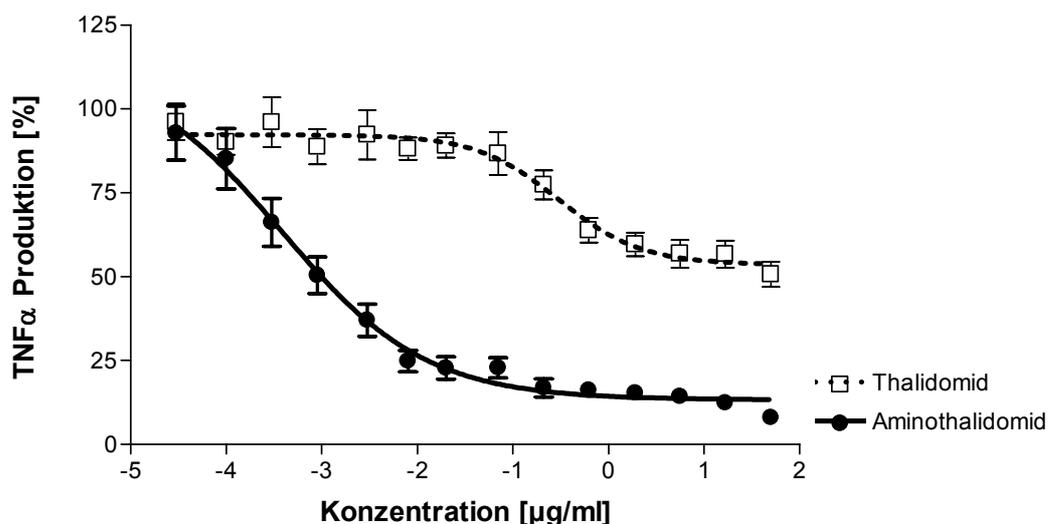


Abb. 26: TNF α -Konzentrations-Wirkungskurve für Thalidomid und Aminothalidomid

Die Wirkung von Thalidomid und Aminothalidomid auf die Sekretion von TNF α im Konzentrationsbereich 0,003 ng/ml–5 μ g/ml beider Substanzen wurde untersucht. Dargestellt ist die Wirkung von Thalidomid (gepunktete Linie) und für Aminothalidomid (durchgezogene Linie) auf die LPS-induzierte TNF α -Bildung in CD-14⁺-Monozyten nach 24 h (Ansatz 1). Sowohl Aminothalidomid als auch Thalidomid hemmten die TNF α -Bildung in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten statistisch signifikant (beide $p < 0,01$ mit ANOVA und anschließendem Dunnett's test).

In Abb. 27 ist für IL-12p40 die Konzentrations-Wirkungskurve von Thalidomid und Aminothalidomid dargestellt. Beide Substanzen zeigten den gleichen sigmoidalen Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurve, welcher für die Konzentrations-Wirkungskurve von TNF α gezeigt wurde (Abb. 26). Thalidomid und Aminothalidomid bewirkten eine signifikante konzentrationsabhängige Verringerung des IL-12p40-Proteins im Kulturüberstand von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten. 50 μ g/ml Thalidomid verringerte die LPS-induzierte IL-12p40-Sekretion um maximal 80 % (20 % Zytokinproduktion), während 50 μ g/ml Aminothalidomid die Freisetzung von IL-12p40 um maximal 99 % (1 % Zytokinproduktion) hemmte. Da für beide Substanzen die Hemmung von IL-12p40 deutlich ausgeprägt war, konnten die IC₅₀-Werte berechnet werden. Der IC₅₀-Wert für die Hemmung der IL-12p40 Bildung in CD-14⁺-Monozyten betrug für Thalidomid 53,5 ng/ml und für Aminothalidomid 0,3 ng/ml. Eine 50 %ige % Zytokinproduktion (50 % Hemmung) wurde durch Aminothalidomid bei einer ca. 200-fach geringeren Konzentration als durch Thalidomid erreicht.

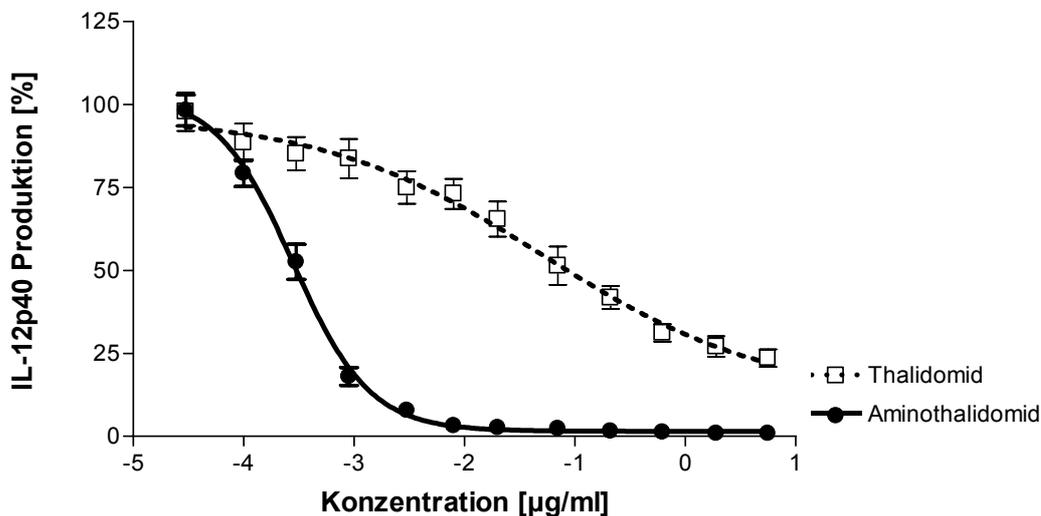


Abb. 27: IL-12p40-Konzentrations-Wirkungskurve für Thalidomid und Aminothalidomid

Die Wirkung von Thalidomid und Aminothalidomid auf die Sekretion von IL-12p40 im Konzentrationsbereich 0,003 ng/ml–5 μ g/ml beider Substanzen wurde untersucht. Dargestellt ist die Wirkung für Thalidomid (gepunktete Linie) und für Aminothalidomid (durchgezogene Linie) auf die LPS-induzierte IL-12p40-Bildung in CD-14⁺-Monozyten nach 24 h (Ansatz 1). Sowohl Aminothalidomid als auch Thalidomid hemmten die IL-12p40-Bildung in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten statistisch signifikant (beide $p < 0,01$ mit ANOVA und anschließendem Dunnett's test).

Die in Abb. 28 dargestellte Konzentrations-Wirkungskurve in Bezug auf die IL-10-Proteinbildung demonstrierte, dass Thalidomid und Aminothalidomid die IL-10-Proteinbildung im Kulturüberstand von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten signifikant steigerten. Thalidomid zeigte einen kontinuierlichen Anstieg der IL-10-Proteinmenge. Die IL-10-Konzentrations-Wirkungskurve für Aminothalidomid zeigte einen zweigeteilten Verlauf, welche aus einem Anstieg und einem Abfall der IL-10-Bildung bestand. Aminothalidomid steigerte, bis zu einer Konzentration von 0,07 µg/ml, die im Kulturüberstand nachweisbare IL-10-Proteinmenge. Bei Übersteigen dieser Konzentration erfolgte eine Verringerung der IL-10-Proteinmenge. Über den eingesetzten Konzentrationsbereich von Aminothalidomid [0,03 ng/ml - 5 µg/ml] wurde eine erhöhte IL-10-Proteinmenge im Kulturüberstand nachgewiesen. Der IC₅₀-Wert für die Steigerung der IL-10-Proteinbildung in CD-14⁺-Monozyten betrug für Thalidomid 56,6 ng/ml und für Aminothalidomid 1,7 ng/ml, sodass durch Aminothalidomid die IL-10-Bildung 30-fach stärker gesteigert wurde. Der Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurve für IL-10 war in den untersuchten Spendern/Versuchen unterschiedlich. Dies wurde an den größeren Standardabweichungen für den Parameter IL-10 im Vergleich zu TNFα (Abb. 26) oder IL-12p40 (Abb. 27) deutlich.

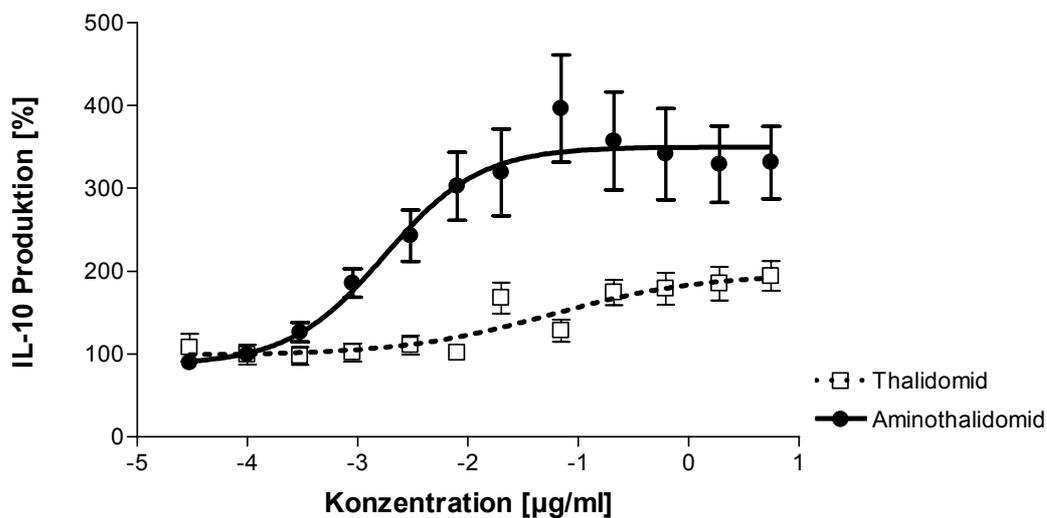


Abb. 28: IL-10-Konzentrations-Wirkungskurve für Thalidomid und Aminothalidomid

Die Wirkung von Thalidomid und Aminothalidomid auf die Sekretion von IL-10 im Konzentrationsbereich 0,003 ng/ml–5 µg/ml beider Substanzen wurde untersucht. Dargestellt ist die Wirkung von Thalidomid (gepunktete Linie) und Aminothalidomid (durchgezogene Linie) auf die LPS-induzierte IL-10-Bildung in CD-14⁺-Monozyten nach 24 h (Ansatz 1). Sowohl Aminothalidomid als auch Thalidomid steigerten die IL-10-Bildung in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten statistisch signifikant (Aminothalidomid $p < 0,01$, Thalidomid $p < 0,05$ mit ANOVA und anschließendem Dunnett's test).

2.2.2.1.2 Kinetik von TNFα, IL-12p40 und IL-10 (Protein und mRNA)

Durch kinetische Betrachtung der Zytokinbildung lassen sich Hypothesen aufstellen, ob die Wirkung von pharmakologischen Substanzen direkt oder indirekt erfolgt. Daher interessierte, wie die zeitliche Freisetzung der o.g. Zytokine durch Aminothalidomid erfolgte. Die Konzentration von 4 µM Aminothalidomid wurde gewählt, da bei dieser Konzentration eine maximale Wirkung auf alle drei oben genannten Zytokine erfolgte (Kap. 2.2.2.1.1).

Kinetik der TNF α -Bildung

Wie in Abb. 29 dargestellt, sezernierten auch unstimulierte CD-14⁺-Monozyten TNF α -Protein, wobei die Hauptmenge innerhalb der ersten 5 h nach Kultivierung in den Kulturüberstand sezerniert wird. LPS steigerte die TNF α -Freisetzung bis 7 h nach LPS-Stimulation um einen Faktor 5 – 11 gegenüber der TNF α -Freisetzung in unstimulierten CD-14⁺-Monozyten. Aminothalidomid hemmte über die gesamte Zeit der LPS-Stimulation die TNF α -Freisetzung auf das Niveau der unstimulierten Monozyten.

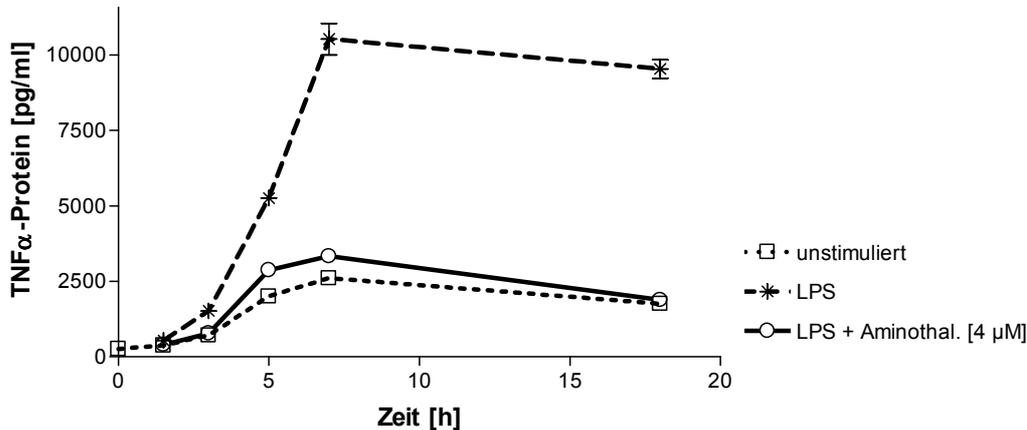


Abb. 29: Kinetik der Sekretion von TNF α unter dem Einfluss von Aminothalidomid

Dargestellt ist die TNF α -Proteinmenge, welche im Kulturüberstand von CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 2) über den Zeitraum von 18 h nach LPS-Stimulation in An- bzw. Abwesenheit von Aminothalidomid [4 μ M] und in unstimulierten CD-14⁺-Monozyten nachgewiesen wurde.

Die Abb. 30 zeigt die Wirkung von Aminothalidomid auf die Bildung der TNF α -mRNA. In unstimulierten CD-14⁺-Monozyten wurde die TNF α -mRNA-Bildung innerhalb der ersten 3 h gesteigert. Nach 1,5 h LPS-Stimulation war die Bildung der TNF α -mRNA bereits gegenüber der unstimulierten Kontrolle erhöht, wobei die maximale Menge an TNF α -mRNA in den ersten 3 h-5 h nach LPS-Stimulation gebildet wurde. Nach 7 h erfolgte keine weitere Steigerung der TNF α -mRNA-Bildung und nach 18 h wurde eine verringerte Menge an TNF α -mRNA in allen Proben festgestellt, welche der TNF α -mRNA-Menge in unstimulierten CD-14⁺-Monozyten entsprach. Aminothalidomid hemmte die Bildung der TNF α -mRNA nach 1,5 h LPS-Stimulation um 53 %, nach 3 h um 45 %, nach 5 h um 82 % und nach 7 h um 98 % der LPS-induzierten TNF α -Produktion.

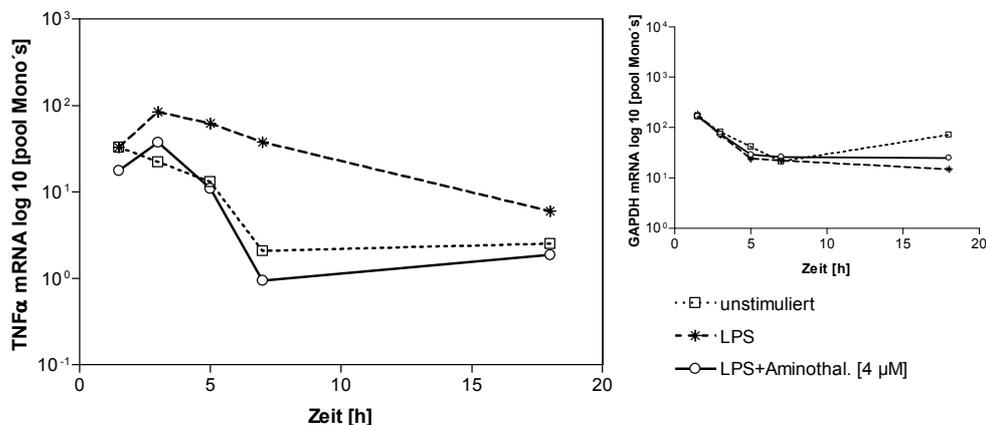


Abb. 30: TNF α -mRNA-Menge unter Einwirkung von Aminothalidomid [4 μ M] in LPS-stimulierten CD14⁺-Monozyten

Dargestellt ist die TNF α -mRNA-Menge, welche von CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 2) über den Zeitraum von 18 h nach LPS-Stimulation in An- bzw. Abwesenheit von Aminothalidomid [4 μ M] und im Vergleich zu unstimulierten CD-14⁺-Monozyten detektiert wurde.

Kinetik der IL-12p40-Bildung

Wie in Abb. 31 gezeigt, wurden in unstimulierten CD-14⁺-Monozyten nur geringe Mengen an IL-12p40-Protein in den Kulturüberstand sezerniert. Aminothalidomid hemmte die Sekretion von IL-12p40 über die gesamte Zeit der LPS-Stimulation mit 98 %.

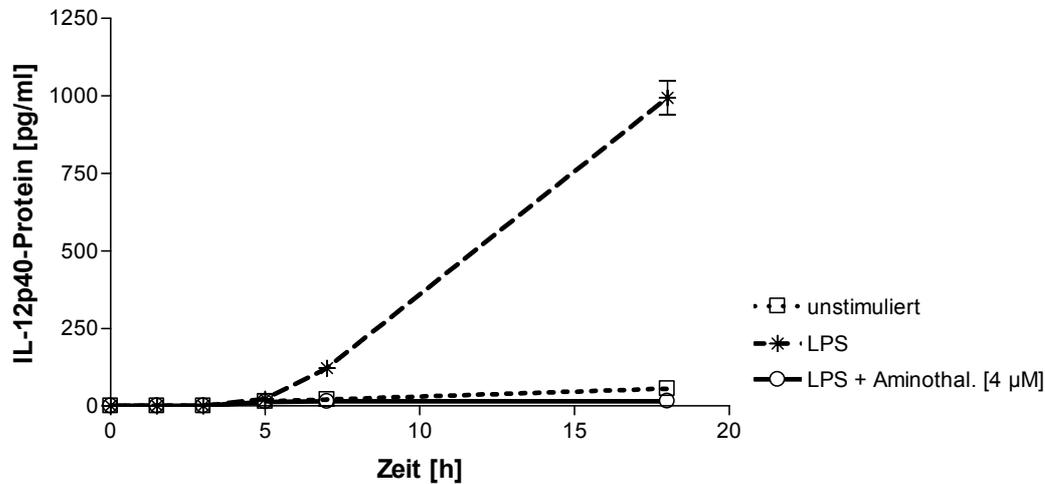


Abb. 31: Kinetik der Sekretion von IL-12p40 unter dem Einfluss von Aminothalidomid

Dargestellt ist die IL-12p40-Proteinmenge, welche im Kulturüberstand von CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 2) über den Zeitraum von 18 h nach LPS-Stimulation in An- bzw. Abwesenheit von Aminothalidomid [4 µM] und in unstimulierten CD-14⁺-Monozyten nachgewiesen wurde.

Wie Abb. 32 demonstriert, lässt sich die Bildung der IL-12p40-mRNA über 25 h LPS-Stimulation in zwei Phasen beschreiben. Die ansteigende Bildung der IL-12p40-mRNA bis 5 h bestätigt die LPS-Stimulation. Bis 12 h nach LPS-Stimulation erfolgte eine gleichmäßige IL-12p40-mRNA-Produktion, wobei zu den späteren Zeitpunkten eine leicht verringerte IL-12p40-mRNA-Bildung beobachtet wurde.

Unter Einfluss von Aminothalidomid wurde bereits nach 3 h LPS-Stimulation eine 64 %ige Hemmung der IL-12p40-mRNA gegenüber der LPS-Kontrollgruppe deutlich. Die Hemmung der IL-12p40-mRNA-Bildung durch Aminothalidomid betrug nach 5 h LPS-Stimulation bereits 97 %.

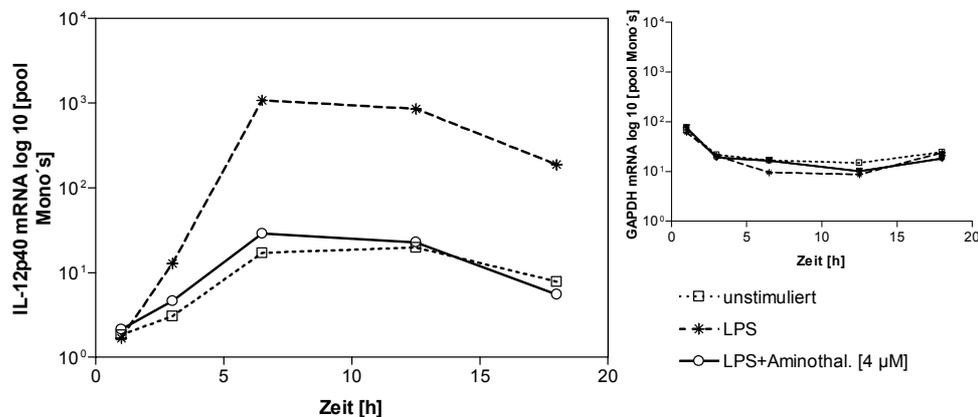


Abb. 32: IL-12p40-mRNA-Menge unter Einwirkung von Aminothalidomid [4 µM] in LPS-stimulierten CD14⁺-Monozyten

Dargestellt ist die IL-12p40-mRNA-Menge, welche von CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 2) über den Zeitraum von 18 h nach LPS-Stimulation in An- bzw. Abwesenheit von Aminothalidomid [4 µM] und im Vergleich zu unstimulierten CD-14⁺-Monozyten detektiert wurde.

Kinetik der IL-10-Bildung

Abb. 33 zeigt, dass nach 18 h in Gegenwart von Aminothalidomid/Thalidomid die 2-fache/1,5-fache IL-10-Proteinmenge im Kulturüberstand im Vergleich zur LPS-Kontrollgruppe nachgewiesen wurde. Bereits nach 6 h LPS-Stimulation wurde in Gegenwart von Aminothalidomid IL-10-Protein detektiert, während in der LPS-Kontrollgruppe noch kein IL-10-Protein nachgewiesen wurde. Nach 9 h LPS-Stimulation war durch Aminothalidomid/Thalidomid die 3-fache/1,5-fache Menge an IL-10-Protein der LPS-stimulierten Kontrolle nachweisbar. Unter dem Einfluss von Aminothalidomid wurde das IL-10-Protein im Kulturüberstand im Gegensatz zu Thalidomid zeitiger nachgewiesen.

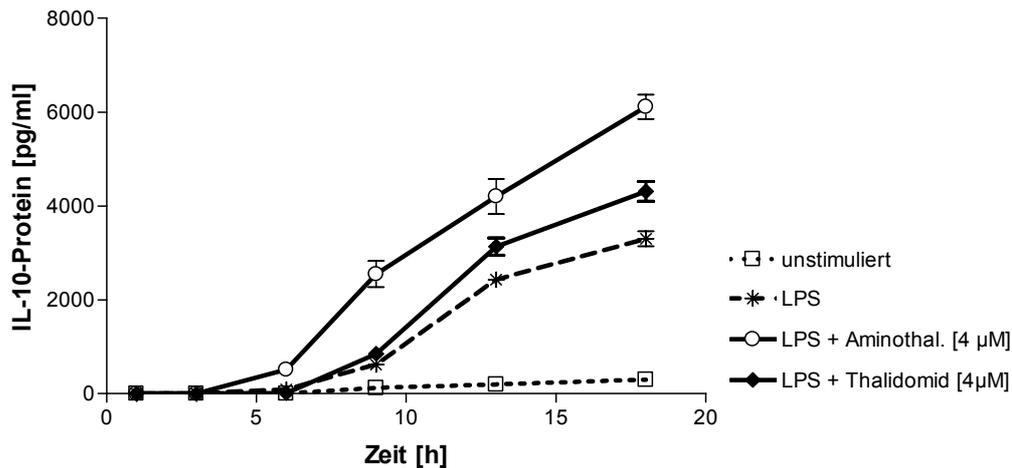


Abb. 33: Vergleichende Kinetik der Sekretion von IL-10 unter dem Einfluss von Thalidomid und Aminothalidomid

Dargestellt ist die IL-10-Proteinmenge, welche im Kulturüberstand von CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 2) über den Zeitraum von 18 h nach LPS-Stimulation in An- bzw. Abwesenheit von Aminothalidomid [4 µM] bzw. Thalidomid [4 µM] und in unstimulierten CD-14⁺-Monozyten nachgewiesen wurde.

Wie Abb. 34 präsentiert, wurde bis 12 h nach LPS-Stimulation die maximale Menge der IL-10-mRNA einer Anstiegsphase nachgewiesen. Im Anschluss daran erfolgte eine gleichmäßige IL-10-mRNA-Produktion (Plateau). Aminothalidomid führte bereits nach 3 h LPS-Stimulation zu einer 10-fach erhöhten Menge an IL-10-m-RNA gegenüber der LPS-Kontrollgruppe. Die gesteigerte Bildung der IL-10-mRNA durch Aminothalidomid gegenüber der LPS-Kontrollgruppe blieb über den gesamten Zeitraum der LPS-Stimulation erhalten.

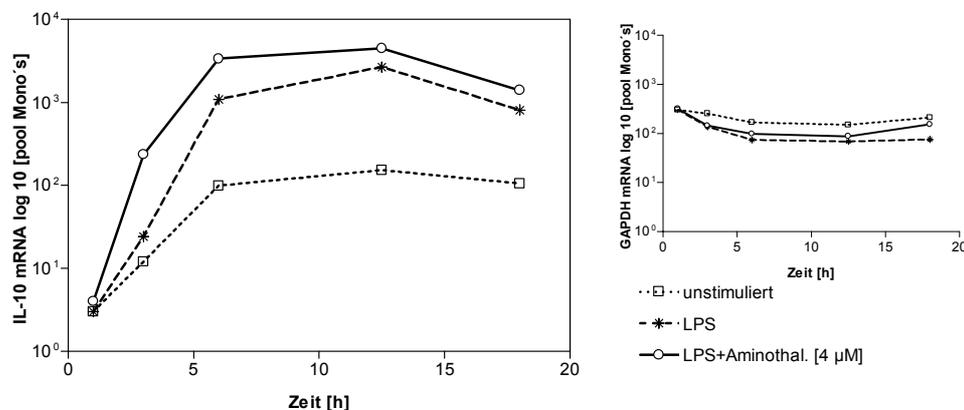


Abb. 34: IL-10-mRNA-Menge unter Einwirkung von Aminothalidomid [4 µM] in LPS-stimulierten CD14⁺-Monozyten

Dargestellt ist die IL-10-mRNA-Menge, welche von CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 2) über den Zeitraum von 18 h nach LPS-Stimulation in An- bzw. Abwesenheit von Aminothalidomid [4 µM] und im Vergleich zu unstimulierten CD-14⁺-Monozyten detektiert wurde.

2.2.2.2 Untersuchungen im ELISpot

Die Zytokinbildung aller Zellen in Gegenwart von Aminothalidomid wurde mittels ELISA und RT-PCR in Kap. 2.2.1 untersucht. Die Untersuchung der Zytokinbildung im ELISpot sollte die Frage beantworten, ob Aminothalidomid die Veränderung der sezernierten Proteinmenge durch (a) eine Veränderung der Anzahl der sezernierenden Zellen und/oder (b) durch eine Veränderung der sezernierten Menge einer einzelnen Zelle bewirkt. Um einen optimalen Vergleich der Substanzgruppen zu gewährleisten, wurden für die Untersuchungen im ELISpot verschiedene Zellzahlen eingesetzt. Der IL-12p40-Erst-Antikörper, welcher im ELISpot eingesetzt wurde, war in der Lage sowohl die IL-12p40-Untereinheit als auch das biologisch aktive IL-12p70 zu detektieren (Kap. 5.5.1).

Wie die Abb. 35 zeigt, war der Einsatz von 1×10^3 Z/well optimal, um die Substanzwirkungen auf die Zytokinbildung von IL-12 und IL-10 zu vergleichen. Der Einsatz von 1×10^4 Z/well in der ELISpot-Platte eignete sich nicht, da die Spots in Abhängigkeit von der Behandlung (LPS für IL-12 linke Seite, Abb. 35) bei einer zu hohen Sekretion des jeweiligen Zytokins nicht voneinander getrennt werden und damit nicht gezählt werden konnten. In unstimulierten CD14⁺-Monozyten wurde nahezu kein IL-12 und kein IL-10 im ELISpot nachgewiesen.

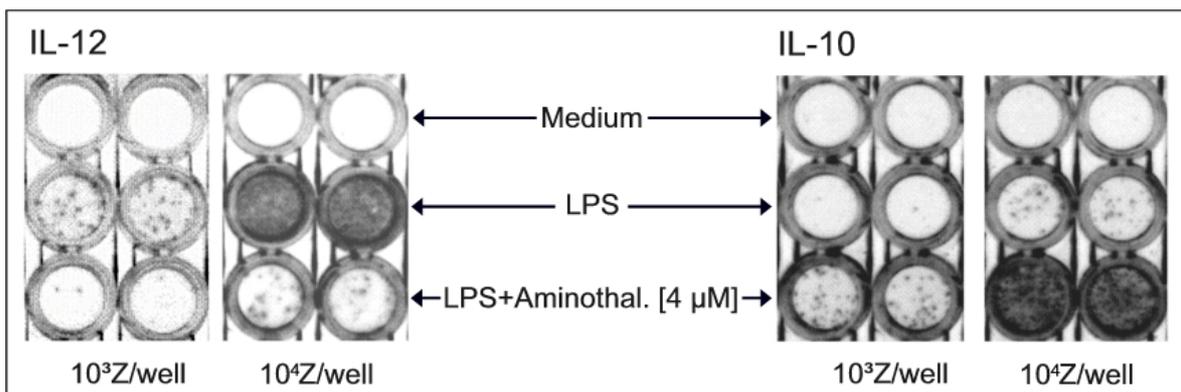


Abb. 35: Beeinflussung der Spotbildung der Zytokine IL-12 und IL-10 unter Wirkung von Aminothalidomid [4 μ M]

Gezeigt ist ein Ausschnitt aus den Kulturplatten mit 1×10^3 Z/well bzw. 1×10^4 Z/well, welche zur ELISpot-Bestimmung eingesetzt wurden. Die linke bzw. rechte Seite zeigt die Spotbildung von IL-12 bzw. IL-10 (von oben nach unten) in unstimulierten CD-14⁺-Monozyten (Medium), LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten in Ab- (Mitte) und Anwesenheit von Aminothalidomid [4 μ M].

Das LPS-induzierte IL-12 wurde durch Aminothalidomid über eine Verringerung der IL-12-sezernierenden Zellen bei eingesetzten 1×10^3 Z/well signifikant um den Faktor 2 reduziert (Tab. 7). Somit konnte gezeigt werden, dass das Aminothalidomid die Verringerung der LPS-induzierten Sekretion von IL-12 bewirkte, indem weniger Zellen LPS-induziertes IL-12 sezernierten. Wie die Abb. 33 zeigt wurde die höhere IL-10-Sekretion bei der Zellzahl 1×10^4 Z/ml sichtbar. Aminothalidomid erhöhte die Anzahl an IL-10-sezernierenden CD-14⁺-Monozyten signifikant (Tab.7).

Tab. 7: ELISpot der Zytokine IL-12 und IL-10 in LPS-stimulierten CD-14⁺Monozyten

Die Tabelle zeigt die Spotbildung von IL-12 bzw. IL-10 in unstimulierten CD-14⁺-Monozyten (Medium), LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten in Ab- (Mitte) und Anwesenheit von Aminothalidomid [4 µM]. Die Angaben in Klammern zeigen den Anteil an IL-12- bzw. IL-10-sezernierenden Zellen an CD-14⁺-Monozyten.

IL-12 Anzahl Spots / 1 x 10 ³ Z ± S.E.M.	Spender 1	Spender 2	Spender 3	MW
Medium	0 ± 0	1 ± 0	3 ± 1	
LPS	29 ± 1 (2,9 %)	38 ± 4 (3,8 %)	73 ± 1 (7,3 %)	4,6 %
LPS + Aminoth.	5 ± 1 (0,5 %)	10 ± 2 (1 %)	4 ± 1 (0,4 %)	1,9 %

IL-10 Anzahl Spots / 1 x 10 ³ Z ± S.E.M.	Spender 1	Spender 2	Spender 3	MW
Medium	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 1	0 %
LPS	36 ± 4 (3,6 %)	52 ± 6 (5,2 %)	19 ± 2 (1,9 %)	5,35 %
LPS + Aminoth.	325 ± 16 (32,5 %)	452 ± 40 (45,2 %)	210 ± 47 (21 %)	32,9 %

* = statistisch signifikant gegenüber LPS-Kontrollgruppe, p < 0,05 mit ANOVA und anschließendem Dunnett's test, Abkürzungen: Aminoth. = Aminothalidomid

2.2.3 Untersuchungen zur IL-12p40-Hemmung durch Aminothalidomid

Aufgrund der bekannten Hemmung der IL-12p40- und TNFα-Bildung durch endogen gebildetes IL-10-Protein, könnte Aminothalidomid die Hemmung von IL-12p40 indirekt, d.h. über die erhöhte IL-10-Proteinmenge (Abb. 28) vermitteln.

In den folgenden Abschnitten wurde daher die Frage, ob Aminothalidomid die Bildung von IL-12p40 direkt oder indirekt hemmt untersucht.

2.2.3.1 In Gegenwart von anti-IL-10-Antikörpern

Wie Abb. 36 zeigt, wurde durch das Neutralisieren des LPS-induzierten IL-10-Proteins, eine Steigerung der LPS-induzierten IL-12p40-Freisetzung (42 %, n=3) im Vergleich zur LPS-stimulierten Kontrollgruppe beobachtet. Hierdurch wurde die hemmende Wirkung von endogenem IL-10-Protein auf LPS-induziertes IL-12-Protein bestätigt⁹⁵. Die neutralisierende Wirkung durch den anti-IL-10-Antikörper (anti-IL-10-Ak) war konzentrationsabhängig (Daten nicht gezeigt). Der Kontroll-Antikörper beeinflusste die IL-12p40-Bildung in CD-14⁺-Monozyten nicht (Abb. 36). Aminothalidomid hemmte die IL-12p40-Sekretion in der Anwesenheit des Kontroll-Antikörpers um 93 % und in Gegenwart des anti-hIL-10-Antikörpers um 90 %.

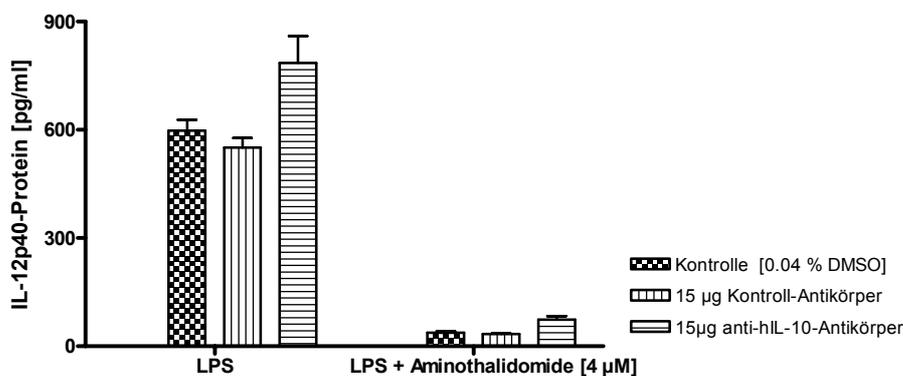


Abb. 36: Wirkung von IL-10-Antikörpern auf die IL-12p40-Proteinbildung in Gegenwart von Aminothalidomid [4 µM]

Die Abbildung zeigt die Menge an IL-12p40-Protein in Gegenwart von Kontroll-Antikörper [15 µg] und anti-IL-10-Antikörper [15 µg] in An- und Abwesenheit von Aminothalidomid [4 µM] nach 24 h LPS-Stimulation (Ansatz 1).

2.2.3.2 In Gegenwart von Suramin

Eine weitere Möglichkeit zur Inaktivierung von endogenem IL-10 besteht in der Verwendung von Suramin (zur Wirkungsweise s. Kap. 2.3). In Abb. 37 ist die LPS-induzierte IL-12p40–Sekretion in Gegenwart von Aminothalidomid und Suramin gezeigt. Die Inaktivierung von endogenem IL-10 durch Suramin führte zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der LPS-induzierten IL-12p40 Freisetzung in CD-14⁺-Monozyten. Die durch Suramin erhöhte IL-12p40–Sekretion wurde durch Aminothalidomid konzentrationsabhängig erniedrigt (Abb. 37).

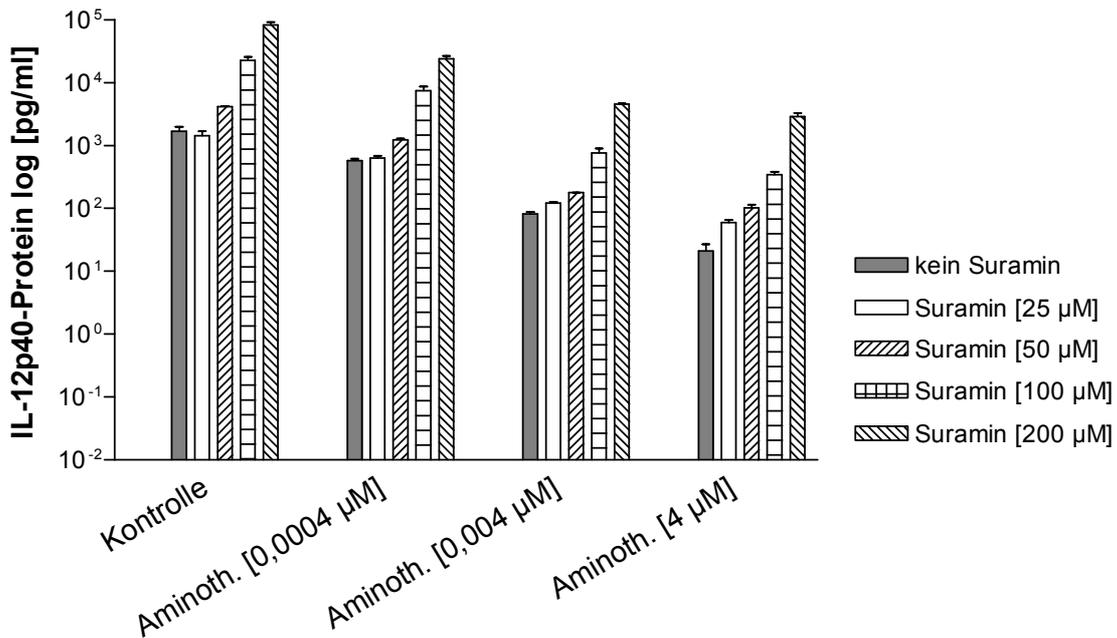


Abb. 37: Wirkung von Suramin auf die Sekretion von LPS-induziertem IL-12p40

Es erfolgte eine Vorinkubation mit Suramin [25 µM – 200 µM] in An- und Abwesenheit von Aminothalidomid [0,0004 µM-4 µM] von 30 min, bevor die CD-14⁺-Monozyten für 24 h mit LPS stimuliert wurden (Ansatz 2). Die Abbildung zeigt die Menge an IL-12p40-Protein in Gegenwart von Suramin und in An- und Abwesenheit von Aminothalidomid.

2.2.4 Beeinflussung der Zytokinbildung in unterschiedlichen Zellpopulationen

Aufgrund der unterschiedlichen Wirkungen von Thalidomid auf die LPS-induzierte Sekretion von TNF α in Abhängigkeit von der untersuchten Zellpopulation, stellte sich die Frage, wie Aminothalidomid die LPS-induzierte Sekretion von TNF α , IL-12p40 und IL-10 beeinflusste^{117,119;121;122}. Daher wurde die Wirkung von Aminothalidomid auf die LPS-induzierte Sekretion der o.g. Zytokine in PBMCs, CD-14⁺-Monozyten und Gesamtblut untersucht (Kap. 5.4.4).

Der Vergleich der LPS-induzierten Bildung von TNF α , IL-12p40 und IL-10 in Abb. 38 zeigt, dass CD-14⁺-Monozyten die größte Menge und, dass PBMCs und Gesamtblut-Proben die gleiche Menge der o.g. Zytokine in den Kulturüberstand sezernierten. Aminothalidomid hemmte die LPS-induzierte Sekretion von TNF α (Abb. 38A) und IL-12p40 (Abb. 38B) in allen drei untersuchten Populationen, wobei die Wirkung von Aminothalidomid in CD-14⁺-Monozyten stärker als in PBMCs bzw. Gesamtblut war. Die Steigerung der IL-10-Proteinmenge wurde nur in CD-14⁺-Monozyten und Gesamtblut-Proben, jedoch nicht in PBMCs und CD-14⁺-negativen PBMCs beobachtet.

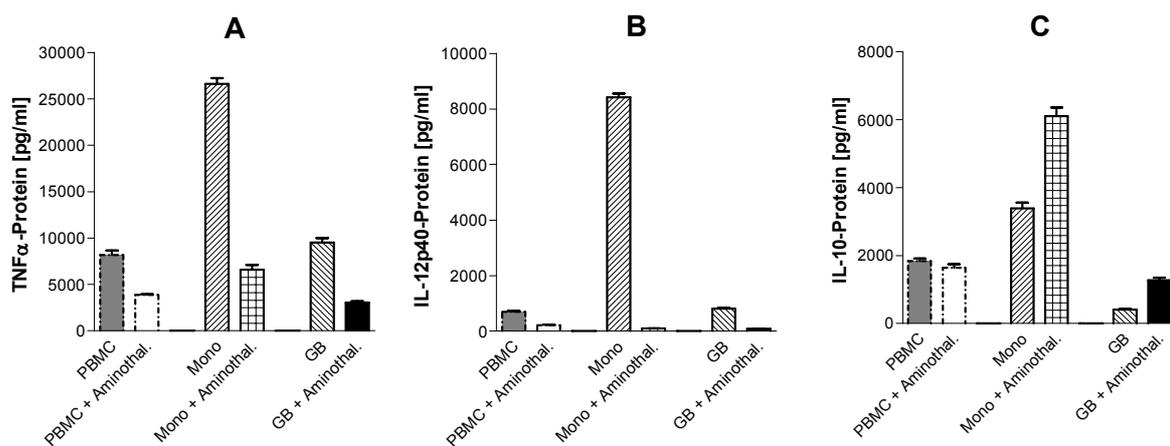


Abb. 38: Einfluss von Aminothalidomid auf die LPS-stimulierte Sekretion von TNF α (A), IL-12p40 (B) und IL-10 (C) in den Kulturüberstand verschiedener Zellpopulationen

Gezeigt ist die TNF α - (A), IL-12p40- (B) und IL-10-Proteinmenge (C) im Kulturüberstand von LPS-stimulierten PBMCs (Ansatz 2), CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 2) und Gesamtblut (Ansatz 6) in An- und Abwesenheit von Aminothalidomid [4 μM] nach 24 h. Zwischen den Proteinmengen im Kulturüberstand von PBMCs und CD-14⁺-Monozyten war ein direkter Vergleich der Zytokinbildung möglich, da diese vom gleichen Spender stammten und mit der gleichen Zellzahl (Ansatz 2) eingesetzt wurden. Abkürzungen: PBMC = peripheral blood mononuclear cells, Mono = CD-14⁺-Monozyten, GB = Gesamtblut

Zusammenfassung der Wirkung von Aminothalidomid:

Thalidomid und Aminothalidomid verringerten die Menge der LPS-induzierten pro-inflammatorischen Zytokine MCP-1, TNF α und IL-1 β im Kulturüberstand von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten. Die TNF α -Bildung wurde durch Aminothalidomid 700-fach stärker als durch Thalidomid gehemmt. Mit dem höheren maximalen Effekt und dem niedrigeren IC₅₀-Wert von Aminothalidomid auf die IL-12p40-Bildung, wurde die höhere Wirkstärke und die stärkere Pharmakologische Potenz von Aminothalidomid im Vergleich zu Thalidomid bestätigt¹¹⁹. Aminothalidomid steigerte die IL-10-Bildung in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten.

Aminothalidomid führte zu einer zeitigeren Bildung von IL-10-Protein und IL-10-mRNA im Vergleich zur LPS-stimulierten Kontrollgruppe. Gleichzeitig verringerte Aminothalidomid die LPS-induzierte Sekretion von TNF α und IL-12p40, durch die Hemmung der jeweiligen mRNA. Die Untersuchungen im ELISpot zeigten, dass Aminothalidomid die Veränderung der sezernierten Proteinmenge durch eine Veränderung der Anzahl an IL-12(p40)- bzw. IL-10-Protein sezernierenden Zellen bewirkte. Aminothalidomid war in der Lage, trotz Neutralisieren des LPS-induzierten, sezernierten IL-10-Proteins (durch anti-IL-10-Antikörper bzw. Suramin) die Freisetzung von IL-12p40 in den Kulturüberstand zu hemmen.

2.3 Die Wirkungen von Suramin nach LPS-Stimulation

2.3.1 Untersuchung im Proteinarray

Die Abb. 39 zeigt die Membran des Proteinarray vom Kulturüberstand LPS-stimulierter CD-14⁺-Monozyten unter Einfluss von 200 μ M Suramin. Die Intensität der einzelnen Spots zeigt die Konzentration der nachgewiesenen Zytokine an (Kap. 5.5.3). Suramin beeinflusste die Zytokinbildung von TNF α , MCP-1, IL-6, IL-8 und IL-1 β nicht, während die IL-10-Proteinmenge durch Suramin verringert wurde (87 % Hemmung).

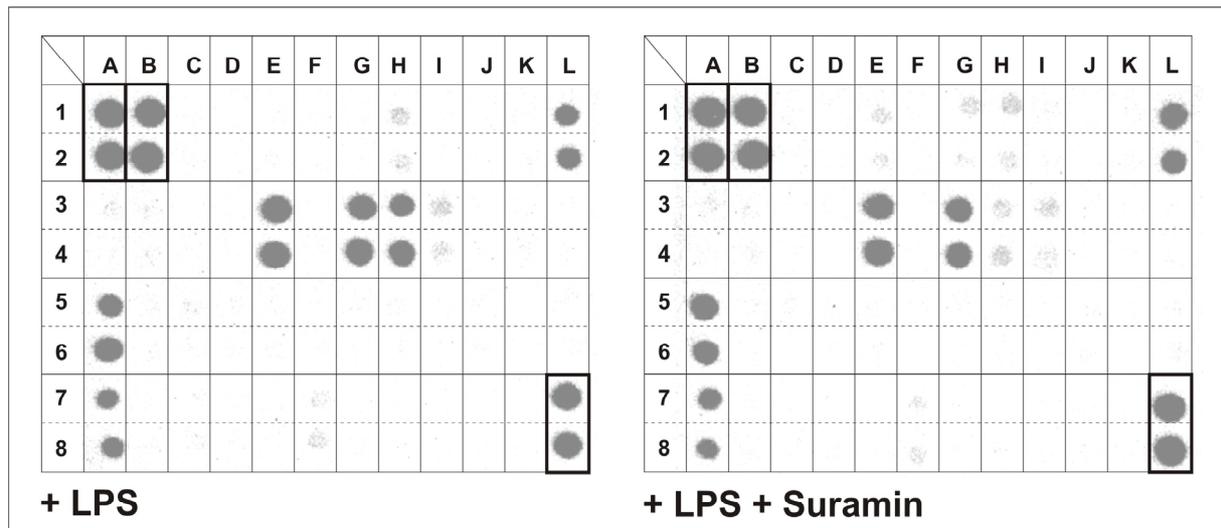


Abb. 39: Wirkung von 200 μ M Suramin auf verschiedene Zytokine im Proteinarray

Dargestellt ist die Membran des Proteinarrays, auf welcher der Kulturüberstand (Ansatz 5) von LPS-stimulierten CD14⁺-Monozyten (links) und von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten unter Wirkung von Suramin [200 μ M] (rechts) analysiert wurde. Die Stärke der Spotintensität wurde relativ zu den 6 Positivkontrollen jeder Membran (eingerahmte Kästchen) bestimmt und entspricht der sezernierten Zytokinmenge. Folgende Proteine wurden mittels Proteinarray (von links nach rechts) nachgewiesen: GRO (H1/2), IL-1 β (L1/2), IL-6 (E3/4), IL-8 (G3/4), IL-10 (H3/4), IL-12p70 (I3/4), MCP-1 (A5/6) und TNF α (A7/8).

2.3.2 Proteinbildung von TNF α , IL-12p40 und IL-10

2.3.2.1 Bildung von TNF α und IL-12p40

2.3.2.1.1 Konzentrationswirkungskurven von Suramin

Zunächst wurde die TNF α - und IL-12p40-Proteinmenge im Kulturüberstand in Gegenwart von Suramin [12,5 μ M–200 μ M] nach 24 h gemessen (Kap. 5.5.1). Wie in Abb. 40A+B zu sehen, bewirkte Suramin eine konzentrationsabhängige Steigerung von TNF α - und IL-12p40-Protein, welche sich bei beiden Proteinen in einem ähnlichen Kurvenverlauf widerspiegelte. Um auszuschließen, dass das Suramin die Erkennung der Proteine TNF α und IL-12p40 beeinflusste, wurde Suramin [12,5 μ M–200 μ M] zum Zeitpunkt der Zellernte (nach 24 h LPS-Stimulation) zu den CD-14⁺-Monozyten gegeben und die Menge an TNF α - und IL-12p40-Protein im Kulturüberstand mittels ELISA detektiert (Abb. 40C-D). Die frische Zugabe von Suramin nach 24 h LPS-Stimulation beeinflusste die Messung des TNF α - und IL-12p40-Proteins nicht (Abb. 40C-D).

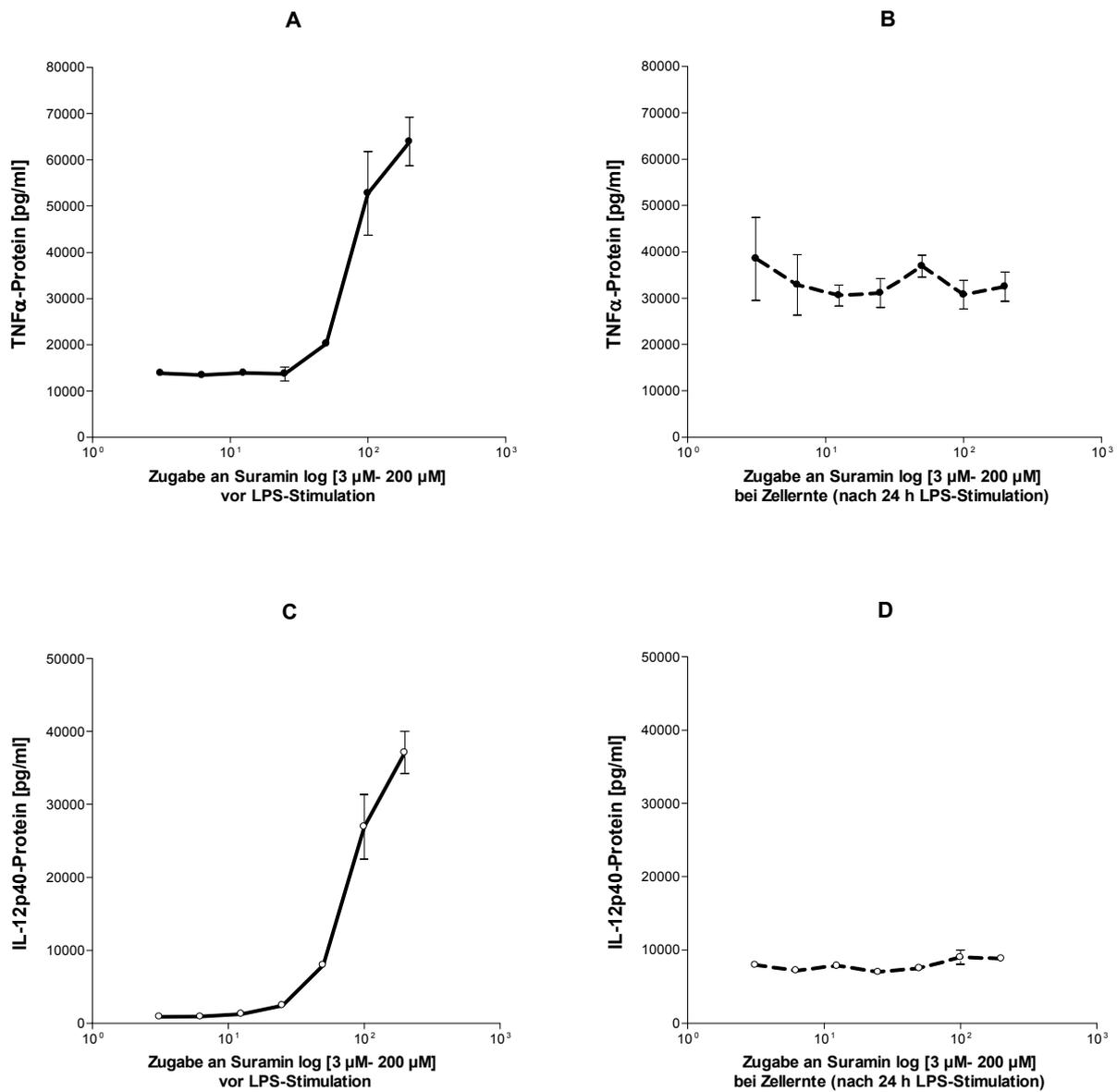


Abb. 40: Wirkung von Suramin auf die TNF α -Proteinmenge vor (A) und 24 nach LPS-Stimulation (B) und die IL-12p40-Proteinmenge vor (C) und 24 nach LPS-Stimulation (D)

Gezeigt ist der Einfluss des Zeitpunktes der Gabe von Suramin zu LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten auf die TNF α - (A) und IL-12p40-Proteinmenge (C) nach 24 h, welche mit dem ELISA der Fa. Biosource im Kulturüberstand von CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 1) in Gegenwart von Suramin [3 μ M –200 μ M] gemessen wurde, wenn dieses vor LPS-Stimulation zu den CD-14⁺-Monozyten gegeben wurde. Die TNF α - (B) und IL-12p40-Proteinmenge (D) wurde ebenfalls mit dem ELISA der Fa. Biosource nach 24 h bestimmt, wenn Suramin [3 μ M – 200 μ M] erst bei Zellernte (nach 24 h LPS-Stimulation) zu den CD-14⁺-Monozyten gegeben wurde.

2.3.2.1.1.1 Kinetik der Bildung von TNF α und IL-12p40 (Protein und mRNA)

Die Bildung der Proteine TNF α (a) und IL-12p40 (b) in Gegenwart von 200 μ M Suramin wurde mittels ELISA (Proteinmessung im Kulturüberstand) und mittels RT-PCR (Messung der mRNA) kinetisch untersucht (Kap. 5.5.1 und Kap. 5.6).

(a) TNF α -Bildung

Wie die Abb. 41 zeigt, verringerte Suramin die TNF α -Proteinmenge gegenüber der LPS-Kontrollgruppe innerhalb der ersten Stunde nach LPS-Stimulation. Erst nach 15 h bzw. 24 h LPS-Stimulation war eine Erhöhung des TNF α -Proteins durch Suramin gegenüber der LPS-Kontrollgruppe zu beobachten. Wie die Abb. 42 darstellt, wurde innerhalb der ersten 8 h nach LPS-Stimulation keine Wirkung von Suramin auf die TNF α -mRNA festgestellt, während nach 15 h bzw. 24 h größere Mengen an TNF α -mRNA als in der entsprechenden LPS-Kontrolle (Faktor 1,8 bzw. 1,6) gemessen wurden. Die durch Suramin erhöhte TNF α -Proteinmenge äußerte sich ebenfalls in einer gesteigerten TNF α -mRNA-Bildung.

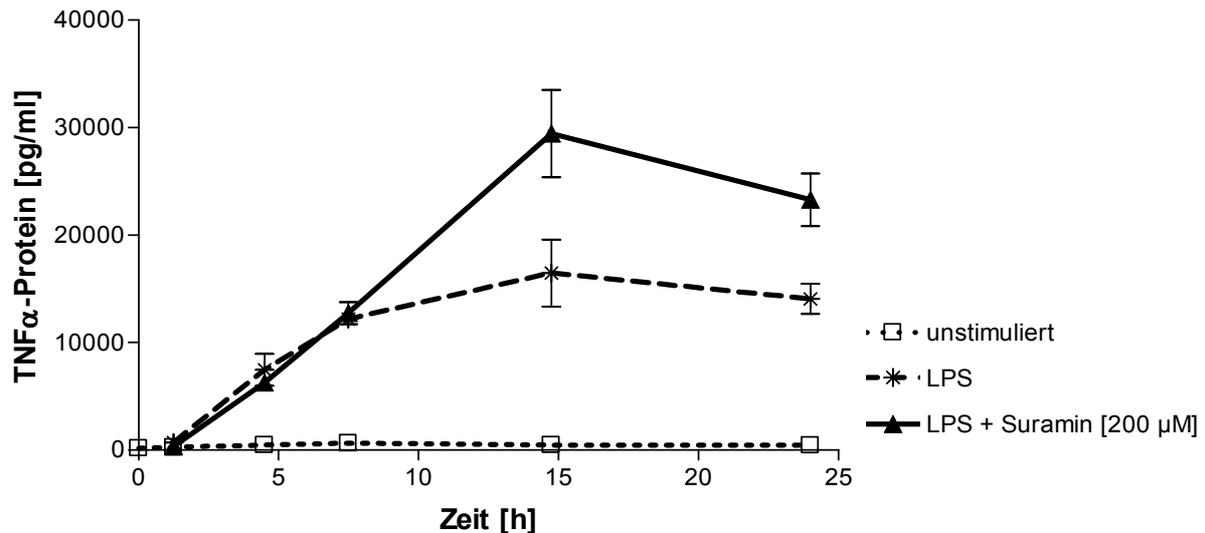


Abb. 41: Kinetik der Sezernierung von TNF α -Protein unter dem Einfluss von 200 μ M Suramin

Dargestellt ist die TNF α -Proteinmenge, welche im Kulturüberstand von CD-14 $^{+}$ -Monozyten (Ansatz 2) über den Zeitraum von 24 h nach LPS-Stimulation in An- bzw. Abwesenheit von Suramin [200 μ M] und in unstimulierten CD-14 $^{+}$ -Monozyten nachgewiesen wurde.

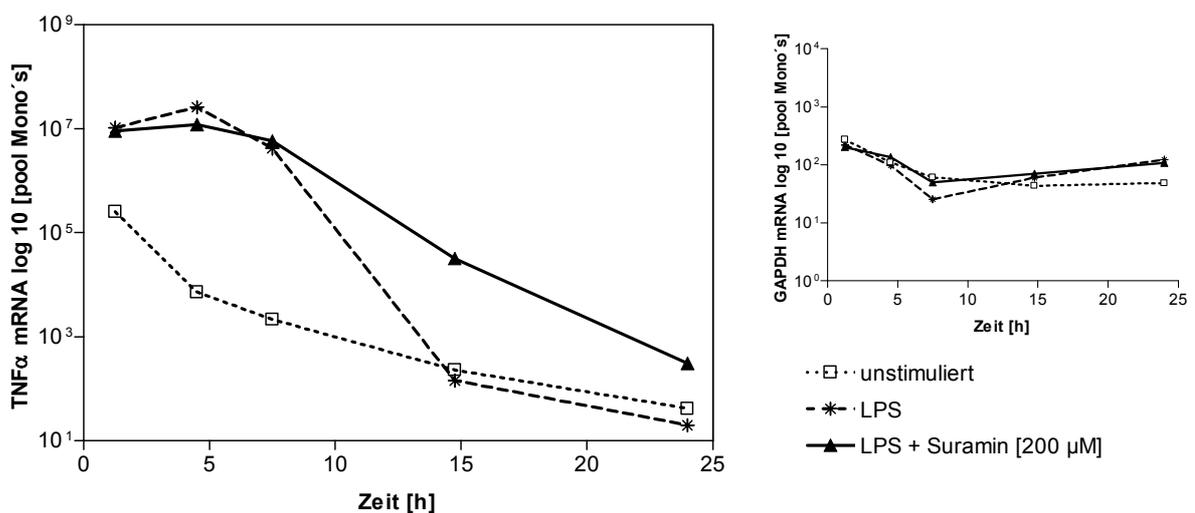


Abb. 42: Kinetik der TNF α -mRNA-Bildung unter dem Einfluss von 200 μ M Suramin

Gezeigt ist die TNF α -mRNA-Menge, welche von CD-14 $^{+}$ -Monozyten (Ansatz 2) über den Zeitraum von 24 h nach LPS-Stimulation in An- bzw. Abwesenheit von Suramin [200 μ M] und im Vergleich zu unstimulierten CD-14 $^{+}$ -Monozyten detektiert wurde.

(b) IL-12p40-Bildung

Nach 8 h LPS-Stimulation war durch 200 μ M Suramin keine Wirkung auf die IL-12p40-Proteinmenge festzustellen und nach 15 h bzw. 24 h war diese um den Faktor 7,7 bzw. 12,8 gegenüber der LPS-Kontrolle erhöht (Abb. 43). Suramin zeigte nach LPS-Stimulation innerhalb der ersten 8 h keine Wirkung auf die Bildung der IL-12p40-mRNA, während nach 15 h die IL-12p40-mRNA durch Suramin gesteigert wurde (Abb. 44).

Die auf Proteinebene beobachtete IL-12p40-Steigerung durch Suramin spiegelte sich damit in der gesteigerten IL-12p40-mRNA-Bildung wider.

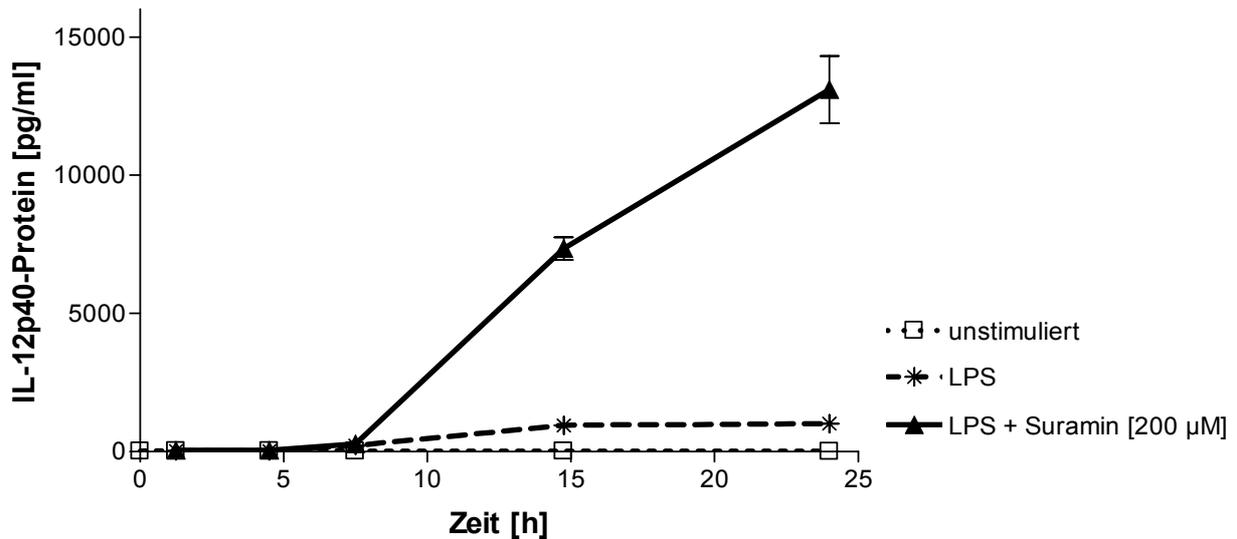


Abb. 43: Kinetik der Sezernierung von IL-12p40-Protein unter dem Einfluss von Suramin

Dargestellt ist die IL-12p40-Proteinmenge, welche im Kulturüberstand von CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 2) über den Zeitraum von 24 h nach LPS-Stimulation in An- bzw. Abwesenheit von Suramin [200 μ M] und in unstimulierten CD-14⁺-Monozyten nachgewiesen wurde.

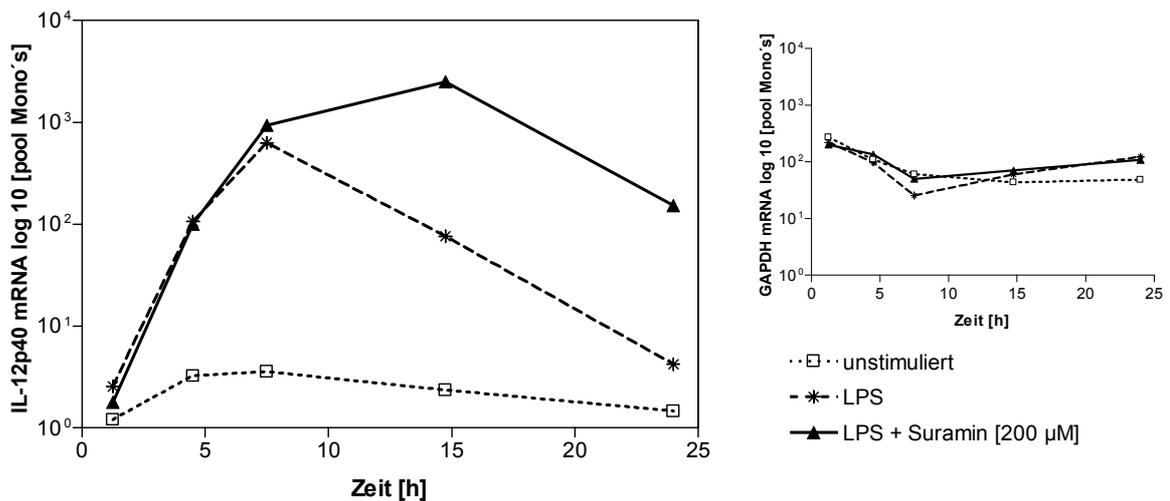


Abb. 44: Kinetik der IL-12p40-mRNA-Bildung unter dem Einfluss von 200 μ M Suramin

Dargestellt ist die IL-12p40-mRNA-Menge, welche von CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 2) über den Zeitraum von 24 h nach LPS-Stimulation in An- bzw. Abwesenheit von Suramin [200 μ M] und im Vergleich zu unstimulierten CD-14⁺-Monozyten detektiert wurde.

2.3.2.1.2 Kinetik der Bildung von IL-10 (Protein und mRNA)

Bisher wurde mit dem Proteinarray (Abb. 39) gezeigt, dass nach 24 h LPS-Stimulation kein IL-10-Protein in Gegenwart von 200 μ M im Kulturüberstand nachweisbar war. Die Wirkung von 200 μ M Suramin wurde im Folgenden kinetisch betrachtet. Weiterhin stellte sich die Frage, ob der fehlende Nachweis des IL-10-Proteins im Proteinarray mit einer verminderten IL-10-mRNA-Bildung erklärt werden konnte. Daher wurde die Menge an IL-10-Protein im Kulturüberstand mittels ELISA (Kap. 5.5.1) und die Menge an IL-10-mRNA mittels RT-PCR (Kap. 5.6) über den Zeitraum von 24 h gemessen.

Die Abb. 45 demonstriert, dass über den beobachteten Zeitraum von 24 h mit dem Biosource-ELISA kein biologisch aktives IL-10-Protein in Gegenwart von 200 μ M Suramin im Kulturüberstand nachgewiesen wurde. Die IL-10-mRNA-Menge in LPS-induzierten CD14⁺-Monozyten wurde hingegen durch Suramin nicht beeinflusst (Abb. 46).

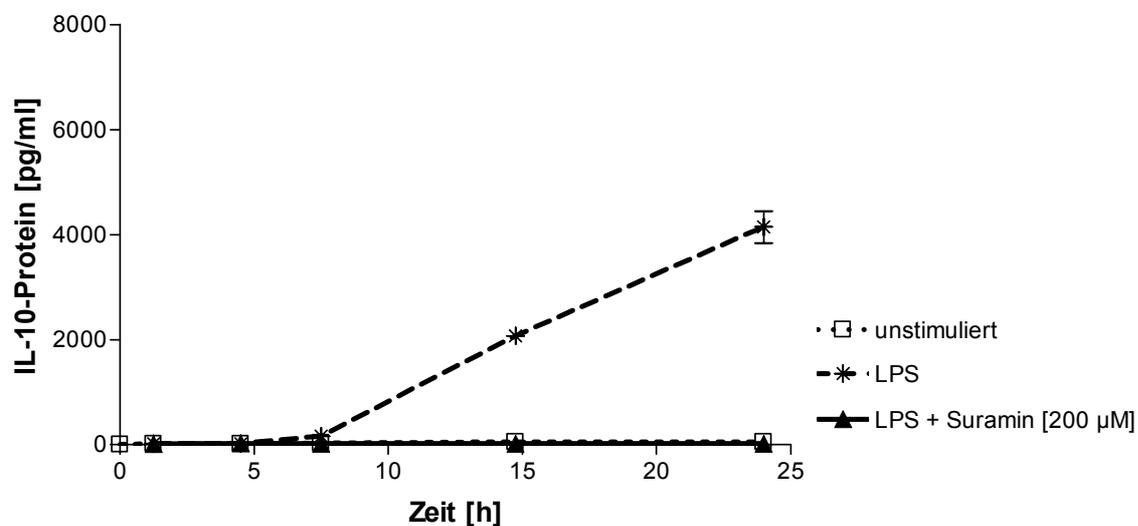


Abb. 45: Kinetik der Sezernierung von IL-10-Protein in den Kulturüberstand unter dem Einfluss von Suramin

Dargestellt ist die IL-10-Proteinmenge, welche im Kulturüberstand von CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 2) über den Zeitraum von 24 h nach LPS-Stimulation in An- bzw. Abwesenheit von Suramin [200 μ M] und in unstimulierten CD-14⁺-Monozyten nachgewiesen wurde.

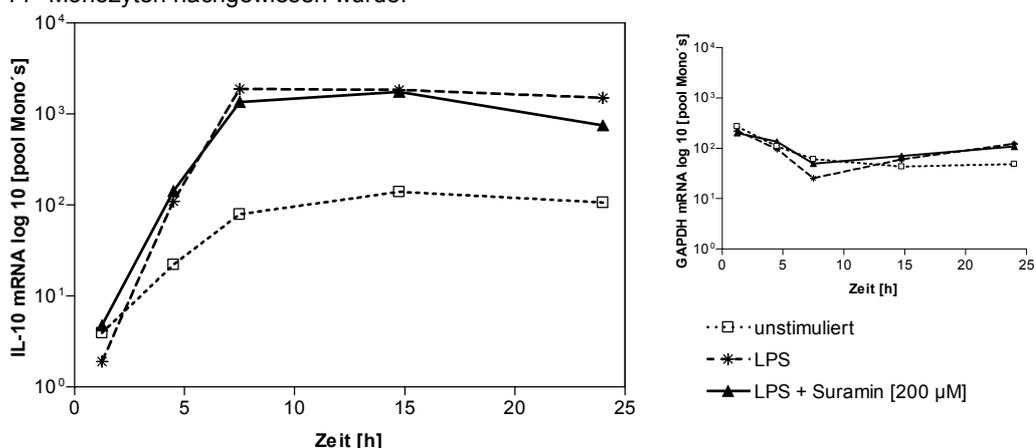


Abb. 46: Kinetik der Bildung der IL-10-mRNA unter dem Einfluss von Suramin

Dargestellt ist die IL-10-mRNA-Menge, welche von CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 2) über den Zeitraum von 24 h nach LPS-Stimulation in An- bzw. Abwesenheit von Suramin [200 μ M] und im Vergleich zu unstimulierten CD-14⁺-Monozyten detektiert wurde.

2.3.2.1.3 Erkennung von LPS-induziertem IL-10-Protein im ELISA

Die Wirkung von Suramin auf die IL-10-Proteinmenge im Kulturüberstand von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten nach 24 h ist in Abb. 47 zu sehen. Wurde das IL-10-Protein mit dem Biosource-ELISA nachgewiesen, bewirkte Suramin eine konzentrationsabhängige Verringerung der IL-10-Proteinmenge (Abb. 47A). Ab 25 µM Suramin war nur 5 % der LPS-induzierten IL-10-Proteinmenge und bei 200 µM kein IL-10-Protein nachweisbar. Hingegen beeinflusste Suramin das mit dem R&D-ELISA gemessene IL-10-Protein nicht (Abb. 47B). Um auszuschliessen, dass das Suramin das in den Kulturüberstand sezernierte IL-10-Protein veränderte, wurde das Suramin nach 24 h LPS-Stimulation, zum Zeitpunkt der Zellernte zu den CD-14⁺-Monozyten gegeben (Abb. 47C+D).

Im Biosource-ELISA wurde eine konzentrationsabhängige Verringerung des nachweisbaren IL-10-Proteins gezeigt, wobei mit 200 µM Suramin 50 % der LPS-induzierten IL-10-Proteinmenge detektierbar war (Abb. 47C). Mit dem R&D-ELISA wurde bei Zugabe von Suramin in unterschiedlichen Konzentrationen bei Zellernte eine gleichbleibende Menge an IL-10-Protein im Kulturüberstand nachgewiesen (Abb. 47D).

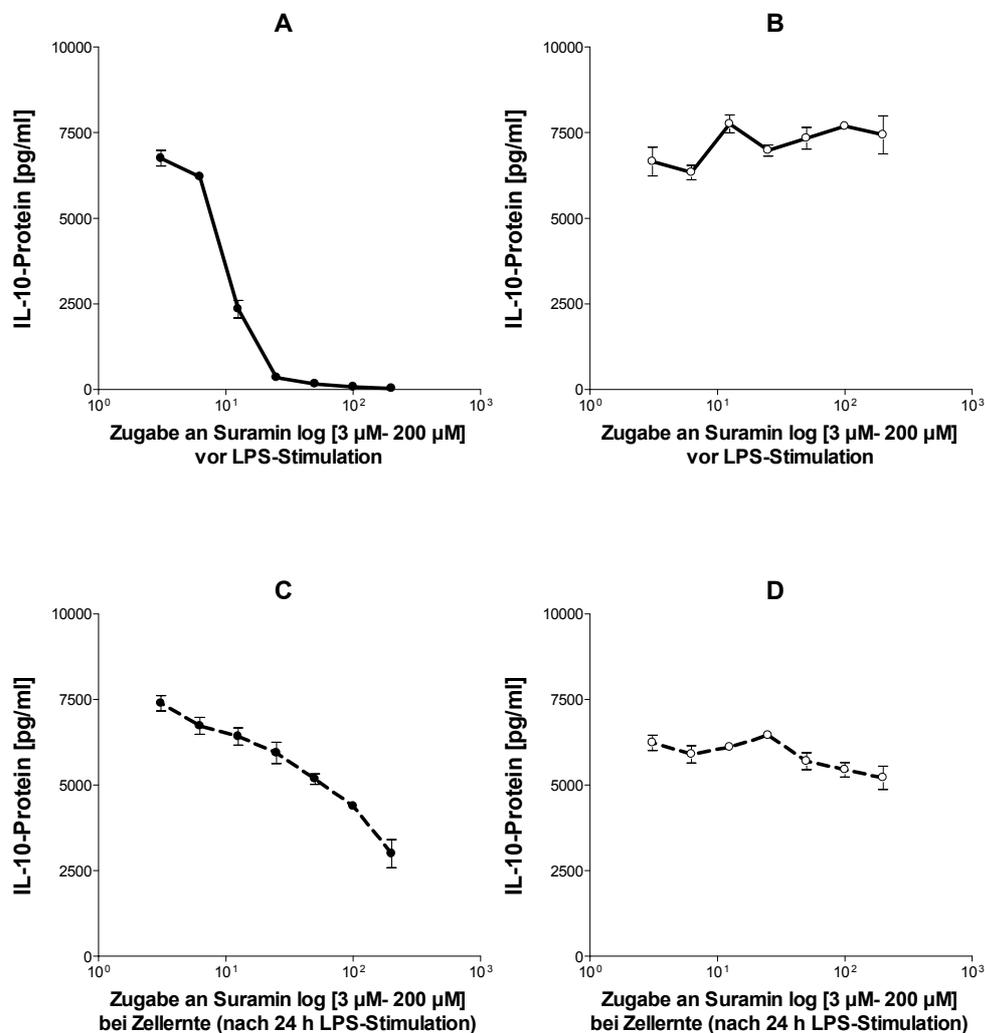


Abb. 47: Der Nachweis von LPS-induziertem IL-10-Protein in Gegenwart von Suramin

Gezeigt ist die IL-10-Proteinmenge nach 24 h, welche mit dem ELISA der Fa. Biosource (A) und ELISA der Fa. R&D (B) im Kulturüberstand von CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 1) in Gegenwart von Suramin [3µM–200 µM] gemessen wurde, wenn dieses vor LPS-Stimulation zu den CD-14⁺-Monozyten gegeben wurde. Die IL-10-Proteinmenge wurde ebenfalls mit dem ELISA der Fa. Biosource (C) und ELISA der Fa. R&D (D) nach 24 h bestimmt, wenn Suramin [3µM–200 µM] erst bei Zellernte (nach 24 h LPS-Stimulation) zu den CD-14⁺-Monozyten gegeben wurde (Fa. Biosource).

2.3.2.2 Messung von biologisch aktivem IL-10-Protein

Es wurde in Kap. 2.1.3.2.2 gezeigt, dass mit dem Biosource-ELISA kein IL-10-Protein detektiert wurde, wenn dieses zuvor thermisch oder chemisch denaturiert wurde, während im R&D-ELISA das IL-10-Protein sowohl in denaturierter als auch nicht denaturierter Form gemessen wurde. Da in Gegenwart von Suramin –genau wie bei Denaturierung des IL-10-Proteins- kein IL-10-Protein im Biosource-ELISA, aber IL-10-Protein im R&D-ELISA gemessen wurde, stellte sich die Frage, ob Suramin IL-10-Protein denaturiert und dadurch inaktiviert.

Biologisch aktives IL-10-Protein hemmt die Neubildung von TNF α - und IL-12p40-Protein⁶⁰. Diese Hemmung sollte in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten durch:

- Neutralisieren des LPS-induzierten, endogen produzierten IL-10-Proteins und
- durch die Zugabe von biologisch aktivem humanem IL-10-Protein gezeigt werden.

Neutralisieren des LPS-induzierten, endogen produzierten IL-10-Proteins

Wird in den Kulturüberstand sezerniertes IL-10-Protein durch IL-10-bindende Antikörper neutralisiert, so sollte die hemmende Wirkung von IL-10-Protein auf die Neubildung von TNF α - und IL-12p40-Protein aufgehoben werden und eine erhöhte Menge an den beiden Zytokinen im Kulturüberstand nachweisbar werden. Wie Abb. 48 zeigt, war die TNF α - und IL-12p40-Proteinmenge im Kulturüberstand der CD-14⁺-Monozyten mit zunehmender Konzentration von IL-10-bindenden Antikörpern erhöht.

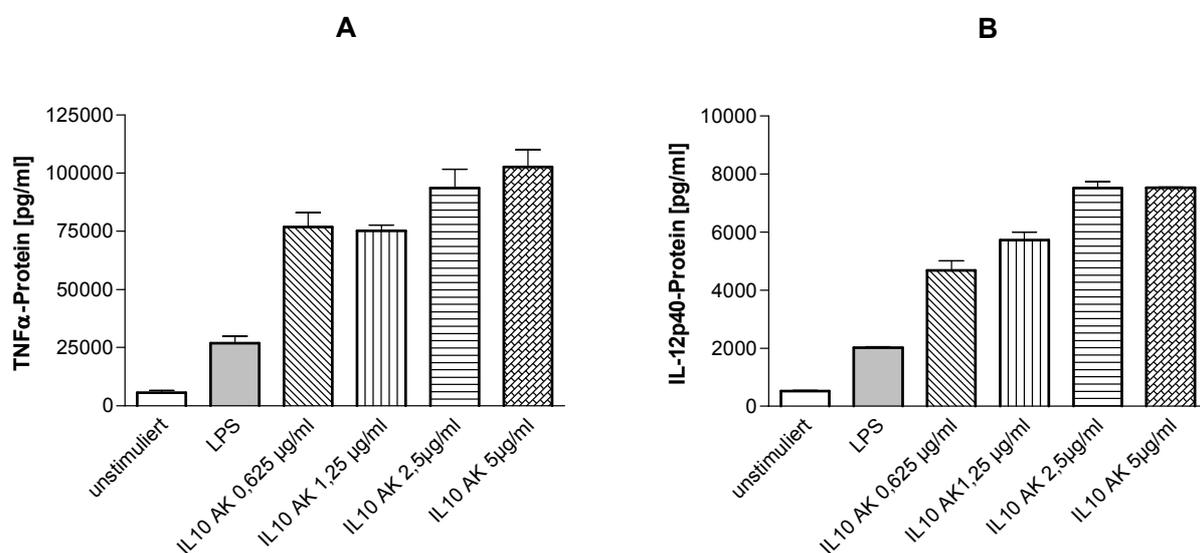


Abb. 48: Nachweis von TNF α - (A) und IL-12p40-Protein (B) im Kulturüberstand in Gegenwart von neutralisierendem IL-10-Antikörper

Gezeigt ist die konzentrationsabhängige Wirkung von neutralisierenden IL-10-Antikörpern [0,625µg/ml- 5 µg/ml] auf die Sekretion von TNF α - (A) und IL-12p40-Protein in den Kulturüberstand von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 1).

Zugabe von biologisch aktivem humanem IL-10-Protein

CD-14⁺-Monozyten sezernieren nach LPS-Stimulation IL-10 in den Kulturüberstand, wodurch die Neubildung von TNF α - und IL-12p40-Protein gehemmt wird⁶⁰.

Bei einer zusätzlichen Gabe von rhIL-10-Protein wurde daher eine stärkere Hemmung der Neubildung von TNF α - und IL-12p40-Protein erwartet. Die Tab. 8 zeigt, dass durch 0,5 ng/ml rhIL-10-Protein die Bildung beider Zytokine nach 24 h stark verringert wurde, während bei 5 ng/ml rhIL-10 Protein kein TNF α -Protein und kein IL-12p40-Protein detektiert wurde. In Gegenwart von 200 μ M Suramin wurde die TNF α - als auch die IL-12p40-Proteinmenge um ein Vielfaches erhöht (Tab. 8). Diese Steigerung erfolgte unabhängig davon, ob rhIL-10-Protein zugegeben wurde. Allerdings wurde die, durch 5 ng/ml rhIL-10 Protein hemmende Wirkung der TNF α - und IL-12p40-Proteinbildung durch Suramin nicht vollständig entgegengewirkt, da noch TNF α - und IL-12p40-Protein nachgewiesen wurden.

Tab. 8: Nachweis von TNF α - und IL-12p40-Protein im Kulturüberstand nach Zugabe von rhIL-10-Protein

Zum Zeitpunkt der LPS-Stimulation wurde rhIL-10 Protein [0,5 ng/ml, 5 ng/ml] zu den CD-14⁺-Monozyten gegeben. Die TNF α - und IL-12p40-Proteinmenge, welche nach 24 h (Ansatz 1) in An- und Abwesenheit von Suramin [200 μ M] im Kulturüberstand gemessen wurde, ist zusammengefasst.

	TNFα-Proteinmenge gemessen [pg/ml]	
	LPS	LPS + Suramin [200 μ M]
keine Zugabe	31674 \pm 2025	76407 \pm 855
Zugabe von 0,5 ng/ml rhIL-10-Protein	4951 \pm 265	70364 \pm 3317
Zugabe von 5 ng/ml rhIL-10-Protein	1355 \pm 81	26425 \pm 1602

	IL-12p40-Proteinmenge gemessen [pg/ml]	
	LPS	LPS + Suramin [200 μ M]
keine Zugabe	7556 \pm 237	20468 \pm 747
Zugabe von 0,5 ng/ml rhIL-10-Protein	165 \pm 32	20635 \pm 1666
Zugabe von 5 ng/ml rhIL-10-Protein	69 \pm 9	7840 \pm 286

Die Hemmung der LPS-induzierten IL-12p40-Bildung durch exogenes IL-10 wurde mit einer zweiten Methode, dem ELISpot untersucht (Kap. 5.5.2). Die Abb. 49, links 2. Reihe demonstriert, dass durch eine Steigerung der Zellzahl von 10³Z/well auf 10⁴Z/well eine erhöhte Anzahl an Spots und damit eine gesteigerte IL-12p40-Sekretion sichtbar wurde. Suramin steigerte die Menge an IL-12p40-Protein (Abb. 49, links 3. Reihe). Durch die Zugabe von 5 ng/ml exogenem IL-10-Protein war die LPS-induzierte IL-12p40 Bildung in beiden Zellzahlen im ELISpot nicht mehr nachweisbar (Abb. 49, rechts 2. Reihe). In den LPS-stimulierten CD14⁺-Monozyten wurde in Gegenwart von Suramin durch die Zugabe von exogenem IL-10-Protein die IL-12p40-Sekretion nicht verringert (Abb. 49, rechts 3. Reihe).

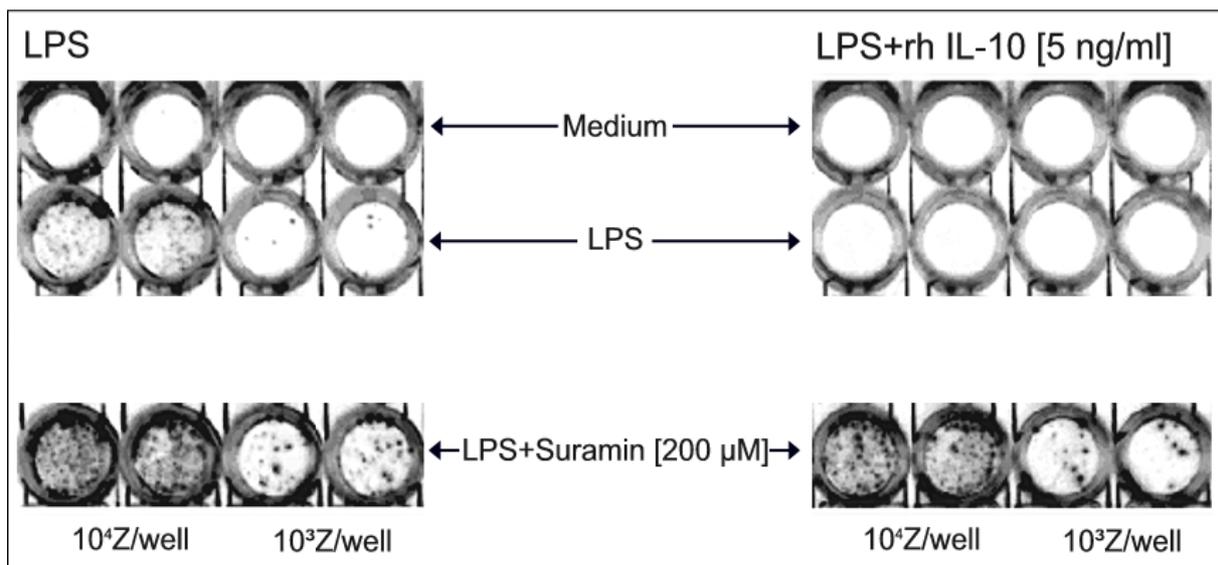


Abb. 49: Beeinflussung der Spotbildung von IL-12 unter Wirkung von Suramin [200 µM]

Dargestellt ist ein Ausschnitt aus den Kulturplatten mit 1×10^3 Z/well bzw. 1×10^4 Z/well, welche zur ELISpot-Bestimmung eingesetzt wurden. Die linke bzw. rechte Seite zeigt die Spotbildung von IL-12 in Ab- bzw. Anwesenheit von rhIL-10-Protein (von oben nach unten) in unstimulierten CD-14⁺-Monozyten (Medium), LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten in Anwesenheit von Suramin [200 µM].

Ein zweiter Ansatz zur Klärung der direkten oder IL-10 vermittelten Wirkung von Suramin, bestand darin, dass Suramin in regelmäßigen Abständen nach erfolgter LPS-Stimulation zu den CD14⁺-Monozyten gegeben und die IL-12p40-Proteinmenge gemessen wurde (Kap. 5.5.1). Hierbei wurde unter der Annahme der Inaktivierung von IL-10-Protein durch Suramin und der daraus resultierenden fehlenden Hemmung von endogenem IL-10-Protein auf die IL-12p40-Proteinbildung (IL-10 vermittelte Wirkung), eine Steigerung der IL-12p40-Bildung durch Suramin erwartet. Die IL-12p40-steigernde Wirkung von Suramin, sollte daher bei sofortiger Gabe größer als bei Gabe zu einem späteren Zeitpunkt nach LPS-Stimulation sein. In Tab. 9 ist gezeigt, dass je später Suramin mit den LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten inkubiert wurde, umso geringer war die IL-12p40-Proteinbildung.

Tab. 9: Einfluss des Zeitpunktes der Gabe von Suramin auf die Sezernierung von IL-12p40-Protein in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten

Zu verschiedenen Zeiten nach der LPS-Stimulation wurde Suramin [200 µM] zu den CD-14⁺-Monozyten gegeben. Die IL-12p40-Proteinmenge, welche nach 24 h (Ansatz 1) im Kulturüberstand gemessen wurde, ist gezeigt.

Zugabe von Suramin	LPS	LPS + Suramin [200µM]	Steigerung der IL-12p40-Bildung durch Suramin
sofort bei LPS-Stimulation	2383 ± 15	32239 ± 570	Faktor 13,5
1 h nach LPS-Stimulation	1639 ± 83	12226 ± 244	Faktor 7,5
2 h nach LPS-Stimulation	1026 ± 24	8232 ± 616	Faktor 8,0
3 h nach LPS-Stimulation	1575 ± 96	3899 ± 270	Faktor 2,5
4 h nach LPS-Stimulation	1398 ± 255	3468 ± 397	Faktor 2,5
6 h nach LPS-Stimulation	1638 ± 83	3200 ± 272	Faktor 2,0
7 h nach LPS-Stimulation	1690 ± 185	2884 ± 180	Faktor 1,7
8 h nach LPS-Stimulation	831 ± 92	1435 ± 159	Faktor 1,7
9 h nach LPS-Stimulation	960 ± 96	840 ± 112	Faktor 0,9
10 h nach LPS-Stimulation	1301 ± 98	675 ± 50	Faktor 0,5

Zusammenfassung der Wirkung von Suramin:

Die kinetischen Untersuchungen zur Wirkung von Suramin auf die TNF α - bzw. IL-12p40-Bildung zeigten nach 15 h LPS-Stimulation eine erhöhte TNF α - bzw. IL-12p40-Bildung auf Protein- und mRNA-Ebene. Die übereinstimmende Wirkung von Suramin auf Protein- und mRNA-Ebene beider Zytokine sowie die fehlende Beeinflussung der bereits gebildeten Menge an TNF α - bzw. IL-12p40-Protein zeigten, dass es sich bei der Wirkung von Suramin nicht um eine fehlerhafte Erkennung von IL-12p40- bzw. TNF α -Protein im ELISA handelte. Suramin verursachte eine Erhöhung beider Zytokine, welche sich auf die Inaktivierung des IL-10-Proteins durch Suramin und der hieraus resultierenden fehlenden Feedback-Hemmung zurückführen lässt. Die Inaktivierung von biologisch aktivem IL-10-Protein erfolgte unabhängig davon, ob rhIL-10-Protein exogen gegeben oder endogen von den LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten in den Kulturüberstand sezerniert wurden. Nur mit dem ELISA der Fa. Biosource und nicht mit dem R&D-ELISA wurde eine verringerte konzentrationsabhängige IL-10-Proteinmenge im Kulturüberstand in Gegenwart von Suramin gemessen, und zwar unabhängig davon, zu welchem Zeitpunkt das Suramin zu den CD-14⁺-Monozyten gegeben wurde.

2.4 Die Wirkungen von Aminothalidomid und Suramin nach TNF α -Stimulation

Die LPS-Induktion beinhaltet die zeitlich nachgeschaltete, durch endogenes TNF α -Protein hervorgerufene Induktion weiterer Zytokine⁵⁹. Sollte TNF α die IL-10-Bildung in CD-14⁺-Monozyten induzieren, könnte man die in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten nachgeschaltete TNF α -Induktion getrennt vom LPS-TLR4-Signalweg untersuchen. Dafür wurden CD-14⁺-Monozyten mit rhTNF α -Protein stimuliert und die Wirkung von Aminothalidomid und Suramin auf die IL-12p40- und IL-10-Bildung untersucht.

Wie Abb. 50A demonstriert, wurde in Gegenwart von rhTNF α -Protein die gleiche **IL-12p40-Proteinmenge** nach LPS-Stimulation wie bei unstimulierten CD-14⁺-Monozyten nachgewiesen. Dennoch war Aminothalidomid in der Lage, die IL-12p40-Sekretion in TNF α -stimulierten CD-14⁺-Monozyten um 95 % gegenüber der LPS-Kontrollgruppe zu hemmen. Suramin bewirkte eine 200 %ige Steigerung der TNF α -induzierten IL-12p40-Proteinmenge. Die Stimulation mit rhTNF α -Protein führte zu einer 6-fach höheren **IL-10-Proteinmenge** als im Kulturüberstand von unstimulierten CD-14⁺-Monozyten (Abb. 50B). Die TNF α -induzierte IL-10-Sekretion wurde durch Aminothalidomid um 188 % gesteigert, während in Gegenwart von Suramin kein biologisch aktives IL-10-Protein detektierbar war.

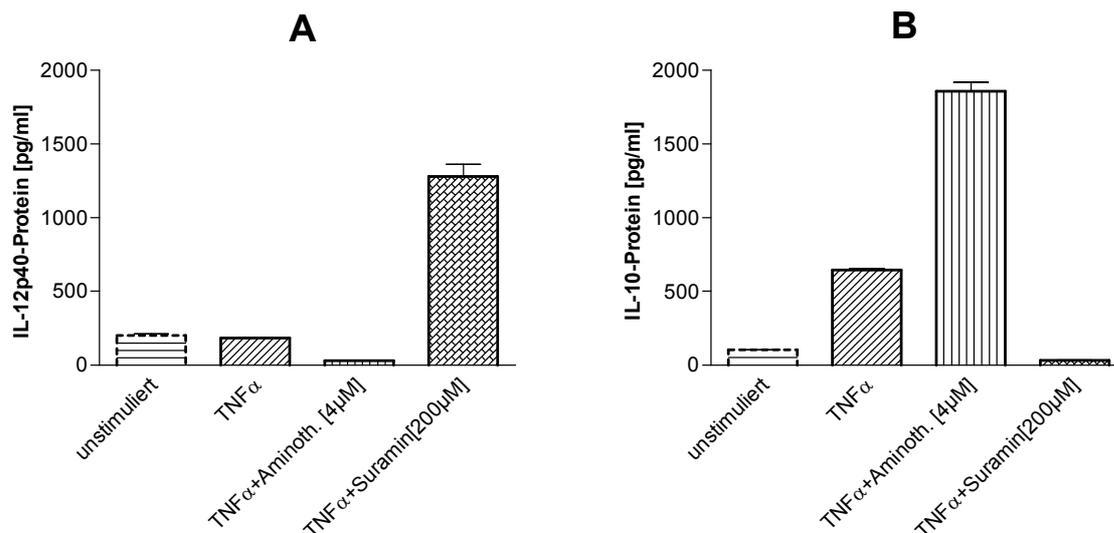


Abb. 50: Wirkung von Aminothalidomid und Suramin auf die TNF α -induzierte IL-12p40- (A) und IL-10-Proteinmenge (B) im Kulturüberstand von CD-14⁺-Monozyten

Dargestellt sind die IL-12p40- (A) und IL-10-Proteinmenge (B) im Kulturüberstand von CD-14⁺-Monozyten nach 18 h Stimulation mit rhTNF α -Protein (Ansatz 2) in An- und Abwesenheit von Aminothalidomid [4 μ M] oder Suramin [200 μ M].

Zusammenfassung:

Die Menge an IL-12p40-Protein nach TNF α -Stimulation wurde durch Aminothalidomid reduziert und durch Suramin gesteigert, während in Gegenwart von Aminothalidomid eine verstärkte IL-10-Proteinmenge im Kulturüberstand und in Anwesenheit von Suramin kein IL-10-Protein gemessen wurde. Die Wirkungen von Aminothalidomid und Suramin auf die Bildung der Zytokine IL-12p40 und TNF α unterschieden sich bei Stimulation mit rhTNF α -Protein nicht von den Wirkungen bei LPS-Stimulation.

2.5 Die Beeinflussung der MAPK

LPS stimuliert CD-14⁺-Monozyten über den TLR4-Signalweg und führt u.a. zur Aktivierung der MAPK¹¹. Mit dem Einsatz von pharmakologischen Inhibitoren kann die Rolle von beispielweise Kinasen in der Signalweiterleitung, welche zur Bildung der Zytokine TNF α , IL-12p40 und IL-10 in CD-14⁺-Monozyten beitragen, untersucht werden^{19;164}. Durch die kombinierte Gabe jeweils eines Inhibitors mit Aminothalidomid oder Suramin sollte eine mögliche Beeinflussung der Kinasen und damit der entsprechenden Signalwege charakterisiert werden.

2.5.1 Wirkung von MAPK-Inhibitoren

Zunächst wurde die konzentrationsabhängige Wirkung von Inhibitoren der JNK, der ERK1/2 und der p38-MAPK auf die LPS-induzierte Freisetzung von TNF α -, IL-12p40- und IL-10-Protein in CD-14⁺-Monozyten untersucht (Kap. 5.5.1).

2.5.1.1 Wirkung des JNK-Inhibitors SP600125

Die JNK-Kinase wird durch den spezifischen Inhibitor SP600125 gehemmt¹⁶⁵. In eigenen Versuchen erfolgte ab 8 μ M SP600125 ein konzentrationsabhängiger „Kristallisierungsprozess der Substanz“, welcher im Mikroskop anhand kleiner Nadeln sichtbar wurde (Vergrößerung 1x40, Daten nicht gezeigt). Diese Nadeln wurden auch von Bennett et al. beschrieben, welche durch eine zusätzliche Erhöhung des Lösungsmittels DMSO die Kristallbildung der Substanz SP600125 verhinderten¹⁶⁵. Wie in Tab. 10 gezeigt, beeinflusste DMSO jedoch die gemessene Proteinmenge aller drei Zytokine, sodass aufgrund dieser beobachteten Eigenwirkung die Konzentration von DMSO nicht erhöht wurde.

Tab. 10: Wirkung von DMSO nach 18 h auf die Menge an TNF α -, IL-12p40- und IL-10-Protein im Kulturüberstand von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten.

	TNF α -Protein [%]	IL-12p40-Protein [%]	IL-10-Protein [%]
DMSO [0,04 %]	- 40	+ 159	- 39

Die Abb. 51 zeigt die Wirkung des JNK-Inhibitors SP600125 auf die Sekretion von TNF α -, IL-12p40 oder IL-10 in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten. Im Konzentrationsbereich 0,0001 μ M-0,93 μ M beeinflusste SP600125 Proteinmenge aller drei oben genannten Zytokine nicht. Ab einer Konzentration von 0,93 μ M wurde die TNF α - und IL-10-Proteinmenge im Kulturüberstand konzentrationsabhängig signifikant verringert, während die IL-12p40-Bildung leicht gesteigert wurde (nicht signifikant).

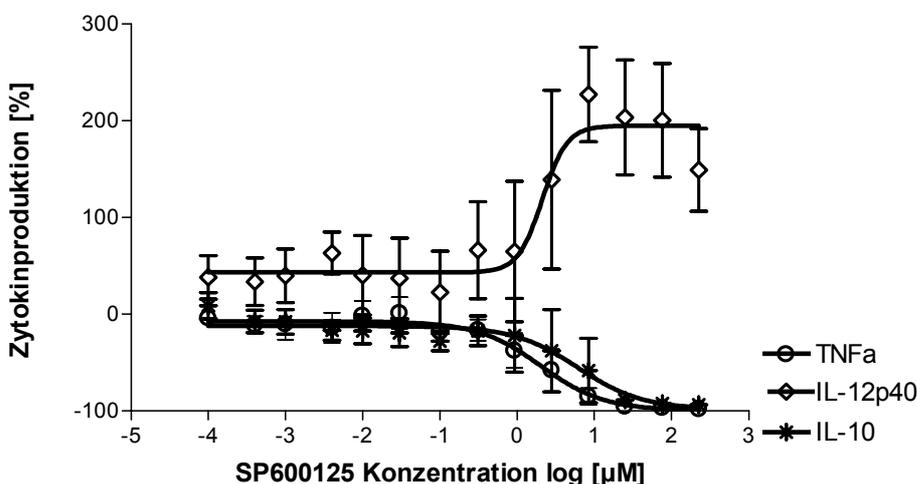


Abb. 51: Wirkung von SP600125 auf die TNF α -, IL-12p40- und IL-10-Protein-Bildung

Die Wirkung von SP600125 [0,0001 μ M–227 μ M] auf die Sekretion von TNF α -, IL-12p40- und IL-10-Protein in CD-14⁺-Monozyten nach 24 h (Ansatz 1) ist dargestellt. Die hemmende Wirkung des JNK-Inhibitors auf die TNF α - und IL-10-Bildung war im Gegensatz zur Wirkung auf die IL-12p40-Bildung statistisch signifikant (beide $p < 0,01$).

2.5.1.2 Wirkung des ERK1/2-Inhibitors PD98059

Die Substanz PD98059 verhindert die Aktivierung der ERK1/2^{166;167}. Wie die Abb. 52 zeigt, wurde die Bildung aller drei Zytokine bis 1 nM PD98059 nicht beeinflusst. Ab einer Konzentration von 0,004 μ M bis 10 μ M PD98059 dezimierte der Inhibitor die LPS-induzierte Menge an TNF α -Protein signifikant und veränderte die IL-12p40-Proteinmenge nicht, während die IL-10-Proteinmenge leicht erhöht wurde.

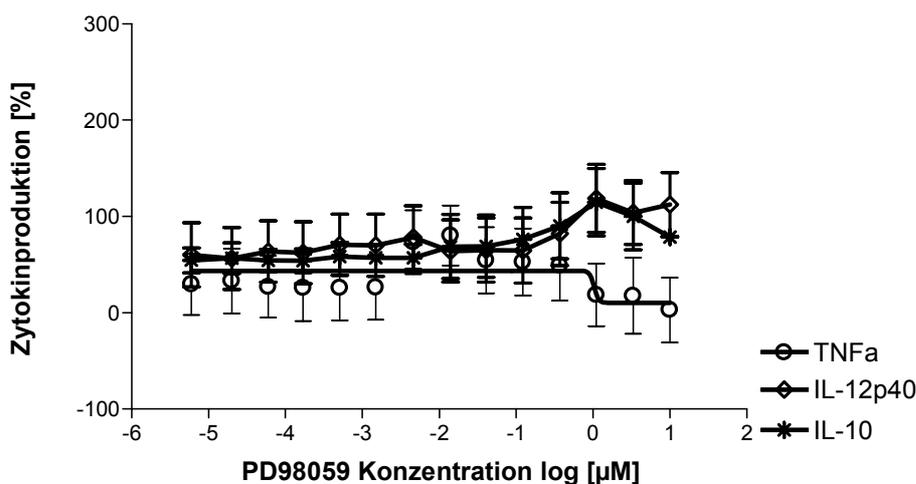


Abb. 52: Wirkung von PD98059 auf die TNF α -, IL-12p40- und IL-10-Protein-Bildung

Die Wirkung von PD98059 [0,006 nM–10 μ M] auf die Sekretion von TNF α -, IL-12p40- und IL-10-Protein in CD-14⁺-Monozyten nach 24 h (Ansatz 1) ist dargestellt. Die Wirkung des MEK1/2-Inhibitors auf die TNF α und IL-10-Bildung war im Gegensatz zur Wirkung auf die IL-12p40-Bildung statistisch signifikant (beide $p < 0,05$).

2.5.1.3 Wirkung des p38-MAPK-Inhibitors SB203580

Die Aktivität der p38 α -MAPK kann durch den p38-MAPK-Inhibitor SB203580 gehemmt werden¹⁶⁴. Aus Abb. 53 wird ersichtlich, dass bei Konzentrationen < 0,125 μ M SB203580 die LPS-induzierte Sekretion der Zytokine TNF α , IL-12p40 und IL-10 nicht beeinflusst wurde. Der Inhibitor SB203580 verringerte in den Konzentrationen 0,125 μ M / 0,25 μ M bis 4 μ M die TNF α - und IL-10-Proteinmenge im Kulturüberstand konzentrationsabhängig. Die LPS-induzierte Freisetzung von IL-12p40-Protein war durch SB203580 in allen Konzentrationen < 0,5 μ M leicht gesteigert. In Konzentrationen von 0,1 μ M bis 4 μ M wurde eine konzentrationsabhängige Erhöhung der IL-12p40-Proteinmenge im Kulturüberstand nachgewiesen.

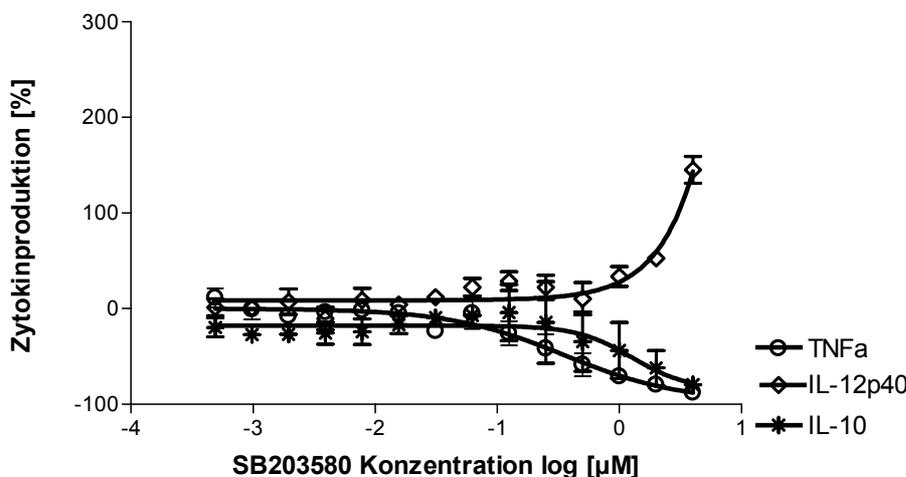


Abb. 53: Wirkung von SB203580 auf die TNF α , IL-12p40- und IL-10-Protein-Bildung

Die Wirkung von SB203580 [0,0005 μ M–4 μ M] auf die Sekretion von TNF α -, IL-12p40- und IL-10-Protein in CD-14⁺-Monozyten nach 24 h (Ansatz 1) ist dargestellt. Die Wirkung des p38-MAPK-Inhibitors auf die TNF α -, IL-10-, und IL-12p40-Bildung war statistisch signifikant (alle $p < 0,05$).

2.5.1.4 Wirkungen der MAPK-Inhibitoren, Aminothalidomid und Suramin

Die Inhibitoren der ERK1/2 und p38-MAPK wurden im nächsten Schritt in Konzentrationen eingesetzt, welche für eine spezifische Hemmung der entsprechenden MAPK empfohlen wurde^{19;164}. Davies et al. empfiehlt zur Untersuchung des ERK1/2-Signalweges sowohl den MEK1/2-Inhibitor UO126 als auch PD98059 einzusetzen, um das Risiko der Beobachtung von unspezifischen Wirkungen zu minimieren¹⁹. Zusätzlich wurde eine inaktive Negativkontrolle SB202474 eingesetzt, um spezifische Wirkungen der Hemmung der p38-MAPK durch den aktiven Inhibitor SB203580 von unspezifischen Wirkungen der Substanzklasse zu unterscheiden¹⁶⁴. Die Abb. 54 zeigt die Wirkung von MAPK-Inhibitoren, Aminothalidomid und Suramin auf die TNF α -, IL-12p40- und IL-10-Proteinmenge im Kulturüberstand von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten. Die Inhibitoren der MEK1/2 PD98059 und UO126 verringerten die Produktion des TNF α - (Abb. 54A) und IL-12p40-Proteins (Abb. 54B), wobei die hemmende Wirkung auf IL-12p40 nur geringfügig größer als die Wirkung der inaktiven p38-Inhibitor-Negativkontrolle SB202474 war.

Die IL-10-Bildung wurde durch PD90850 und UO126 nicht beeinflusst (Abb. 54C). Im Kulturüberstand wurde die nachweisbare sezernierte TNF α -Proteinmenge durch den p38-Inhibitor SB203580 in gleichen Größenordnungen wie durch Aminothalidomid reduziert (Abb. 54A). Die inaktive p38-Inhibitor-Negativkontrolle SB202474 führte zu einer verringerten Menge an TNF α -, IL-12p40- und IL-10-Protein im Kulturüberstand (Abb. 54A-C). Aminothalidomid zeigte die bekannte verringerte IL-12p40-Proteinmenge, während die nachweisbare IL-12p40-Menge durch den spezifischen p38-Inhibitor SB203580 gesteigert wurde (Abb. 54B). Suramin erhöhte die TNF α und IL-12p40-Proteinmenge (Abb. 54A+B). Suramin inaktivierte die biologisch aktives IL-10-Protein (Kap. 2.3.2.2) wodurch im Kulturüberstand kein biologisch aktives IL-10-Protein nachweisbar war (Abb. 54C).

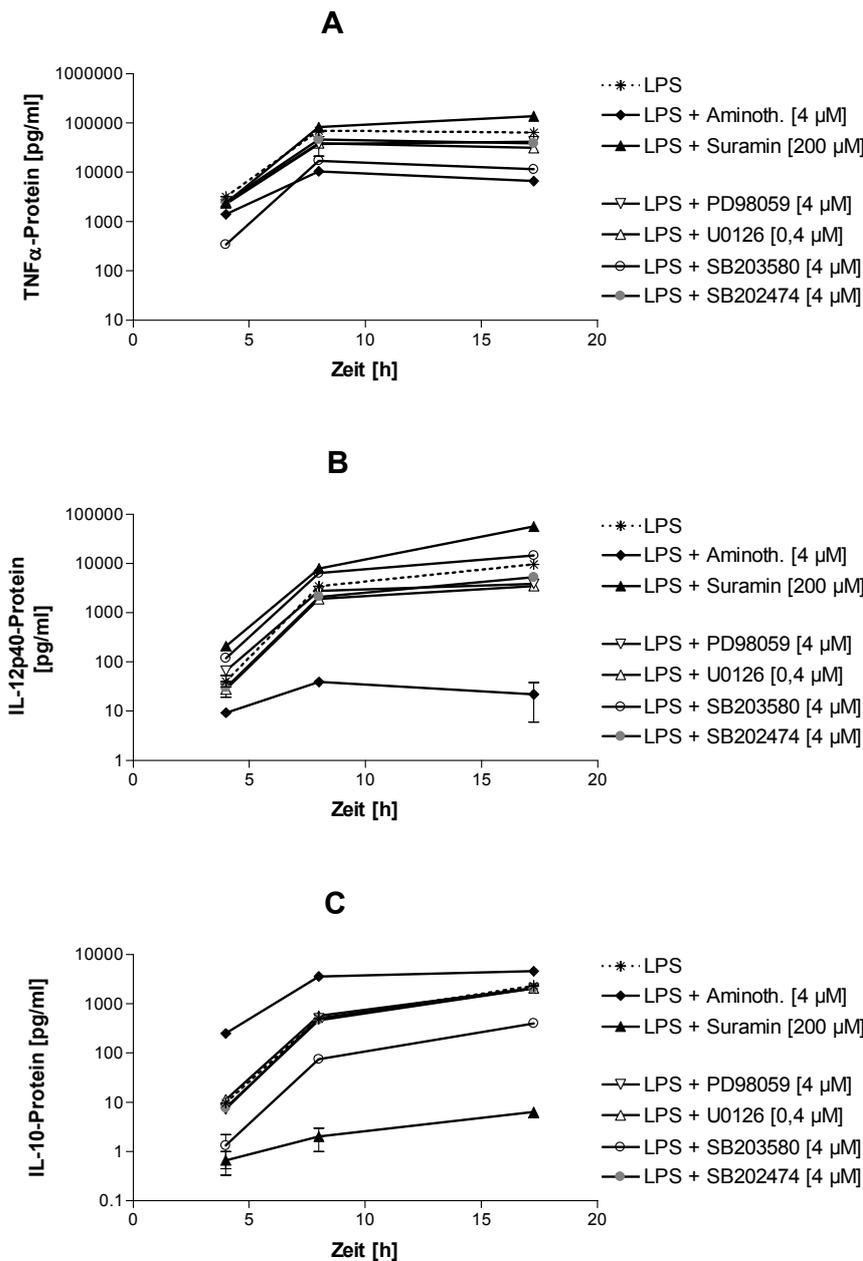


Abb. 54: Wirkung verschiedener MAPK-Inhibitoren auf die TNF α - (A), IL-12p40- (B) und die IL-10-Proteinmenge (C) in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten

Gezeigt sind die TNF α - (A), IL-12p40- (B) und die IL-10-Proteinmenge (C) im Kulturüberstand von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 2) über den Zeitraum von 18 h. Verwendete Inhibitoren: Aminothalidomid [4 μ M] und Suramin [200 μ M], MEK1/2 - PD90859 [4 μ M] bzw. UO126 [0,4 μ M], p38-MAPK – SB203580 [4 μ M] bzw. SB202474 [4 μ M], (inaktive Negativkontrolle von SB203580).

Zusammenfassung zur Wirkung der MAPK-Inhibitoren:

In Tab. 11 ist die Wirkung von Aminothalidomid, Suramin und der MAPK-Inhibitoren auf die Proteinmenge von TNF α , IL-12p40 und IL-10 nach 18 h LPS-Stimulation vereinfacht zusammengefasst. Die TNF α -Bildung wurde durch alle MAPK-Inhibitoren gehemmt, was die Beteiligung des JNK-, ERK1/2- und p38-MAPK-Signalweges bestätigt. Die MEK1/2-Inhibitoren PD98050 und UO126 beeinflussten die IL-10- bzw. IL-12p40 Proteinmenge im Kulturüberstand nicht, während unter Einfluss des p38-MAPK-Inhibitors die IL-10-Proteinmenge verringert und die IL-12p40-Proteinmenge erhöht wurde. Diese Ergebnisse deuten auf eine fehlende Beteiligung des ERK1/2-Signalweges und eine essentiell notwendige Beteiligung des p38-MAPK-Signalweges an der LPS-induzierten IL-10- bzw. IL-12p40-Proteinbildung.

Tab. 11: Wirkung von MAPK-Inhibitoren, Aminothalidomid und Suramin auf die gemessene Proteinmenge der Zytokine IL-12p40, IL-10 und TNF α im Kulturüberstand von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten nach 18 h-24 h LPS-Stimulation.

Erläuterungen siehe Text, Bedeutung der Zeichen:

keine signifikante Veränderung: \leftrightarrow , Steigerung: \uparrow , Hemmung: \downarrow , leicht: +, stark: ++, sehr stark: +++

Signalweg - eingesetzter Inhibitor	TNF α - Proteinmenge	IL-12p40- Proteinmenge	IL-10- Proteinmenge
JNK1/2/3 - SP600125	\leftrightarrow bis \downarrow +	\leftrightarrow	\leftrightarrow
MEK1/2 - PD90850	\downarrow +	\leftrightarrow	\leftrightarrow bis \uparrow +
MEK1/2 - UO126	\downarrow +	\downarrow +	\leftrightarrow
p38-MAPK - SB203580	\downarrow +++	\uparrow +	\downarrow ++
inaktive Kontrolle p38-MAPK - SB202474	\downarrow +	\downarrow +	\leftrightarrow bis \downarrow +
Aminothalidomid	\downarrow +++	\downarrow +++	\uparrow +
Suramin	\uparrow +++	\uparrow +++	\downarrow +

2.5.2 Wirkung des ERK1/2-Inhibitors und in Gegenwart des p38-MAPK-Inhibitors

Die Beteiligung zweier Signalwege an der Zytokinbildung kann untersucht werden, indem ein Signalweg durch zwei Inhibitoren/Substanzen blockiert wird und anschließend diese Zytokinbildung mit der Zytokinbildung bei alleiniger Gabe eines Inhibitoren verglichen wird¹⁶⁸. Daher wurde untersucht wie die, durch den ERK1/2-Inhibitor PD98059 beeinflusste TNF α -, IL-12p40 und IL-10-Proteinbildung, in Gegenwart des p38-MAPK-Inhibitors SB203580 verändert wurde (Kap. 5.4.4). Um den Einfluss der hemmenden Wirkung von endogen gebildetem IL-10-Protein auf die TNF α -Proteinbildung der LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten auszuschliessen, wurde die TNF α -Proteinmenge im Kulturüberstand nach 4 h Stimulation gemessen⁶⁰.

Die Abb. 55A zeigt die konzentrationsabhängige Hemmung der TNF α -Proteinmenge durch PD98059, wobei die Hemmung der TNF α -Proteinmenge durch PD98059 unabhängig von der eingesetzten Konzentration durch SB203580 verstärkt wurde.

Die Wirkung der kombinierten Gabe von PD98059 und SB203580, auf die IL-12p40- und IL-10-Proteinmenge ist in Abb. 55B+C dargestellt. Weder die IL-12p40- noch die IL-10-Proteinmenge wurde in den eingesetzten Konzentrationen signifikant beeinflusst. Wurde zusätzlich der p38-MAPK-Signalweg gehemmt, so konnte die durch SB203580 gezeigte Steigerung der IL-12p40-Proteinmenge (Abb. 55B) und Dezimierung der IL-10-Proteinmenge (Abb. 55C), unabhängig von der Hemmung der MEK1/2 durch PD98059, abgebildet werden.

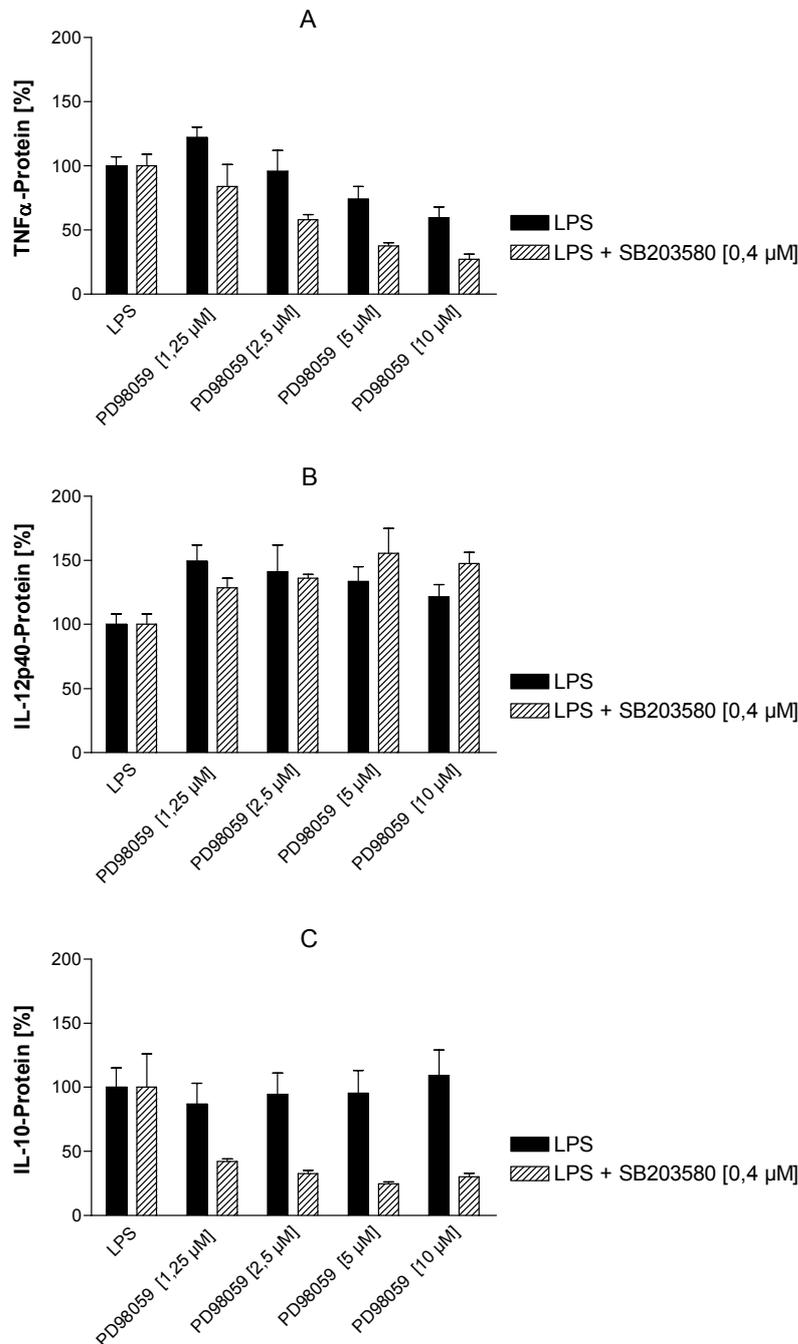


Abb. 55: Einfluss von PD98059 auf die TNFα- (A), die IL-12p40- (B) und die IL-10-Proteinbildung (C) in Gegenwart des p38-MAPK-Inhibitors SB203580

Gezeigt sind die TNFα-Proteinmenge nach 4 h (A) sowie die IL-12p40- (B) und die IL-10-Proteinmenge (C) nach 22 h im Kulturüberstand von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 1) in prozentualen Angaben (bezogen auf die LPS-Kontrollgruppe).

Verwendete Inhibitoren: MEK1/2 - PD98059 [1,25 μM-10 μM] und p38-MAPK – SB203580 [0,4 μM].

2.5.3 Wirkung von Aminothalidomid in Gegenwart von MAPK-Inhibitoren

Da nur die Hemmung der p38-MAPK die Bildung aller drei Zytokine und die Hemmung der MEK1/2 (ERK1/2¹⁹) die TNF α -Bildung deutlich beeinflusste (Tab. 11), wurde der Einfluss von Aminothalidomid auf den ERK1/2-Signalweg und den p38-MAPK-Signalweg untersucht und die Proteinbildung von TNF α , IL-12p40 und IL-10 in Gegenwart von Aminothalidomid und des p38-MAPK-Inhibitors SB203580 charakterisiert (Kap. 5.4.4).

2.5.3.1 Wirkung von Aminothalidomid in Gegenwart des ERK1/2-Inhibitors

Wie Abb. 56 zeigt, wurde bei gemeinsamer Gabe von Aminothalidomid und dem MEK1/2-Inhibitor PD98059 (dadurch Hemmung von ERK1/2¹⁹) die hemmende Wirkung von Aminothalidomid auf die TNF α -Proteinmenge in Gegenwart des MEK1/2-Inhibitors PD98059 nach 4 h verstärkt.

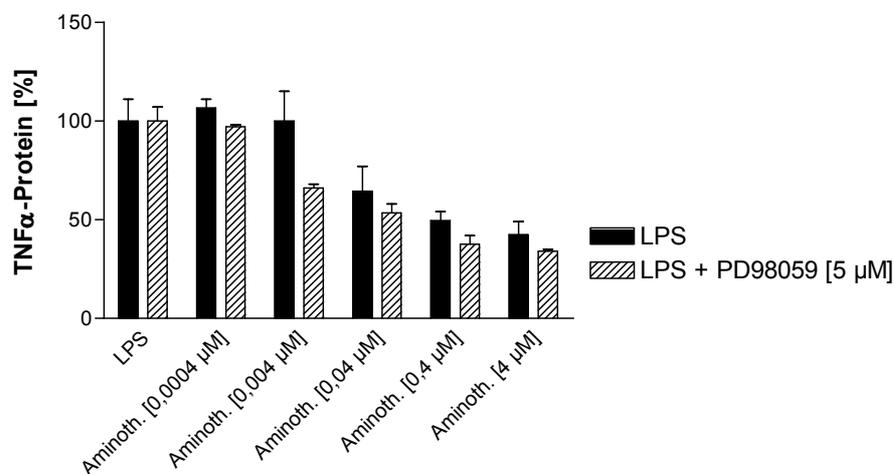


Abb. 56: Einfluss von Aminothalidomid auf die TNF α -Proteinmenge im Kulturüberstand in Gegenwart des MEK1/2-MAPK-Inhibitors PD98059 nach 4 h LPS-Stimulation

Gezeigt sind die TNF α -Proteinmenge nach 4 h im Kulturüberstand von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 1) in prozentualen Angaben (bezogen auf die LPS-Kontrollgruppe).

Verwendete Substanzen: Aminoth. = Aminothalidomid [0,0004 μ M-4 μ M] und MEK1/2-Inhibitor PD98059 [5 μ M].

2.5.3.2 Wirkung von Aminothalidomid in Gegenwart des p38-MAPK-Inhibitors

Die Abb.57A demonstriert, dass die hemmende Wirkung von Aminothalidomid auf die TNF α -Proteinmenge in Gegenwart des p38-MAPK-Inhibitors bei gemeinsamer Gabe gegenüber der Einzelgabe verstärkt wurde. Die Hemmung des p38-MAPK-Signalweges führte zu einer Verringerung der IL-10-Proteinmenge (Abb. 53). Daher könnte Aminothalidomid umgekehrt, über eine Aktivierung des p38-MAPK-Signalweges, die beobachtete IL-10-Steigerung bewirken (Abb. 28). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Wirkung von Aminothalidomid in Gegenwart des p38-MAPK-Inhibitors getestet (Kap. 5.5.1). Wie in Abb. 57B+C ersichtlich, wurde der konzentrationsabhängigen Wirkung von Aminothalidomid (Hemmung der IL-12p40- und Steigerung der IL-10-Proteinmenge) in Gegenwart des p38-MAPK-Inhibitors entgegen gewirkt. Bei einer Verringerung der LPS-induzierten IL-10-Proteinbildung durch den p38-MAPK-Inhibitor SB203580 hemmte Aminothalidomid die IL-12p40-Bildung. Dieser Versuch zeigte, dass die Hemmung der IL-12p40-Bildung durch Aminothalidomid direkt und nicht über die gleichzeitige Steigerung des IL-10-Proteins erfolgte.

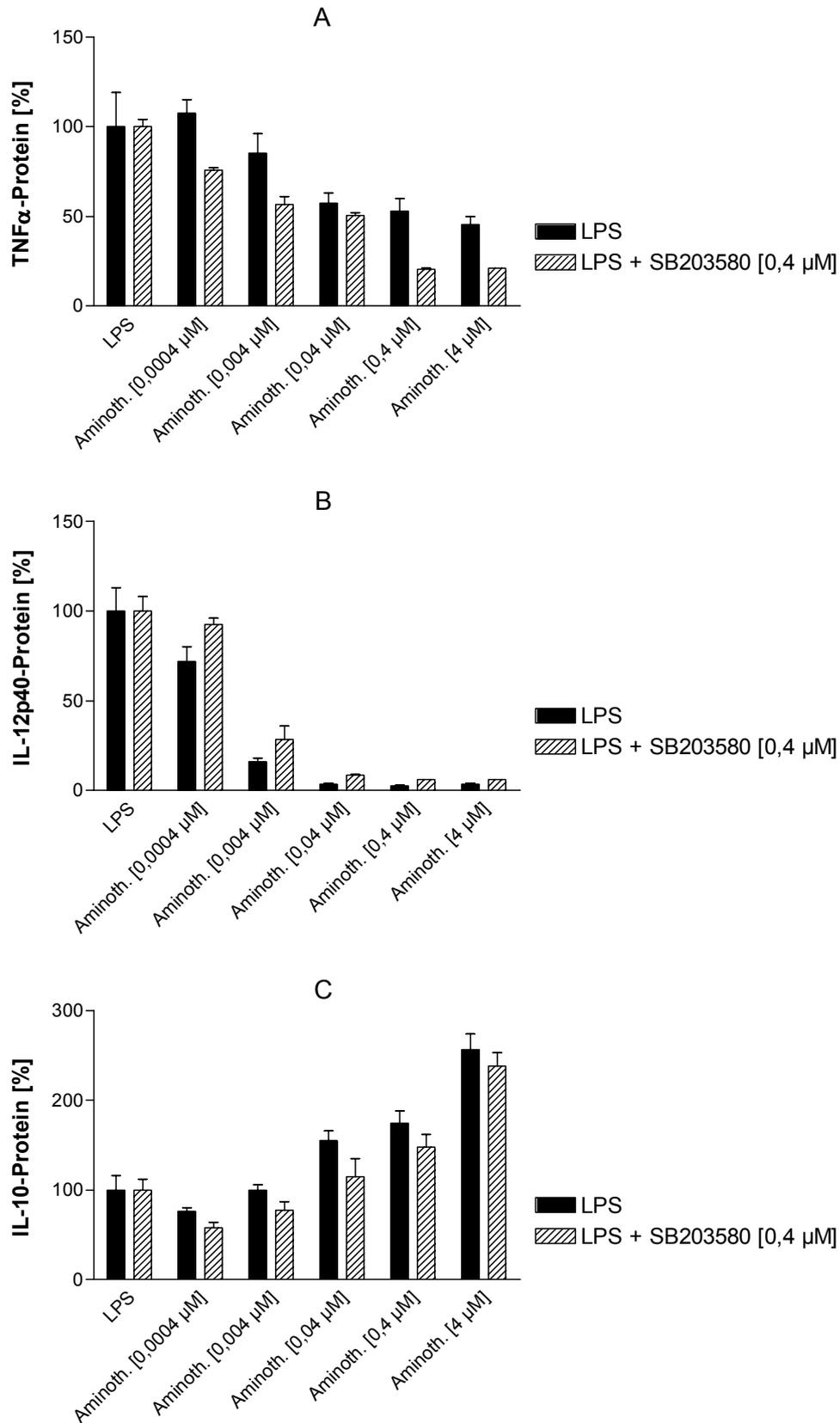


Abb. 57: Einfluss von Aminothalidomid auf die TNFα- (A), die IL-12p40- (B) und die IL-10-Proteinmenge (C) im Kulturüberstand in Gegenwart des p38-MAPK-Inhibitors SB203580

Gezeigt sind die TNFα-Proteinmenge nach 4 h (A) sowie die IL-12p40- (B) und die IL-10-Proteinmenge (C) nach 22 h im Kulturüberstand von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 1) in prozentualen Angaben (bezogen auf die LPS-Kontrollgruppe).

Verwendete Substanzen: Aminoth. = Aminothalidomid [0,0004 μM-4 μM] und p38-MAPK – SB203580 [0,4 μM].

Aminothalidomid veränderte die mRNA-Bildung der o.g. Zytokine (Abb. 30, Abb. 32, Abb. 34). SB203580 steigerte die IL-12p40-Protein/mRNA-Menge bei gleichzeitiger Verringerung der IL-10-Protein/mRNA-Menge und TNF α -Protein/mRNA-Menge über den gesamten Zeitraum der LPS-Stimulation (Abb. 58). Im nächsten Schritt interessierte, wie bei gemeinsamer Gabe von Aminothalidomid und SB203580 die mRNA-Bildung der oben genannten Zytokine beeinflusst wurde. Zum Vergleich mit der mRNA-Menge wurde ebenfalls die Proteinmenge im Kulturüberstand bestimmt (Kap. 5.5.1). Wie in Abb. 58A+B dargestellt, verringerte SB203580 bereits innerhalb der ersten 2 h nach LPS-Stimulation das TNF α -Protein (13 %) und die TNF α -mRNA-Menge (11 %). Die Hemmung des p38-MAPK-Signalweges in Gegenwart von Aminothalidomid verursachte eine zusätzliche Verringerung der TNF α -mRNA-Menge (8 %), gegenüber der TNF α -mRNA der alleinigen Gabe von Aminothalidomid (35 %). Wie die Abb. 58C-D zeigt, wurde der durch Aminothalidomid hervorgerufenen Erniedrigung von IL-12p40 (Protein und mRNA), in der kombinierten Gabe mit dem p38-MAPK Inhibitor SB203580 entgegengewirkt. Auch die, durch Aminothalidomid verursachte Steigerung der IL-10-Bildung (Protein und mRNA), wurde in Gegenwart von SB203580 verringert (Abb. 58E-F).

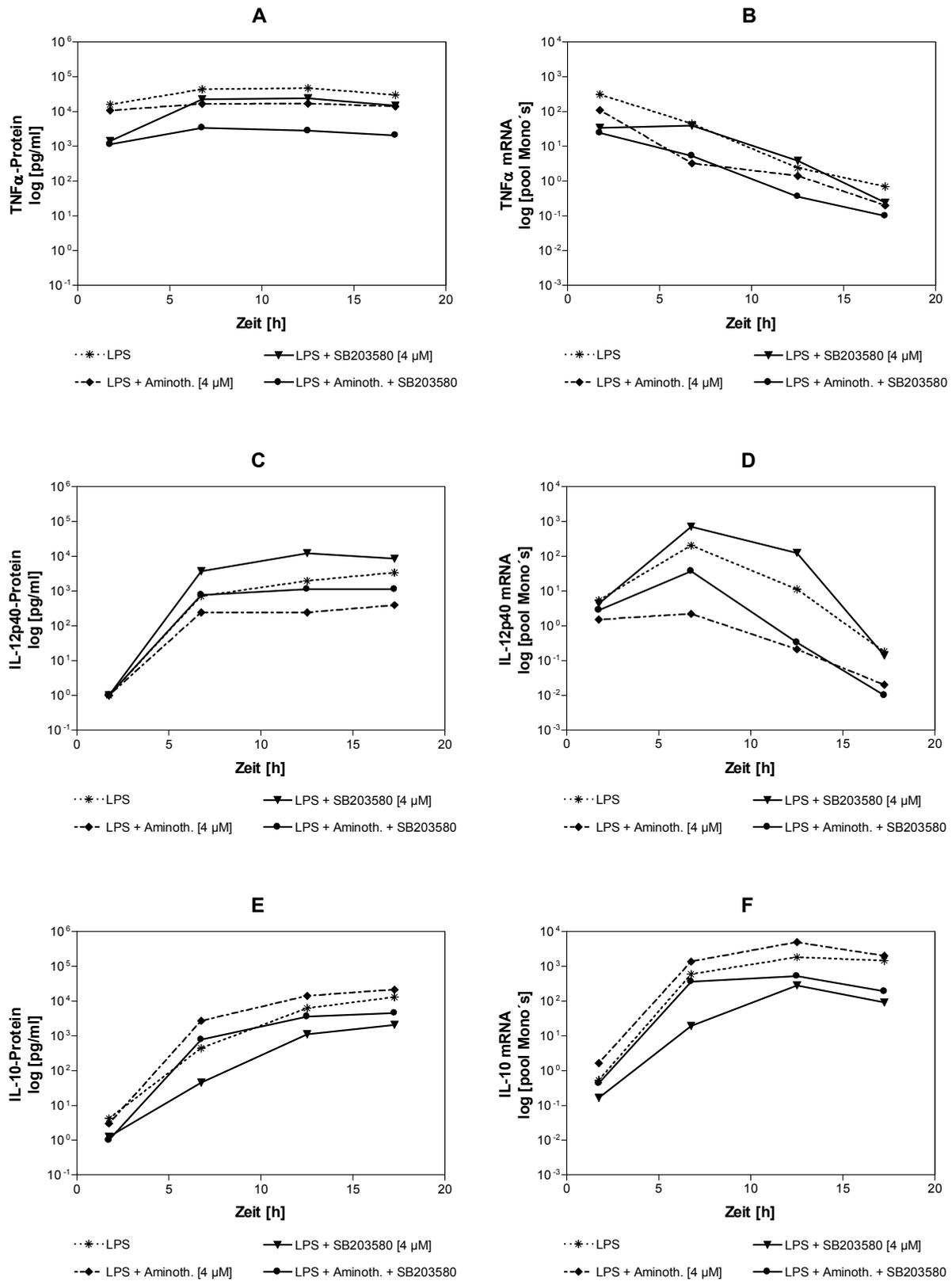


Abb. 58: Einfluss von Aminothalidomid auf die Proteinmenge bzw. mRNA-Menge von TNF α (A bzw. B), IL-12p40 (C bzw. D) und IL-10 (E bzw. F) in Gegenwart des p38-MAPK-Inhibitors SB203580

Dargestellt sind die von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 2) über den Zeitraum von 18 h detektierten Protein- bzw. mRNA-Mengen von TNF α (A bzw. B), IL-12p40 (C bzw. D) und die IL-10 (E bzw. F). Verwendete Substanzen: Aminoth. = Aminothalidomid [4 μ M] und p38-MAPK-Inhibitor – SB203580 [4 μ M].

2.5.4 Suraminwirkung in Gegenwart des p38-MAPK-Inhibitors SB203580

Wie in Kap. 2.3.2.2 beschrieben, inaktiviert Suramin biologisch aktives IL-10-Protein wodurch die hemmende Wirkung von IL-10-Protein auf die IL-12p40-Proteinbildung entfällt. Mit dem Messen der IL-12p40-Proteinmenge nach 4 h sollte überprüft werden, ob die durch Suramin und SB203580 verursachte Erhöhung der IL-12p40-Proteinmenge indirekt über die, ebenfalls durch Suramin und SB203580 verringerte Menge an IL-10-Protein erfolgte. Die Abb. 59A+C zeigt, dass Suramin eine konzentrationsabhängige Steigerung der IL-12p40-Proteinbildung bewirkte und nach 4 h kein IL-10-Protein im Kulturüberstand detektierbar war. In Gegenwart von SB203580 war Suramin jedoch nicht mehr in der Lage, die IL-12p40-Bildung nach 4 h konzentrationsabhängig zu steigern.

Nach 22 h LPS-Stimulation wurde die konzentrationsabhängige Steigerung der IL-12p40-Proteinbildung und die Inaktivierung von biologisch aktivem IL-10-Protein durch Suramin bei alleiniger Gabe und in Gegenwart von SB203580 und Suramin beobachtet (Abb. 59B+D).

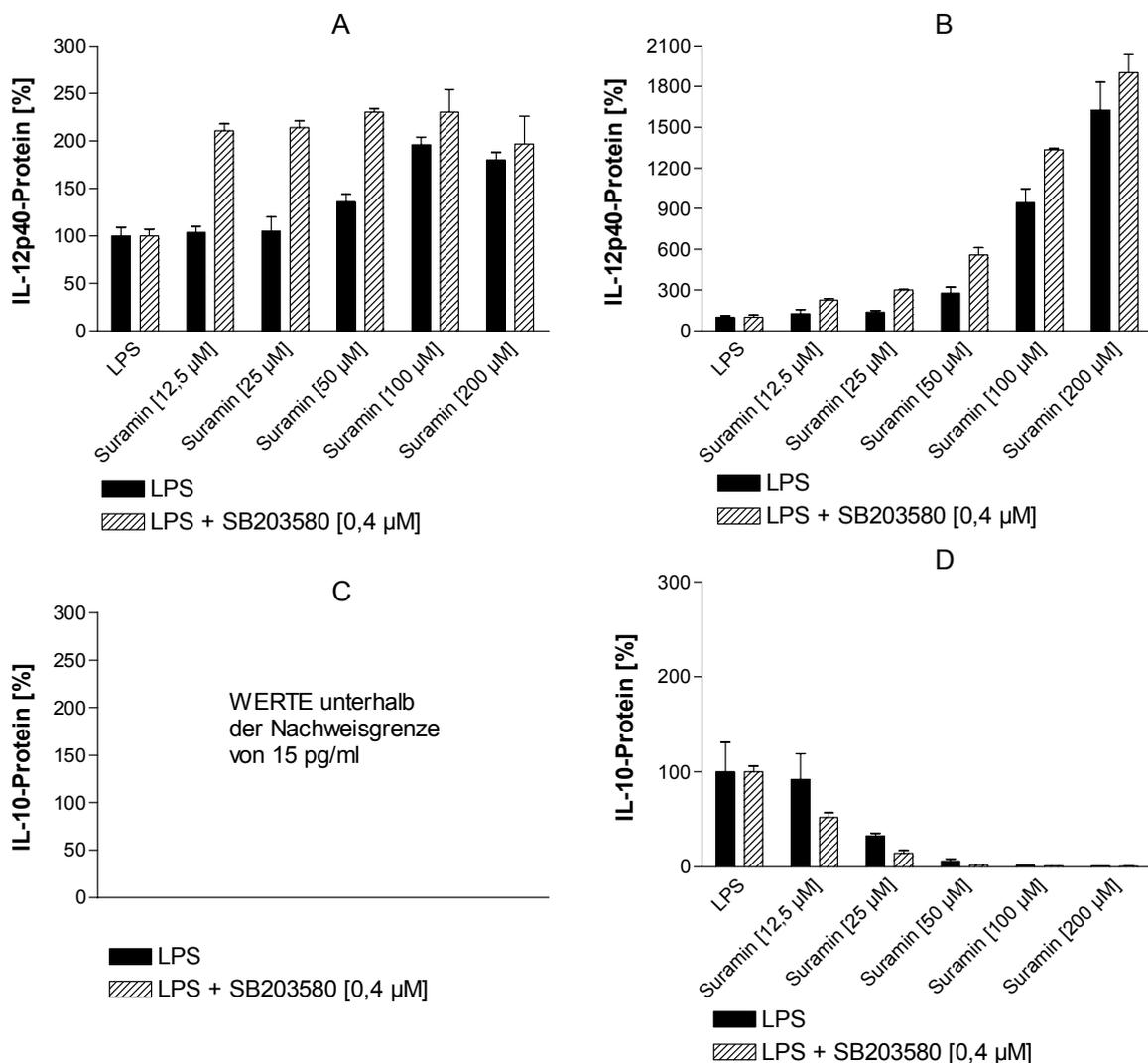


Abb. 59: Einfluss von Suramin auf die IL-12p40- bzw. IL-10-Proteinbildung in Gegenwart des p38-MAPK-Inhibitors SB203580 nach 4 h (A bzw. C) und 22 h (B bzw. D) LPS-Stimulation

Gezeigt sind die IL-12p40-Proteinmengen bzw. IL-10-Proteinmengen nach 4 h (A bzw. C) und nach 22 h LPS-Stimulation (B bzw. D) im Kulturüberstand von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 1) in prozentualen Angaben (bezogen auf die LPS-Kontrollgruppe). Verwendete Substanzen: Suramin [12,5 µM-200 µM] und p38-MAPK – SB203580 [0,4 µM].

2.6 Die Beeinflussung der Phosphorylierung der p38 α -MAPK

Der Einfluss von Aminothalidomid und Suramin auf die Aktivität der p38-MAPK sollte überprüft werden, um dadurch Rückschlüsse auf die veränderte Zytokinbildung ziehen zu können. In humanen Monozyten wird die p38 α -MAPK exprimiert¹⁶⁹. Daher wurde die Aktivierung der p38 α -MAPK anhand des Anteils der phosphorylierten p38 α -MAPK [pTpY180/182] am Gesamtprotein der p38 α -MAPK über Antikörper bestimmt (Kap. 5.8.1).

2.6.1 LPS-induzierte p38 α -Phosphorylierung

In Abb. 60A+B ist der errechnete Anteil an phosphorylierter p38 α -MAPK über den Zeitraum von 90 min dargestellt. In unstimulierten CD-14⁺-Monozyten erfolgte eine leichte Phosphorylierung der p38 α -MAPK (1 % nach 90 min). Die Aktivierung der p38 α -MAPK durch LPS wurde durch den linearen Anstieg der p38 α -MAPK-Phosphorylierung innerhalb der ersten 30 min auf > 5 % sichtbar. Nach 90 min wurde kein weiterer Anstieg der p38 α -MAPK-Phosphorylierung in der LPS-Kontrollgruppe beobachtet. Der p38-MAPK-Inhibitor SB203580 verringerte die Phosphorylierung der p38 α -MAPK in den ersten 5 min-15 min nach LPS-Stimulation. Aminothalidomid beeinflusste die LPS-induzierte p38 α -MAPK-Phosphorylierung innerhalb der ersten 30 min nicht, während Suramin diese innerhalb der ersten 20 min verringerte.

Durch LPS erfolgt die Sekretion von TNF α -Protein in den Kulturüberstand¹¹. Wie Abb. 60C+D zeigt, wurde auch in unstimulierten CD-14⁺-Monozyten eine geringe Menge an TNF α -Protein detektiert. Nach 20 min war die TNF α -Proteinmenge in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten gegenüber der unstimulierten Kontrolle erhöht und nach 90 min um den Faktor 14 gesteigert. Der p38-MAPK-Inhibitor SB203580 verringerte die TNF α -Proteinmenge im Kulturüberstand um maximal 94 % gegenüber der LPS-Kontrollgruppe.

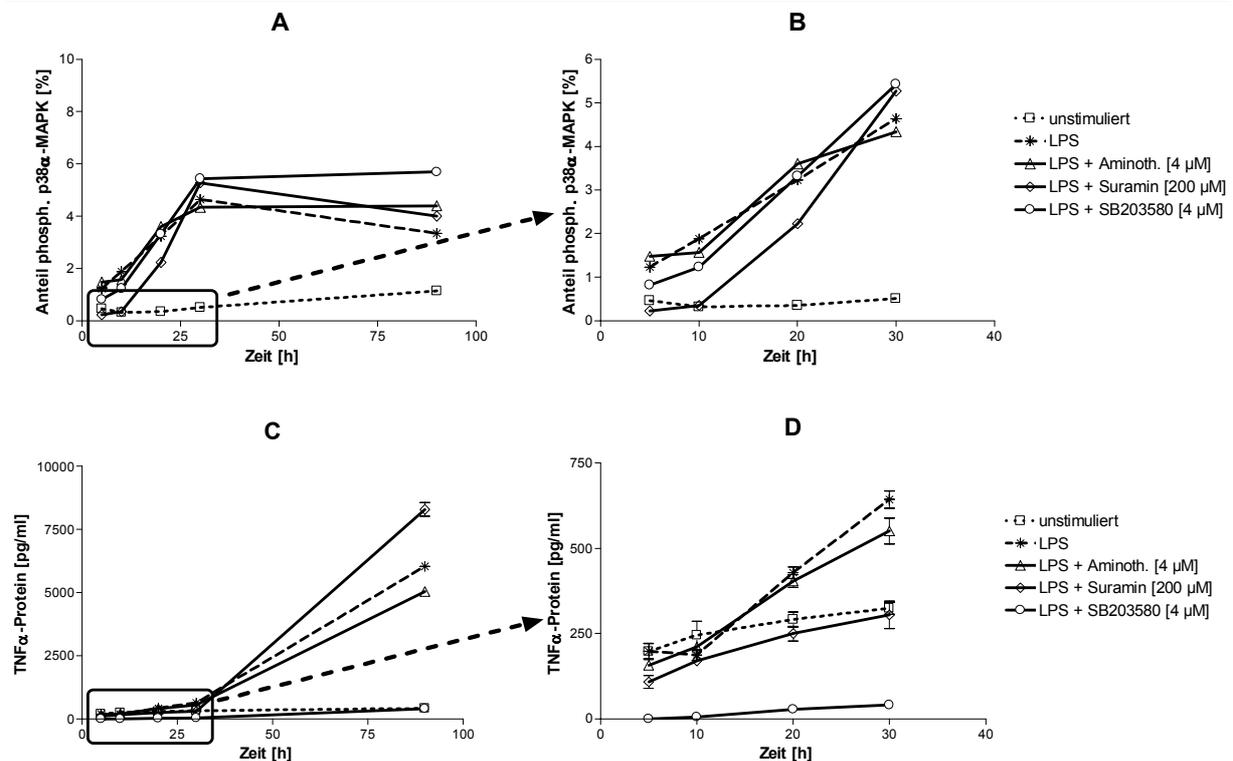


Abb. 60: LPS-Stimulation von CD14⁺-Monozyten: p38 MAPK Phosphorylierung (A+B) und TNFα-Proteinmenge im Kulturüberstand (C+D)

Dargestellt ist der Anteil an phosphorylierter p38α-MAPK [%] am Gesamtprotein der p38α-MAPK in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 4) über den Zeitraum von 90 min (A bzw. B). Die erfolgreiche Stimulation mit LPS zeigt die Freisetzung des TNFα-Proteins in den Kulturüberstand (C bzw. D).

Verwendete Abkürzungen für Substanzen: Aminoth. = Aminothalidomid und p38-MAPK-Inhibitor – SB203580.

2.6.2 Anisomycin-induzierte p38α-Phosphorylierung

Anisomycin führt u.a. zur Phosphorylierung der p38-MAPK und verhindert die Translation¹⁷⁰. Um Substanzeffekte bei einer stärkeren Phosphorylierung der p38α-MAPK besser beobachten zu können, wurde Anisomycin zur Aktivierung der p38α-MAPK eingesetzt (Kap. 5.8.1).

Abb. 61A zeigt den Anteil an phosphorylierter p38α-MAPK zwischen 5 min –90 min Behandlung mit 20 μM Anisomycin, wobei eine kontinuierliche Steigerung der p38α-MAPK-Phosphorylierung durch Anisomycin bis 90 min zu beobachten war. Die Anisomycin-stimulierte Phosphorylierung war nach 30 min um den Faktor 2 stärker als bei der LPS-stimulierten Phosphorylierung (Abb. 60B). SB203580 führte zu einer Verringerung des Anteils an phosphorylierter p38α-MAPK über den Zeitraum von 90 min. Suramin, Aminothalidomid und die Negativkontrolle SB202474 zeigten keine Wirkung auf die Anisomycin-induzierte Phosphorylierung der p38α-MAPK über den Zeitraum von 90 min.

Um auszuschliessen, dass durch Kontamination mit LPS eine ungewollte Stimulation der CD-14⁺-Monozyten erfolgte, wurde die TNF α -Proteinmenge im Kulturüberstand der Anisomycin-stimulierten CD-14⁺-Monozyten bestimmt. Wie Abb. 61B zeigt, wurden ca. 400 pg/ml TNF α -Protein in den Anisomycin-stimulierten Proben über den Zeitraum von 90 min nachgewiesen. In weiteren Versuchen wurde bestätigt, dass durch Anisomycin [0,0013 μ M-20 μ M] kein TNF α -, IL-12p40- und IL-10-Protein induziert wurde, wobei kein IL-12p40- und IL-10-Protein im Kulturüberstand nachweisbar war (nicht nachweisbar, Daten nicht gezeigt). Somit wurde die translationshemmende Wirkung von Anisomycin bestätigt¹⁷⁰. In Gegenwart des p38-MAPK-Inhibitors SB203580 [4 μ M] wurde über gesamten Zeitraum kaum TNF α -Protein im Kulturüberstand (1 % bis 8 % der Anisomycin-stimulierten Kontrolle) nachgewiesen. Die Negativkontrolle SB202474 verringerte innerhalb der ersten 30 min die gemessene TNF α -Proteinmenge (28 % -48 % der Anisomycin-stimulierten Kontrolle). Über den Zeitraum von 90 min wurde die gemessene TNF α -Proteinmenge zwischen 16 % -25 % gegenüber der Anisomycin-stimulierten Kontrolle gehemmt.

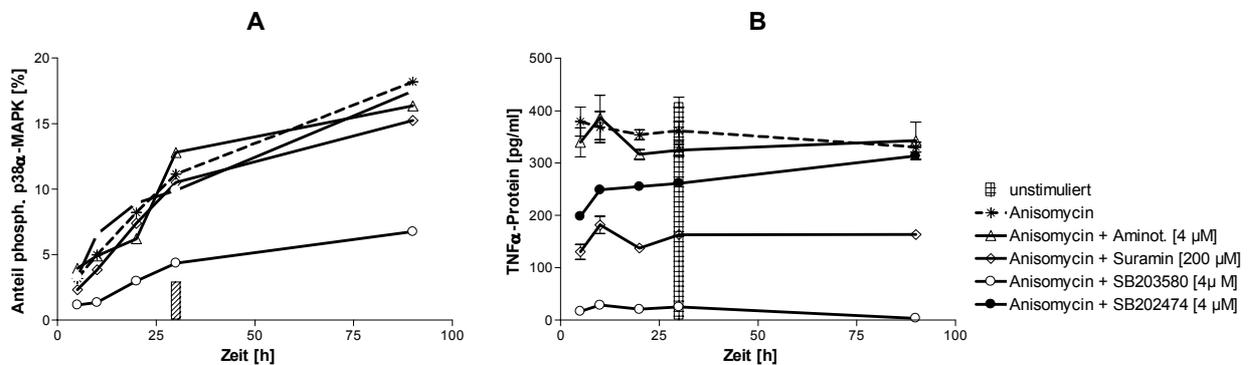


Abb. 61: Anisomycin-induzierte p38 MAPK Phosphorylierung in CD14⁺-Monozyten (A) und TNF α -Proteinmenge im Kulturüberstand (B)

Gezeigt ist der Anteil an phosphorylierter p38 α -MAPK [%] am Gesamtprotein der p38 α -MAPK in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 4) über den Zeitraum von 90 min (A bzw. B). Zur Überprüfung, dass keine LPS-Kontamination erfolgte, ist die Freisetzung des TNF α -Proteins in den Kulturüberstand dargestellt (C bzw. D). Verwendete Abkürzungen für Substanzen: Aminoth. = Aminothalidomid, p38-MAPK-Inhibitor – SB203580 und inaktive Kontrolle des p38-MAPK-Inhibitors – SB202474.

3 DISKUSSION

Die Ergebnisse über den Einsatz von Thalidomid und Thalidomidderivaten (z.B. Aminothalidomid) bei entzündlichen Immunerkrankungen erforderten eine nähere Charakterisierung der immunologischen Wirkung dieser Substanzklasse¹⁷¹. Für Suramin wurde ebenfalls die Beeinflussung von Zytokinen und über die erfolgreiche Behandlung verschiedener Krebsarten berichtet^{134;142;172}.

3.1 Das Modell der LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten

3.1.1 Zytokinbildung von LPS-aktivierten CD-14⁺-Monozyten

Die Aktivierung verschiedener Signalwege nach Stimulation durch LPS wurde in verschiedenen experimentellen Arbeiten gezeigt, wobei diese Untersuchungen hauptsächlich in Zelllinien durchgeführt wurden¹⁰⁶⁻¹⁰⁹. Für die Untersuchung der Bildung des Zytokins IL-10 eignete sich die Zelllinie THP-1 nicht, da diese nach LPS-Stimulation nur geringe Proteinmengen an IL-10 sezerniert und keine IL-10-mRNA nach LPS-Stimulation nachgewiesen wurde (Abb. 9)⁹⁵. Weiterhin wurden Unterschiede zwischen den Signalwegen in primären Zellen und Zelllinien festgestellt¹⁷³. Aufgrund der Bedeutung der CD-14⁺-Monozyten für das Immunsystem (Kap. 1.1.1) und der fehlenden Existenz geeigneter Monozytenzelllinien, eignete sich nur das Modell der LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten zur Untersuchungen der Regulation von TNF α , IL-10 und IL-12p40.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Monozyten wurden über eine Dichtegradienten-Zentrifugation mit anschließender CD-14⁺-Positivselektion isoliert (Kap. 5.4.3). Sie gehören daher hauptsächlich zu den von Geissmann et al. in der Maus beschriebenen Monozyten, welche nach einer Infektion in das Gewebe auswandern und durch die Produktion von beispielsweise Zytokinen, weitere Reaktionen auslösen⁹². Die in vitro nachgestellte Situation, die durch LPS hervorgerufene, konzentrationsabhängige Induktion der Zytokine TNF α , IL-12p40 und IL-10 wurde bestätigt (Abb. 15).

Die Tatsache, dass im Kulturüberstand der CD-14⁺-Monozyten die größte Menge an LPS-induziertem TNF α -, IL-12p40- und IL-10-Protein im Vergleich zu PBMCs und Gesamtblut zu detektieren war (Abb. 38), demonstrierte die Eignung des verwendeten Modellsystems.

Im Kulturüberstand der unstimulierten CD-14⁺-Monozyten war zu allen untersuchten Zeitpunkten kaum TNF α -Protein, bzw. kein IL-12p40- und IL-10-Protein zu detektieren (Abb. 10, Tab. 6). Dieses Ergebnis indiziert, dass kein unspezifischer Stimulus, wie beispielsweise die Adhärenz an Plastik während der Kultivierung auftrat¹⁷⁴, um die Zytokinproduktion der oben genannten Zytokine zu induzieren. Allerdings deutet der Coefficient of Variation von max. 29 % (Tab. 5) an, dass der Proteinarray für einen qualitativen Vergleich der Zytokinbildung nicht geeignet ist. Nach der LPS-Stimulation wurde die Zytokinbildung von MCP-1, TNF α , IL-6, IL-8, IL-10 und IL-1 β von CD-14⁺-Monozyten mittels Proteinarray bestätigt (Abb. 10)¹¹. Im Widerspruch zu den eigenen Ergebnissen detektierte Copeland et al. kein TNF α -, IL-10- und IL-1 β -Protein im Kulturüberstand von LPS-stimulierten Gesamtblut³². Weiterhin wurden nach LPS-Stimulation des Gesamtbluts von 20 gemessenen Zytokinen nur die 3 Zytokine IL-6, IL-8, MIP-1 β im Proteinarray detektiert, während im ELISA 16 Zytokine bestimmt wurden³².

Copeland et al. empfahl daher die Ergebnisse von Proteinarrays grundsätzlich mit einer weiteren Methode zu überprüfen³². Eigene Untersuchungen zeigten dass, die Zytokine TNF α (Abb. 15), MCP-1, IL-6, IL-8, IL-1 β (Daten nicht gezeigt) und IL-10 (Abb. 15) im Kulturüberstand von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten mit dem Proteinarray detektiert wurden (Abb. 10). LPS-stimulierte CD-14⁺-Monozyten sezernieren nur in Gegenwart von IFN- γ größere Mengen an IL-12p70-Protein¹⁷⁵. Da in diesem Modell die CD-14⁺-Monozyten nur durch LPS-stimuliert wurden, lassen sich das im Proteinarray nicht nachweisbare IL-12p70-Protein durch das nicht vorhandene IFN- γ -Protein erklären (Abb. 10). Die eigenen Versuche zeigten daher, dass Proteinarrays für die Untersuchung von Zytokinen im Kulturüberstand von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten geeignet sind, auch wenn Copeland et al. im Kulturüberstand von Gesamtblutproben nicht alle Zytokine nachweisen konnte³².

Die im ELISA gemessene Proteinmenge von TNF α , IL-12p40 und IL-10 bestätigen, die frühe Sezernierung von TNF α und die spätere Sezernierung von IL-12p40- und IL-10-Protein nach LPS-Stimulation (Abb. 15)^{60,117}. TNF α -Protein, welches an membranständige TNF-Rezeptoren gebunden ist, wird im Kulturüberstand mittels ELISA nicht nachgewiesen (Kap. 5.5.1). Die nach 9 h beobachtete Verringerung der TNF α -Proteinmenge könnte daher aufgrund der Bindung von TNF α -Protein an den membrangebundenen TNF-Rezeptor II (TNFRII) erfolgen¹⁷⁶.

Die nach 24 h geringere TNF α -Proteinmenge als nach 9 h sowie die nach 24 h LPS-Stimulation maximale IL-12p40- und IL-10-Proteinmenge zeigen (Abb. 15), dass die Untersuchungen zur Beeinflussung der Zytokinbildung durch pharmakologische Substanzen nach 24 h LPS-Stimulation zu verlässlichen Ergebnissen führen. Wie die Untersuchungen zur mRNA-Menge zeigen, wurde nach 7 h LPS-Stimulation keine weitere Zunahme der TNF α -mRNA-Menge (Abb. 30) sowie nach 12 h keine weitere Zunahme der IL-12p40- bzw. IL-10-mRNA-Menge beobachtet (Abb. 32, Abb. 34). Dies bedeutet, dass die Hauptmenge dieser drei Zytokine zwischen 9 h und 24 h (für TNF α) bzw. 12 h und 24 h (für IL-12p40 bzw. IL-10) produziert wird. Die geringe Menge aller drei Zytokine nach 50 h LPS-Stimulation ist möglicherweise auf einen Verbrauch der drei Zytokine nach 24 h zurück zu führen (Abb. 15).

3.1.2 Haushaltsgene und die Beeinflussung der Apoptose

Bei der Analyse der Transkription wird häufig die Bildung der GAPDH- oder der β -Aktin-mRNA zur Normalisierung der induzierten Gene verwendet^{35;160;162}. Die cDNA der GAPDH wurde in unstimulierten und LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten nach dem gleichen Muster ohne die Bildung zusätzlicher Produkte amplifiziert, wobei nach 7,5 h Kultivierung deutlich weniger cDNA der GAPDH als nach 1,5 h nachgewiesen wurde (Abb. 18). Bei Betrachtung des Zeitverlaufs, war das Verhältnis der mRNA aller 4 Haushaltsgene (GAPDH, β -Aktin, β_2 -Mikroglobulin und HPRT) zueinander konstant (Abb. 18), was darauf deutet, dass keine Regulation dieser Haushaltsgene erfolgt¹⁶². Foss et al. empfiehlt die Verwendung von HPRT als Haushaltsgen in Lungenmakrophagen¹⁷⁷. Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten hingegen, dass die HPRT als Haushaltsgen in humanen CD-14⁺-Monozyten aus zwei Gründen nicht geeignet ist. Erstens ist die Expression von HPRT ca. 10.000-fach geringer im Vergleich zu den anderen drei Haushaltsgenen (Abb. 18) und zweitens, wurde die HPRT-mRNA-Menge nicht in der gleichen Größenordnung wie, die zu untersuchende Zytokin-mRNA für TNF α , IL-12p40 und IL-10 exprimiert (Abb. 30, Abb. 32, Abb. 34).

Daher eignete sich das Haushaltsgen HPRT -im Gegensatz zu den Haushaltsgenen GAPDH, β -Aktin und β_2 -Mikroglobulin- nicht zur Normalisierung der Proben in der RT-PCR¹⁷⁸.

Die Menge der mRNA aller 4 untersuchten Haushaltsgene (GAPDH, β -Aktin, β_2 -Mikroglobulin und HPRT) verringerte sich innerhalb der ersten 7 h nach Kultivierung der CD-14⁺-Monozyten, wobei nach 5 h nur noch 25 % der mRNA-Menge im Vergleich zur mRNA-Menge nach 1 h, nachweisbar war (Abb. 18). Die Verringerung der RNA-Menge wurde nicht durch den Abbau der RNA durch DNAsen verursacht, da bei der Isolierung der RNA ein DNase-Verdau für alle Proben durchgeführt wurde (Kap. 5.6.1). Die 18S-rRNA als Bestandteil der kleineren, 40S-Untereinheit des eukaryotischen Ribosoms kann ebenfalls zur quantitativen Bestimmung der isolierten RNA-Menge herangezogen werden¹⁶². Die unveränderliche Menge an 18S-rRNA zu allen Zeitpunkten -unabhängig vom Stimulus oder Substanz- zeigte (Abb. 19), dass die verringerte Menge an Haushaltsgen-mRNA daher nicht auf eine reduzierte Menge an RNA zurück zu führen ist. Die Minimierung der Haushaltsgen-mRNA erfolgte auch nicht durch eine unterschiedlich eingesetzte Monozytenzahl, da für alle untersuchten Zeiträume die gleiche Zahl an CD-14⁺-Monozyten eingesetzt wurde (Kap. 5.4.4).

Verschiedene Arbeitsgruppen berichteten über 60 % bis 70 % Verluste von lebenden Monozyten während der Kultivierung^{105,179}. Die dezimierte Menge der mRNA der untersuchten 4 Haushaltsgene könnte daher durch eine verringerte Stoffwechselaktivität bei allen Zellen oder durch eine verminderte Anzahl an stoffwechselaktiven Zellen verursacht werden. Die im Zytoplasma von unstimulierten CD-14⁺-Monozyten, um den Faktor 27-fach ansteigende Menge an mono- und oligonukleosomen DNA-Fragmenten in den ersten 5 h und die zwischen 5 h und 22 h relativ konstant bleibende Menge (Abb. 20) sprechen dafür, dass es sich hierbei, um die in Monozyten beschriebene spontane Apoptose handelt^{23,180,181}. Mangan et al. beschrieb die anti-apoptotische Wirkung von LPS und TNF α nach 10 h bis 80 h LPS-Stimulation^{23,182}. Möglicherweise könnte daher LPS oder durch LPS induziertes TNF α -Protein, einer späteren Apoptose der CD-14⁺-Monozyten (nach 5 h) entgegenwirken, was die nach 5 h LPS-Stimulation nicht weiter ansteigende Menge an mono- und oligonukleosomen DNA-Fragmenten im Zytoplasma (Abb. 20) erklären würde²³. Goyal et al. zeigte, dass die anti-apoptotische Wirkung durch LPS nach 18 h durch die Hemmung der Caspase-3 und Caspase-9 in Monozyten erfolgte, während durch Fahy et al. eine Beteiligung der Caspase-3 an der spontanen Apoptose bereits nach 4 h Kultivierung gezeigt wurde^{182,180}. Der in eigenen Versuchen beobachtete Zeitverlauf der Caspase-3 Aktivierung stimmt mit dem durch Fahy et al. beobachtetem Zeitverlauf überein (Abb. 21), sodass die Beteiligung der Caspase-3 an der spontanen Apoptose in CD-14⁺-Monozyten bestätigt wurde. Die Hemmung der Caspase 3/7 (durch Z-DEVD FMK) sowie der Caspase-8 und weiterer Caspasen (durch Z-VAD FMK) äußerte sich in der fast vollständigen Caspase-3/7-Inaktivierung über den beobachteten Zeitraum von 22 h (Abb. 21). Die leichte Inaktivierung der Caspase-3/7 durch den inaktiven Caspase-Inhibitor nach 4 h Einwirkzeit, deutet möglicherweise auf die beschriebene unspezifische Wirkung dieser Substanzklasse nach 4 h Einwirkzeit (Abb. 21), wurde aber durch die Messung von mono- und oligonukleosomen DNA-Fragmenten (Abb. 20) nicht bestätigt¹⁸⁰.

Die Verringerung der mono- und oligonukleosomen DNA-Fragmente im Zytoplasma durch beide Caspase-Inhibitoren innerhalb der ersten 8 h, deutet darauf, dass es sich bei dem beobachteten Effekt um die spontane Apoptose unter Beteiligung der Caspase-3/7 in CD-14⁺-Monozyten handelt (Abb. 20)^{180;183;184}. Die spontane Apoptose scheint daher zur verringerten Anzahl der lebenden CD-14⁺-Monozyten und dadurch zur Minimierung der mRNA-Menge der 4 Haushaltsgene mit fortschreitender Zeit zu führen. Eine Dezimierung der lebenden CD-14⁺-Monozyten durch nekrotische Vorgänge ist unwahrscheinlich, da im Kulturüberstand keine mono- und oligonukleosomen DNA-Fragmente innerhalb von 22 h nachgewiesen wurden (Abb. 23).

Auch Lund et al. beobachtete innerhalb der ersten 6 h eine apoptotische Phase von kryokonservierten Monozyten und identifizierte -im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit - nach 6 h bis 24 h Kultivierung eine nekrotische Phase¹⁸¹. Bei der Methode der Kryokonservierung werden die Monozyten in Gegenwart von DMSO eingefroren und zur Versuchsdurchführung wieder aufgetaut. Da vielfältige Effekte für die Substanz DMSO und die Methode der Kryokonservierung beschrieben wurden, könnte die beobachtete Nekrose von Lund et al. und die in eigenen Versuchen nicht nachweisbare Nekrose, in der unterschiedlichen Behandlung der Monozyten begründet liegen^{185;186,187}.

3.1.3 Wirkung von Aminothalidomid und Suramin auf Apoptose und Viabilität der CD-14⁺-Monozyten

3.1.3.1 Wirkung von Aminothalidomid

TNF α wirkt in Monozyten anti-apoptotisch²³. Die Hemmung der TNF α -Proteinbildung durch Thalidomid bzw. Aminothalidomid könnte daher pro-apoptotische Wirkungen hervorrufen. Ebenfalls wurde über die Hemmung der TNF α -induzierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kappaB, durch Thalidomid berichtet¹²⁹. Da der Transkriptionsfaktor NF-kappaB ebenfalls anti-apoptotisch wirkt, könnte die Apoptose auf diesem Wege indirekt durch Aminothalidomid beeinflusst werden¹²⁹. Die Apoptose wird in Monozyten durch anti-entzündliche Substanzen ausgelöst, sodass eine Beeinflussung der Apoptose durch Aminothalidomid vermutet wurde^{188;189}. Aminothalidomid beeinflusste hingegen die Apoptose innerhalb von 22 h in CD-14⁺-Monozyten nicht, wie die unveränderte Menge an mono- und oligonukleosomen DNA-Fragmenten im Zytoplasma (Abb. 20), und die unveränderte Aktivität der Caspase-3/7 zeigten (Abb. 22). Ebenfalls wurden keine zytotoxischen Effekte im AlamarBlue™ durch Aminothalidomid (Abb. 24) beobachtet. Von Gockel et al. wurde im Widerspruch dazu, die pro-apoptotische Wirkung von Thalidomid [10–50 μ g/ml] nach 36 h bzw. 72 h in Monozyten beschrieben, wobei die Apoptose über den intrinsischen Signalweg durch die Aktivierung der Caspase-3 ausgelöst wurde¹⁹⁰. Allerdings könnte es sich hierbei, aufgrund der hohen Konzentration von Thalidomid und dem späten Zeitpunkt der Untersuchung bei der beobachteten Apoptoseinduktion um Sekundäreffekte von Thalidomid handeln. Gockel et al. beobachtete kaum eine spontane Apoptose in Monozyten¹⁹⁰. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei Gockel et al. um eine andere Monozytenpopulation, als die in dieser Arbeit frisch isolierten verwendeten CD14⁺-Monozyten, handelt. Die Unterschiede in der spontanen Apoptose könnten durch die bei Gockel et al. erfolgte Konzentrierung der Leukozyten in buffy coats, der hierfür benötigten Zeit und somit höherem Alter der Monozyten resultieren.

3.1.3.2 Wirkung von Suramin

Die Wirkungen von Suramin bei der Beeinflussung der Zytokinbildung von TNF α , IL-12p40 und IL-10 wurden in Kap. 3.3 diskutiert. Suramin kann aufgrund seiner Größe und seiner polaren Ladung nicht durch die Zellmembran diffundieren, jedoch beschrieben Stein et al. den aktiven Transport von Suramin in die Zelle¹⁹¹.

Eine Beeinflussung intrazellulärer Vorgänge in CD-14⁺-Monozyten durch eine direkte Interaktion von Suramin mit intrazellulären Proteinen ist daher wahrscheinlich möglich. Unterstützt wird diese Vermutung dadurch, dass die Aktivität nukleärer Enzyme, wie beispielsweise der Reversen Transkriptase¹⁵¹, der DNA- und RNA-Polymerase¹⁹² und der DNA-Topoisomerase¹⁹³ durch Suramin beeinflusst wurde. Die veränderte Aktivität intrazellulärer Enzyme wurde in eigenen Versuchen ebenfalls beobachtet. So verringerte Suramin die Caspase3/7-Aktivität konzentrationsabhängig (Abb. 22) und dezimierte die Menge an mono- und oligonukleosomen DNA-Fragmenten im Zytoplasma nach 5 h bis um die Hälfte gegenüber der LPS-stimulierten Kontrolle (Abb. 20). Daher kann davon ausgegangen werden, dass Suramin die spontane Apoptose spezifisch, d.h. durch eine Verringerung der Caspase3/7-Aktivität bewirkte und hierdurch eine erhöhte Viabilität der CD-14⁺-Monozyten (Abb. 24) bewirkte. Die anti-apoptotische Wirkung von Suramin wurde erstmals kürzlich in Leber- und Lymphknotenzelllinien aufgrund einer verminderten Caspase-3-Aktivität gezeigt¹⁹⁴. Ob die verminderte Apoptose in CD-14⁺-Monozyten durch Suramin ebenfalls Enzyme des extrinsischen oder intrinsischen Signalweges beeinflusst werden, kann nicht mit Bestimmtheit gesagt werden, da bei beiden Signalwegen eine Aktivierung der Caspasen-3/-7 erfolgt²². Suramin könnte die durch TNF α -Protein induzierte Apoptose, ähnlich wie in einer Mausleberzelllinie beschrieben, dezimieren¹⁹⁴. Mechanistisch gesehen, könnte dies durch die gezeigte Oligomerisierung und damit Inaktivierung des biologisch aktiven TNF α -Proteins durch Suramin erfolgen¹⁹⁵. Eine weitere mögliche Wirkung von Suramin, könnte durch die beschriebene antagonistische Wirkung von Suramin am P2Y Rezeptor erfolgen¹⁹⁶. Humane Monozyten exprimieren den purinen P2Y Rezeptor P2X7¹⁹⁷. Die P2Y Rezeptoren binden extrazelluläres ATP bzw. UTP und aktivieren die Proteinkinase B und wirken anti-apoptotisch¹⁹⁸. Daher könnte Suramin aufgrund seiner antagonistischen Wirkung am P2Y Rezeptor, wie auch von Eichhorst et al. vermutet, ebenfalls pro-apoptotisch wirken¹⁹⁴. Weitere intrazelluläre Wirkungen von Suramin im Zusammenhang mit der p38-MAPK-Aktivierung werden in Kap. 3.5.4 diskutiert.

3.2 Die Wirkungen von Aminothalidomid nach LPS-Stimulation

Bei der Zytokinbildung tragen die Menge und der Zeitpunkt der Sekretion, wie an der vorübergehenden Bildung der pro-entzündlichen Zytokine (TNF α , IL-12) und der anschließenden Produktion des anti-entzündlichen Zytokins IL-10 gezeigt, zur Regulation der Immunantwort bei¹⁹⁹. IL-10 hemmt die Zytokinsynthese und Expression kostimulatorischer Oberflächenproteine auf den Monozyten autoregulatorisch, wodurch die Immunantwort des Th1-Typs gehemmt wird²⁰⁰. Insofern war die Entdeckung, dass IL-10-Knockout Mäuse eine schwere chronische Enterocolitis entwickeln oder nach der Infektion mit *Toxoplasma gondii* aufgrund einer Überproduktion an IL-12, TNF α und IFN- γ versterben, nicht überraschend^{52,90}. Interessanterweise zeigten IL-10-Knockout Mäuse nur eine geringe und verzögerte Infektion des proximalen Dickdarms, wenn sie in keimfreier Umgebung gehalten werden⁵². Die Befunde lassen vermuten, dass Bestandteile der mikrobiellen Darmflora zur Pathogenese von entzündlichen Darmerkrankungen beitragen. Diese These wird durch weitere Studien in Stat3-Knockout Mäusen, bei welchem im Knochenmark das Signalprotein Stat3 (Stat3 ist maßgeblich für die IL-10-Signalweiterleitung verantwortlich) deletiert wurde, unterstützt. Kobayashi et al. zeigte, dass die Entwicklung einer chronischen Enterocolitis in Stat3/TLR4-Mäusen von der, über den TLR4, aktivierten Bildung von IL-12p40 abhängig war²⁰¹. Damit wurde gezeigt, dass das Gleichgewicht zwischen den pro-entzündlichen Zytokinen TNF α , IL-12 und dem anti-entzündlichen Zytokin IL-10 von entscheidender Bedeutung in diesen Modellen für entzündliche Darmerkrankungen ist. In diesem Zusammenhang führten die Wirkungen von Thalidomid auf die Synthese der Zytokine TNF α , IL-12 und IL-10 sowie die erfolgreiche Behandlung von Erkrankungen im Verdauungstrakt durch Thalidomid dazu, dass die Wirkung von Aminothalidomid auf die Bildung dieser drei Zytokine näher charakterisiert wurde^{116,119;124,202}.

3.2.1 Wirkung im Proteinarray

Shannon et al. berichtete, dass Thalidomid die LPS-induzierte TNF α -Sekretion in adhärenenten mononukleären Zellen erhöhte, während in LPS-stimulierten PBMCs diese verringert wurde¹²¹. Im Gegensatz dazu, wurde die hemmende Wirkung von Thalidomid auf die LPS-induzierte Bildung von MCP-1, IL-1 β , IL-12 in Monozyten, PBMCs, Gesamtblutproben oder THP-1-Zellen durch verschiedene Arbeitsgruppen gezeigt (Tab. 3). Corall et al. zeigte, dass Thalidomidderivate die Bildung der Zytokine TNF α deutlich stärker beeinflussten als Thalidomid^{112,117}. Dieses Ergebnis wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt (Abb. 26). Zusätzlich zur stärkeren Hemmung der TNF α -Freisetzung, hemmte Aminothalidomid die Bildung der pro-inflammatorischen Zytokine MCP-1, IL-1 β , IL-8, IL-6 in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten (Abb. 25). Die hemmende Wirkung von Thalidomid und Aminothalidomid auf die IL-12p70-Proteinbildung wurde nicht beobachtet, da LPS-stimulierte CD-14⁺-Monozyten in Abwesenheit von IFN- γ nur geringe Mengen an IL-12p70 in den Kulturüberstand sezernieren (Abb. 25)¹⁷⁵.

Die stärkere Beeinflussung der Zytokinbildung von MCP-1, IL-1 β , IL-8 (Abb. 25), IL-12p40- und IL-10-Bildung (Abb. 27, Abb. 28) durch Aminothalidomid im Vergleich zu Thalidomid, trifft nicht nur auf die bereits beschriebene TNF α -Bildung, sondern auch auf die Beeinflussung der eben genannten Zytokine zu¹¹². Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Aminothalidomid das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-entzündlichen Zytokinen bei einer Infektion zugunsten der Bildung von anti-entzündlichen Zytokinen verschieben könnte. Hierbei scheint Aminothalidomid diese mögliche Verschiebung über mindestens zwei Angriffspunkte zu bewirken: I. über die Hemmung der pro-entzündlichen Zytokine wie MCP-1, IL-1 β , IL-8, TNF α und II. über die gleichzeitige Steigerung der anti-entzündlichen Zytokine wie beispielsweise IL-10.

3.2.2 Wirkung auf die TNF α -, IL-12p40- und IL-10-Bildung

3.2.2.1 Wirkung von Aminothalidomid auf die TNF α -Bildung

In eigenen Versuchen hemmte Thalidomid mit 50 μ g/ml (194 μ M) die TNF α -Freisetzung von CD-14⁺-Monozyten um 48 % (Abb. 26), wodurch die 50-70 %ige Hemmung der TNF α -Bildung in LPS-stimulierten Monozyten und LPS-stimulierten PBMCs bestätigt wurde^{117,116}. Die Freisetzung des TNF α -Proteins wurde innerhalb der ersten 30 min nach LPS-Stimulation durch Aminothalidomid im Vergleich zur LPS-Kontrollgruppe nicht beeinflusst (Abb. 60D), während die erste Verringerung der TNF α -Proteinmenge nach 1,5 h LPS-Stimulation beobachtet wurde (Abb. 60A). Aminothalidomid beeinflusste die Freisetzung des TNF α -Proteins in CD-14⁺-Monozyten, welche durch Anisomycin (Translationshemmung)¹⁷⁰ stimuliert worden sind, nicht (Abb. 61B). Dieses Ergebnis zeigte, dass Aminothalidomid die TNF α -Bildung nicht auf Proteinebene beeinflusst.

Ferner deutet die, durch Aminothalidomid dezimierte TNF α -mRNA-Bildung in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten (Abb. 30) darauf hin, dass Aminothalidomid die TNF α -Proteinbildung über die verminderte Genexpression reguliert. Zunächst wurde der verstärkte Abbau der TNF α -mRNA als Ursache für die Wirkung von Thalidomid angenommen¹²⁵. Allerdings konnte dieser verstärkte Abbau der TNF α -mRNA weder für Thalidomid noch ein anderes Thalidomidanalog bestätigt bzw. gezeigt werden¹²². In Gegenwart von Aminothalidomid wurde nach 1,5 h die Hälfte der TNF α -mRNA-Menge der LPS-stimulierten Kontrolle nachgewiesen, während diese nach 7 h fast vollständig reduziert war (Abb. 30). Aufgrund der beschriebenen Kinetik der Beeinflussung der TNF α -mRNA-Menge und der strukturellen Ähnlichkeit von Aminothalidomid zu Thalidomid, ist anzunehmen, dass Aminothalidomid den Abbau der TNF α -mRNA nicht vermindert. Die, erst zu späteren Zeitpunkten der LPS-Stimulation (nach 1,5 h) verringerte der TNF α -mRNA-Menge (Abb. 30), könnte bedeuten, dass Aminothalidomid den LPS-induzierten Signalweg (über TLR4) nicht direkt, sondern indirekt beeinflusst. So könnte der Transkriptionsfaktor NF- κ B, welcher sowohl über den TLR4- als auch über den TNF α -induzierten Signalweg aktiviert werden kann, durch Aminothalidomid beeinflusst werden^{11;45}. Unterstützt wird diese Vermutung durch die beschriebene Behinderung der TNF α -induzierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch Thalidomid, während die LPS-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B nicht beeinflusst wurde¹²⁹.

Falls Aminothalidomid den gleichen Mechanismus wie Thalidomid beeinflusst, könnte daher die Verringerung der TNF α -mRNA durch die, dem LPS-Signalweg nachgeschaltete und reduzierte TNF α -induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B erfolgen. Eigene Untersuchungen zeigten, dass Aminothalidomid in Gegenwart von rhTNF α -Protein, wie bei der Stimulation durch LPS, die Bildung von IL-12p40 verringerte und die IL-10-Proteinbildung steigerte (Abb. 50). Dieses Ergebnis unterstützt die mögliche Beeinflussung eines weiteren -dem LPS-Signal nachgeschalteten- Signalweges durch Aminothalidomid.

Die von Muller et al. gezeigte stärkere Hemmung der TNF α -Proteinbildung durch Aminothalidomid im Vergleich zu Thalidomid in PBMCs bzw. im Gesamtblut wurde bestätigt (Abb. 38)¹¹². Im Widerspruch zur unterschiedlich stark hemmenden Wirkung der TNF α -Proteinbildung durch Aminothalidomid in PBMCs und Gesamtblut (Faktor 15.000 bzw. 50.000)¹¹², verringerte Aminothalidomid in eigenen Versuchen die LPS-stimulierte TNF α -Bildung in CD-14⁺-Monozyten, in PBMCs und Gesamtblut mit einer ähnlichen Stärke (Abb. 38).

Dieses Ergebnis wurde vermutet, da TNF α -Protein nach LPS-Stimulation hauptsächlich von Monozyten bzw. Makrophagen sezerniert wird⁵⁴. Diese beiden Zellen produzierten somit in der Population des Gesamtblut bzw. der PBMCs das TNF α -Protein, was anhand der größten TNF α -Proteinmenge im Kulturüberstand der CD-14⁺-Monozyten sichtbar wurde (Abb. 38). Ein Einfluss anderer Zellen, welche zur Zytokinproduktion in PBMCs oder Gesamtblutproben beitragen, wie beispielsweise IFN- γ in der Gegenwart von LPS und T-Zellen kann nicht ausgeschlossen werden. Für Thalidomid wurde, in Abhängigkeit vom Zelltyp und der Methode der Aktivierung, eine in beide Richtungen beeinflusste TNF α -Bildung berichtet²⁰³. Daher könnte Aminothalidomid die TNF α -Bildung, der in Gesamtblut oder PBMCs vorhandenen T-Zellen beeinflussen.

Allerdings spricht die in eigenen Versuchen gezeigte, ähnlich starke Hemmung der TNF α -Bildung in CD-14⁺-Monozyten, PBMCs und Gesamtblut (Abb. 38) dafür, dass die hemmende Wirkung von Aminothalidomid auf die LPS-stimulierte TNF α -Bildung der CD-14⁺-Monozyten gegenüber einer möglichen Steigerung der TNF α -Bildung in T-Zellen nach Antigenstimulation überwiegt¹¹⁹.

3.2.2.2 Wirkung von Aminothalidomid auf die IL-12p40-Bildung

Die für Thalidomid und Aminothalidomid beschriebene, signifikante Hemmung der LPS-induzierten IL-12p40-Bildung in CD-14⁺-Monozyten nach 24 h wurde bestätigt (Abb. 27)¹¹⁷. Der erste Hinweis, dass die Hemmung von IL-12 durch Thalidomid möglicherweise unabhängig von der IL-10-Bildung erfolgt, resultierte aus Untersuchungen in *Staphylococcus aureus* stimulierten PBMCs von Moller et al., da Thalidomid hier auch in Gegenwart von anti-IL-10 Antikörpern die IL-12p70-Bildung um 50 % hemmte¹²⁴. Da aber PBMCs verwendet wurden, können indirekte Wirkungen von Thalidomid über die Wechselwirkung mit anderen Zellen nicht ausgeschlossen werden, zumal berichtet wurde, dass Thalidomid die IL-12-Produktion in Abhängigkeit vom Zelltyp und Stimulus steigerte oder hemmte^{124;204,119}. Thalidomid hemmte die IL-12p40-mRNA nach 4 h leicht und steigerte diese nach 12 h, sodass die Untersuchungen von Moller et al. letztendlich nicht zeigen konnten, ob die IL-12p40-mRNA durch Thalidomid beeinflusst wurde¹²⁴.

Weiterhin wurde bei Moller et al. die IL-10-Synthese in PBMCs durch Thalidomid dezimiert, was im Widerspruch zu der in dieser Arbeit gezeigten IL-10-Erhöhung in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten steht (Abb. 28)¹²⁴. Von Coral et al. wurde die gegensätzliche Wirkung von Thalidomid auf die IL-10-Proteinbildung in PBMCs in Abhängigkeit vom Stimulus (LPS bzw. anti-CD3) beschrieben¹¹⁹. Diese unterschiedlichen Ergebnisse bekräftigten die Entscheidung, die Untersuchungen in einer definierten Zellpopulation (CD-14⁺-Monozyten) mit definiertem Stimulus (LPS) durchzuführen.

In eigenen Untersuchungen bewirkte Aminothalidomid eine leichte Erhöhung der IL-12p40-mRNA innerhalb der ersten 3-7 h gegenüber der unstimulierten LPS-Kontrolle (Abb. 32) und blockierte die IL-12p40-mRNA (nach 3 h, Abb. 32) in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten. Diese Blockierung durch Aminothalidomid war auf Proteinebene nach 7 h zu beobachten (Abb. 31). Diese hemmende Wirkung von Aminothalidomid auf die IL-12p40-Bildung erfolgte nicht aufgrund einer unterschiedlichen Zellzahl, da in den Versuchen die gleiche Anzahl an CD-14⁺-Monozyten für jede Behandlungsgruppe eingesetzt wurde (Kap. 5.4.4).

Es erfolgte ebenfalls keine Beeinflussung des Stoffwechsels der CD-14⁺-Monozyten, da die Menge der GAPDH-mRNA und weiterer 3 Haushaltsgene durch Aminothalidomid im Vergleich zur LPS-Kontrollgruppe nicht verändert wurde (Abb. 18). Die Untersuchungen zur Apoptose (Abb. 20), der Aktivierung der Caspase-3/7 (Abb. 22) und der Nekrose (Abb. 23) zeigten, dass die Lebensfähigkeit der CD-14⁺-Monozyten durch Aminothalidomid nicht beeinflusst wurde und daher die verringerte IL-12 Synthese (mRNA und Protein) nicht aufgrund einer Veränderung der Lebensfähigkeit der CD-14⁺-Monozyten erfolgte. Die leichte Erhöhung der IL-12p40-mRNA innerhalb der ersten 3-6 h durch Aminothalidomid (Abb. 32), deutet darauf, dass die hemmende Wirkung von Aminothalidomid auf die IL-12p40-Bildung möglicherweise indirekt erfolgt. Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, dass Aminothalidomid zeitlich vor oder zumindest gleichzeitig mit dem LPS zu den CD-14⁺-Monozyten gegeben werden muss, damit die nahezu vollständige Hemmung der IL-12p40-Bildung beobachtet werden kann, denn wenn Aminothalidomid erst nach 4 h LPS-Stimulation zu den CD-14⁺-Monozyten gegeben wurde, so wurde nur noch 50 % der IL-12p40-Proteinbildung gehemmt (Daten nicht gezeigt). Moller et al. schlug vor, dass die IL-12-Hemmung durch Thalidomid zumindest teilweise durch posttranskriptionelle Mechanismen, wie durch einen erhöhten Abbau der IL-12p40-mRNA erfolgen könnte¹²⁴. Allerdings ist der IL-12p40-Promotor komplex reguliert, wobei die Beteiligung verschiedener Transkriptionsfaktoren und eines Repressorproteins diskutiert wird^{74;205,206}. Daher könnten Aminothalidomid bzw. Thalidomid die IL-12p40-Bildung ebenfalls auf transkriptioneller Ebene regulieren. Die Frage, ob Aminothalidomid die IL-12p40-Bildung direkt oder indirekt bewirkte, wird in Kap. 3.2.2.3 diskutiert.

3.2.2.3 Wirkung von Aminothalidomid auf die IL-10-Bildung

Die veröffentlichten Ergebnisse zur Wirkung von Thalidomid auf die IL-10-Proteinbildung sind widersprüchlich^{119;122;124}. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen wurde eine Steigerung der IL-10-Proteinbildung durch das Lösungsmittel DMSO beobachtet (Tab. 10)¹²². Marriott et al. zeigte, dass Thalidomid die IL-10-Bildung nicht veränderte, da Thalidomid die IL-10-Bildung in LPS-stimulierten Gesamtblut in der gleichen Stärke wie DMSO beeinflusste¹²².

Im Widerspruch hierzu, zeigten die eigenen Untersuchungen, dass Aminothalidomid in LPS-stimulierten Gesamtblut, wie auch in CD-14⁺-Monozyten die IL-10-Proteinbildung im Vergleich zur LPS-Kontrolle steigerte (Abb. 28). Auch die IL-10-mRNA-Bildung wurde durch Aminothalidomid gesteigert, wobei ein schneller Anstieg bis 6 h und eine anhaltende IL-10-mRNA-Menge zwischen 6 h-18 h beobachtet wurde (Abb. 34). Eine Beeinflussung der transkriptionellen Induktion oder Stabilität der IL-10-mRNA durch Aminothalidomid in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten ist daher wahrscheinlich. Hierbei scheinen die Transkriptionsfaktoren, CREB (cyclic AMP response element binding factor) und AP-1 (activator protein-1) bei der Regulation des IL-10-Promotors eine wichtige Rolle zu spielen^{207,206}.

Nachdem gezeigt wurde, dass durch Aminothalidomid die IL-12p40-Proteinbildung gehemmt und die IL-10-Proteinbildung gesteigert wurde, stellte sich die Frage, wie die Zytokinbildung reguliert wurde. Die Ergebnisse des ELISpot zeigen, dass Aminothalidomid, nicht die sezernierte Zytokinmenge eines einzelnen CD-14⁺-Monozyten verändert, sondern dass, die sezernierte Zytokinmenge über eine veränderte Anzahl an IL-12(p40)- bzw. IL-10-Proteinsezernierenden CD-14⁺-Monozyten reguliert wurde (Abb. 35, Tab. 7). In Gegenwart von Aminothalidomid wurde das IL-10-Protein und die IL-10-mRNA im Vergleich zur LPS-Kontrollgruppe früher nachgewiesen (Abb. 33, Abb. 34). Diese zeitigere IL-10-Produktion kann durch die, in Gegenwart von Aminothalidomid erhöhte Anzahl an IL-10-sezernierenden CD-14⁺-Monozyten erklärt werden. Die Methode des ELISpot ist die zur Zeit sensitivste und spezifischste Methode zum Zytokinnachweis³⁴. Daher erklärt sich die, durch Aminothalidomid im ELISpot gezeigte höhere IL-10-Produktion (6-fache Steigerung gegenüber der LPS-Kontrolle, (Tab. 6)) im Vergleich zur im ELISA gezeigten, 2-3-fachen Steigerung der IL-10-Produktion (Abb. 33). Die Ergebnisse des ELISpot implizieren, dass einzelne CD-14⁺-Monozyten das IL-12(p40) und/oder IL-10 produzieren und, dass die Produktion dieser beiden Zytokine durch Aminothalidomid nahezu vollständig in Richtung IL-10-Bildung verschoben wird.

In LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten erfolgte die Sekretion des Zytokins IL-12p40 (nach 6 h, Abb. 31) vor der Sekretion von IL-10 (nach 9 h, Abb. 33). Aufgrund der beschriebenen, hemmenden Wirkung von IL-10-Protein auf die IL-12p40-Bildung, könnte Aminothalidomid die Bildung beider Zytokine entweder direkt oder indirekt beeinflussen⁶⁰. Die Neutralisation des endogenen IL-10-Proteins durch anti-IL-10-Antikörper steigerte die IL-12p40-Proteinmenge und bestätigte die bekannte hemmende Wirkung von IL-10-Protein auf die IL-12p40-Proteinmenge (Abb. 36)⁶⁰. Aminothalidomid hemmte die IL-12p40-Bildung sowohl in Gegenwart von neutralisierenden IL-10-Antikörpern, als auch in Gegenwart der Kontroll-Antikörper (Abb. 36).

Dies bedeutet, dass obwohl das endogene (durch LPS-induzierte) IL-10-Protein durch anti-IL-10-Antikörper gebunden und somit neutralisiert wurde, die IL-12p40-Bildung durch Aminothalidomid unterdrückt wurde. Daher erfolgt die IL-12p40-Hemmung größtenteils unabhängig von der IL-10-Steigerung durch Aminothalidomid, auch wenn die gesteigerte IL-10-Proteinmenge zur verringerten IL-12p40-Proteinbildung beiträgt. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch die Tatsache, dass wenn IL-10-Protein durch Suramin inaktiviert wurde (Kap. 2.3.2.2) oder die IL-10-Proteinbildung durch den p38-MAPK-Inhibitor SB203580 verringert wurde, Aminothalidomid ebenfalls in der Lage war die erhöhte IL-12p40-Proteinmenge zu hemmen (Abb. 57, Abb. 37).

3.3 Die Wirkungen von Suramin nach LPS-Stimulation

Suramin besitzt anti-proliferative, angiostatische und anti-neoplastische Eigenschaften und wirkt vielfältig (Kap. 1.5). Aufgrund, der für Suramin beschriebenen Wirkungen *in vitro* wurden verschiedene Möglichkeiten für die Beeinflussung der Zytokinbildung in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten durch Suramin erwartet.

3.3.1 Wirkung von Suramin auf das IL-10-Protein

Überraschend war der Befund, dass in Gegenwart von 200 μ M Suramin je nach verwendetem ELISA (Fa. Biosource und Fa. R&D Systems, Kap. 5.5.1) unterschiedliche Mengen an IL-10-Protein im Kulturüberstand LPS-stimulierter Monozyten gemessen wurden (Abb. 12, Abb. 47), was durch die unterschiedliche Spezifität der verwendeten Antikörper zu erklären ist (Kap. 5.5.1). Die Erst-Antikörper beider Firmen wurden gegen biologisch aktives rhIL-10-Protein hergestellt und auf die Erkennung von biologisch aktivem IL-10 getestet und eigene Versuche bestätigten die Erkennung von biologisch aktivem rhIL-10-Protein durch beide ELISA's (Abb. 13)^{208,209}.

Die Erkennung von biologisch inaktivem rhIL-10-Protein erfolgte in beiden ELISA's unterschiedlich. Die zwei Disulfidbrücken innerhalb der α -Helices der IL-10-Monomere, welche für die Erhaltung der Struktur des IL-10-Homodimers und damit für die Erhaltung der biologischen Aktivität des IL-10-Proteins notwendig sind, wurden durch Zugabe von DTT reduziert^{85,157}. Weiterhin wurde durch eine Temperaturerhöhung (Abb. 13) die Struktur des IL-10-Proteins zerstört¹⁵⁶. Weder chemisch noch thermisch inaktiviertes rhIL-10-Protein wurde im ELISA der Fa. Biosource gemessen, während der R&D-ELISA sowohl chemisch als auch thermisch inaktiviertes rhIL-10-Protein detektierte (Abb. 13). Die beobachtete Verdoppelung des chemisch und thermisch denaturiertem rhIL-10-Proteins im ELISA der Fa. R&D (Abb. 13) deutet darauf, dass die verwendeten Antikörper im ELISA der Fa. R&D das IL-10-Protein möglicherweise auch erkennen, wenn es in zwei Monomeren und damit biologisch inaktiv vorliegt. Es wurde jedoch von beiden Firmen nicht untersucht, ob die eingesetzten Antikörper beider ELISA's das biologisch inaktive IL-10-Protein bzw. das biologisch inaktive IL-10-Monomer erkennen (persönliche Auskunft von D. Degels, Fa. Biosource bzw. M.Hoffmann, Fa. R&D Systems). Im ELISA der Fa. Biosource wurde in Gegenwart von 200 μ M Suramin kein rhIL-10-Protein gemessen, während dieses im R&D-ELISA nachgewiesen wurde (Abb. 12). Aus diesen Ergebnissen lassen sich die folgende zwei Hypothesen formulieren.

1. Der Biosource ELISA erkennt grundsätzlich nur IL-10-Protein, welches in seiner biologisch aktiven Konformation vorliegt, während der R&D-ELISA die absolute Menge an IL-10-Protein (biologisch aktives und inaktives IL-10-Protein) detektiert. Somit wäre eine Unterscheidung zwischen biologisch aktivem und biologisch inaktivem IL-10-Protein durch die Verwendung beider IL-10-Antikörper möglich.
2. Suramin inaktiviert biologisch aktives IL-10-Protein.

Um die erste These zu testen, sind Untersuchungen mit unterschiedlichen Konformationen des IL-10-Proteins im IL-10 Bioassay notwendig, daher wurde zunächst die zweite These überprüft.

Die zweite These wurde bestätigt, da die Inaktivierung von biologisch aktivem IL-10-Protein in Gegenwart von 200 μM Suramin erstmals nachgewiesen wurde, indem die hemmende Wirkung von rhIL-10-Protein auf die Bildung von TNF α - und IL-12(p40)-Protein in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten in Gegenwart von Suramin verringert wurde (Tab. 8)²¹⁰.

Der im Biosource-ELISA bei Zugabe von Suramin verringerte Nachweis an IL-10-Protein, im Kulturüberstand von CD-14⁺-Monozyten -sowohl zu Beginn als auch zu Ende der 24-stündigen LPS-Stimulation (Abb. 47)- beruhte daher auf einer konzentrationsabhängigen Inaktivierung des IL-10-Proteins durch Suramin. Suramin beeinflusste die IL-10-mRNA-Bildung nicht (Abb. 46) und die mit dem R&D-ELISA gemessene Menge an IL-10-Protein wurde, unabhängig davon, zu welchem Zeitpunkt die Zugabe von Suramin erfolgte, nicht verändert (Abb. 47). Diese Ergebnisse zeigen, dass Suramin die LPS-induzierte IL-10-Proteinbildung in den CD-14⁺-Monozyten nicht per se beeinflusste, sondern die nachweisbare Proteinmenge an biologisch aktivem IL-10 verringerte. Auch in Gesamtblut wurde im ELISA der Fa. Biosource in Gegenwart von 200 μM Suramin kein IL-10-Protein gemessen (Daten nicht gezeigt). Dies ist insofern erstaunlich, da Suramin auch an andere Proteine im Gesamtblut (z.B. Albumin, Calmodulin) bindet oder um die Bindungsstelle mit Heparin konkurriert^{135;211}. Im Gesamtblut sollte daher die Konzentration von 200 μM Suramin geringer als in der CD-14⁺-Monozyten-Kultur sein. Da dennoch kein IL-10-Protein im Gesamtblut nachgewiesen wurde, scheint die Bindung von Suramin an das IL-10-Protein, trotz weiterer möglicher Wechselwirkungen mit anderen Proteinen sehr spezifisch zu erfolgen. Diese Ergebnisse haben insofern klinische Relevanz, da in der therapeutischen Anwendung die Suraminkonzentration im Serum mit 10 μM –200 μM bestimmt wurde^{135,191}. Die Inaktivierung der biologischen Aktivität des IL-10-Proteins könnte durch die Beeinflussung der Konformation des biologisch aktiven IL-10-Homomers durch Suramin verursacht werden.

De Groote et al. beschrieb, dass der Erst-Antikörper der Fa. Biosource an ein Epitop des IL-10-Proteins bindet, welches für die Rezeptorbindung und die Auslösung der biologischen Aktivität notwendig ist²⁰⁹. Möglicherweise wird die Erkennung des IL-10-Proteins in Gegenwart von Suramin (Abb. 13) dadurch verhindert, da Suramin die Bindung des Erst-Antikörpers der Fa. Biosource an das IL-10-Protein direkt (durch die Bindung von Suramin an das IL-10-Protein direkt an der Bindungsstelle des Antikörpers) oder indirekt (Bindung von Suramin an das IL-10-Protein in die Nähe der Bindungsstelle des Antikörpers) verhindert. Bisher wurde durch beide Firmen nicht untersucht, an welche Epitope die verwendeten Antikörper beider ELISA's binden (persönliche Auskunft von D. Degels, Fa. Biosource bzw. M. Hoffmann, Fa. R&D Systems). Jedoch unterstützen Berichte über die Bindung von Suramin an verschiedene Proteine die Hypothese der direkten Bindung von Suramin an die Rezeptorbindungsstelle des IL-10-Proteins^{135;212;213}.

So wurde erstmals von Hosang et al. vorgeschlagen, dass das Suramin die Bindung des Wachstumsfaktors PDGF (platelet-derived growth factor) an seinen Rezeptor verhindert, indem es selbst an, an der Bindung beteiligte, positiv geladene Aminosäurereste von PDGF bindet¹³⁹. Die Untersuchungen von Raj et al. mittels „proton nuclear magnetic resonance“ (¹H-NMR) deuten darauf hin, dass das Suramin durch verschiedene Mechanismen die Bindung von PDGF und anderen Wachstumsfaktoren an die entsprechenden Rezeptoren verhindern kann¹³⁶.

Suramin reagierte mit PDGF über Ionenpaarbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals Kräfte. Zusätzlich wurde die Bindung an PDGF aufgrund seiner Größe und der vielfältigen Konformationen von Suramin sterisch verhindert¹³⁶. Daher wäre eine direkte oder indirekte Bindung von Suramin in der Nähe der Bindungsstelle des IL-10-Proteins durch den Erst-Antikörper des IL-10-ELISA's der Fa. Biosource denkbar¹³⁶. Strassmann et al. zeigte, dass das Suramin ebenfalls das Binden des IL-1-Proteins an seine Rezeptoren verhindert und somit die biologische Aktivität des IL-1-Proteins neutralisiert²¹³. Der IC_{50} -Wert von Suramin für die Verhinderung der Bindung von IL-1 α bzw. IL-1 β an ihre Rezeptoren betrug 204 μ M bzw. 186 μ M und liegt damit im gleichen Konzentrationsbereich wie, die in dieser Arbeit gezeigte IL-10-Wirkung von Suramin (Kap. 2.3). Einmal an den IL-1-R gebundenes IL-1-Protein konnte nicht mehr vom Rezeptor verdrängt werden, wodurch Strassmann et al. zu der Vermutung kam, dass das Suramin direkt an das IL-1-Protein bindet und somit die Domänen zur Bindung des IL-1R blockiert²¹³. Für TNF α wurden ähnliche Beobachtungen beschrieben, denn Suramin bindet an das TNF α -Protein und verhindert dadurch die Bindung von TNF α an die TNF-Rezeptoren¹⁹⁵. Alzani et al. zeigte zusätzlich, dass das Suramin auch die Oligomerisierung von TNF α verhindert¹⁹⁵. Da die Bindung von Suramin an das TNF α -Protein schneller als die Oligomerisierung von TNF α durch Suramin erfolgte, geht Alzani et al. jedoch davon aus, dass die Bindung von TNF α -Protein durch Suramin der frühzeitigere Wirkmechanismus für die Hemmung der Rezeptorbindung ist¹⁹⁵. Daher wäre auch denkbar, dass Suramin die Konformation des IL-10-Homodimers, ähnlich wie beim TNF α -Trimer zerstören oder teilweise verändern könnte. Würde Suramin die Dimerisierung des IL-10-Proteins verhindern, wäre dieses biologisch inaktiv. Dies würde erklären, wieso Suramin das biologisch aktive IL-10-Protein inaktiviert und dadurch die durch IL-10 vermittelte Steigerung von IL-12(p40)- und TNF α -Protein, verhinderte (Tab. 8).

Die Reduktion von Disulfidbrücken durch DTT führt zum Verlust der biologischen Aktivität¹⁵⁷, was sich darin äußerte, dass in Gegenwart von DTT kein biologisch aktives IL-10-Protein im Biosource-ELISA nachgewiesen wurde (Abb. 13). Suramin verstärkte die durch DTT verringerte Erkennung von biologisch aktivem IL-10 konzentrationsabhängig (Abb. 14). Daraus lässt sich ableiten, dass das Suramin möglicherweise die Erkennung von IL-10 durch einen weiteren, zusätzlichen Wirkmechanismus als durch chemische Denaturierung und eines daraus resultierenden Zerfalls des IL-10-Homodimers bewirken könnte. So könnte Suramin auf das IL-10-Protein –ähnlich wie für die Wirkung auf das TNF α -Protein gezeigt– mit mindestens zwei unterschiedlichen Mechanismen die Inaktivierung der biologischen Aktivität bewirken¹⁹⁵.

3.3.2 Wirkung von Suramin auf die TNF α - und IL-12p40-Bildung

Suramin beeinflusste weder die Messung von IL-12p40- noch von TNF α -Protein, wenn es nach 24 h LPS-Stimulation zu den CD-14⁺-Monozyten gegeben wurde (Abb. 40B+D). Die Erkennung des Standardproteins im ELISA von IL-12p40 und TNF α wurde nicht beeinflusst (Abb. 11). Dagegen erhöhte Suramin die IL-12p40- und TNF α -Bildung bei sofortiger Gabe zu den CD-14⁺-Monozyten nach 24 h LPS-Stimulation (Protein und mRNA) konzentrationsabhängig (Abb. 41-Abb. 44).

Im ELISpot wurde die steigernde Wirkung von Suramin auf die IL-12(p40)-Bildung erstmals nachgewiesen, was darauf schliessen lässt, dass Suramin die Erhöhung der IL-12(p40)-Bildung über eine Steigerung der Anzahl an IL-12(p40)-sezernierenden CD-14⁺-Monozyten bewirkt (Abb. 49).

Die TNF α - und IL-12(p40)-Proteinerhöhung im Kulturüberstand der LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten (Tab. 8) erfolgte daher indirekt über die Inaktivierung des IL-10-Proteins durch Suramin. Unterstützt wird diese Aussage dadurch, dass je später nach LPS-Stimulation die Substanzzugabe erfolgte, Suramin sowohl die TNF α - (Daten nicht gezeigt) als auch IL-12p40-Proteinmenge geringer steigerte (Tab. 9). Auf die indirekte Erhöhung des IL-12p40- und TNF α -Proteins durch Suramin deutet zusätzlich die Kinetik der Bildung der Zytokine. Suramin verringerte nach 30 min LPS-Stimulation die TNF α -Proteinmenge im Kulturüberstand (Abb. 60D). Die Erhöhung der TNF α - und IL-12p40-Proteinmenge durch Suramin wurde erst nach 15 h LPS-Stimulation beobachtet (Abb. 41, Abb. 43).

Die Wirkung von Suramin auf die LPS-stimulierte Bildung von TNF α wurde bisher nur von LaPushin et al. untersucht, wobei Suramin in LPS und IFN- γ -stimulierten Monozyten die Bildung von TNF α nach 24 h nicht beeinflusste²¹⁴. In Monozyten, welche mit IFN- γ behandelt worden sind, werden zusätzliche Signalwege zur LPS-Stimulation aktiviert, sodass der beobachtete Unterschied zwischen den eigenen Ergebnissen zur TNF α -Bildung und dem Ergebnis von LaPushin et al. in dieser zusätzlichen Aktivierung liegen könnte¹¹.

3.4 Wirkungen von Aminothalidomid und Suramin nach TNF α -Stimulation

LPS-induziertes, endogen gebildetes TNF α kann über die Bindung an den TNFRII zu einer Aktivierung der CD-14⁺-Monozyten führen, sodass durch LPS sowohl der TLR4-Signalweg als auch der TNFRII-Signalweg die Bildung weiterer Zytokine induzieren kann^{176,11}. Zur TNF α -induzierten IL-12p40- bzw. IL-10-Proteinbildung finden sich keine bzw. nur widersprüchliche Ergebnisse in der Literatur. So beschrieb Wanidworanum et al. die Bildung von IL-10-Protein nach TNF α -Stimulation, während Daigle et al. keine TNF α -induzierte IL-10-Bildung in Monozyten beobachtete^{61;215}. In dieser Arbeit wurde im Kulturüberstand der CD-14⁺-Monozyten mehr IL-10-Protein nach Stimulation mit rhTNF α -Protein als bei unstimulierten CD-14⁺-Monozyten detektiert (Abb. 50B), wodurch die TNF α -induzierte Bildung von IL-10-Protein, welche durch Wanidworanum et al. gezeigt wurde, bestätigt wurde⁶¹.

Interessanterweise bewirkte **Aminothalidomid** auch bei Stimulation der CD-14⁺-Monozyten mit TNF α -Protein eine Steigerung der IL-10-Proteinbildung und eine Hemmung der IL-12p40-Bildung (Abb. 50A+B). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Aminothalidomid möglicherweise in einen Signalweg eingreift, welcher sowohl bei Stimulation mit LPS als auch mit TNF α -Protein aktiviert wird.

Wurde in Gegenwart von rhTNF α -Protein, das endogene IL-10-Protein durch **Suramin** inaktiviert (Abb. 50B), war eine erhöhte Menge an IL-12p40-Protein im Kulturüberstand nachweisbar (Abb. 50A). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Zytokin TNF α die Bildung von IL-12p40 zwar induzieren kann, aber die hemmende IL-10-Wirkung auf die IL-12p40-Bildung so groß ist, dass kein IL-12p40 detektiert werden kann. Erst als die hemmende Wirkung von IL-10-Protein auf die IL-12p40-Bildung durch Suramin unterbunden wurde, war die TNF α -induzierte IL-12p40-Proteinmenge im Kulturüberstand nachweisbar (Abb. 50B). Somit wurde erstmals gezeigt, dass auch die Stimulation der CD-14⁺-Monozyten mit rhTNF α -Protein über den TNFRII-Signalweg die Bildung von IL-12p40-Protein induziert.

3.5 Der Einfluss der MAPK-Kinasen auf die Zytokinbildung

3.5.1 JNK-Signalweg

Der abgeschwächte Krankheitsverlauf der Rheumatoiden Arthritis in Ratten, welche mit dem JNK-Inhibitor SP600125 behandelt worden, zeigte die mögliche Bedeutung des JNK-Inhibitors *in vivo*²¹⁶. Von Bennett et al. wurde erstmals *in vitro* eine signifikante Verringerung der **TNF α** -Proteinmenge im Kulturüberstand von LPS-stimulierten Monozyten ab 10 μ M SP600125 gezeigt¹⁶⁵. In eigenen Versuchen wurde ein Kristallisieren der Substanz ab einer Konzentration von 8 μ M beobachtet (Daten nicht gezeigt). Diese Nadelbildung wurde bei Bennett et al. durch eine erhöhte DMSO-Zugabe (pro 10 μ M jeweils 0,1 % DMSO) verhindert¹⁶⁵. Allerdings wurden für DMSO verschiedene Wirkungen, wie die Induktion der Differenzierung und die Verringerung der Apoptose beschrieben¹⁸⁶. In eigenen Untersuchungen reduzierte 0,04 % DMSO die TNF α - (40 %) und IL-10-Proteinbildung (39 %) und steigerte die IL-12p40-Proteinbildung (59 %), (Tab. 10). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde auch in LPS-stimulierten Gesamtblutproben eine dezimierte TNF α - (55 %) und die IL-10-Proteinmenge (95 %) in Gegenwart von 10 % DMSO beschrieben¹²². Aufgrund der Wirkungen auf die Proteinbildung wurde daher auf den Einsatz von DMSO in Konzentrationen höher als 0,04 % verzichtet. Die Versuche in dieser Arbeit sind daher, wegen der geringeren DMSO-Konzentration nur eingeschränkt mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen vergleichbar. Dennoch wurde die konzentrationsabhängige Verringerung der TNF α -Proteinmenge durch SP600125 ab einer Konzentration 0,93 μ M in eigenen Versuchen ebenfalls gezeigt (Abb. 51)^{165;217}.

Der spezifische Inhibitor SP600125 steigerte die **IL-12p40**-Proteinmenge ab 0,93 μ M (Abb. 51), wodurch die Ergebnisse von Utsugi et al., welche eine erhöhte IL-12p70-Produktion in Monozyten bei 3 μ M bzw. 10 μ M SP600125 gezeigt hatten, bestätigt wurden²¹⁸. In der gleichen Arbeit wurde von Utsugi et al. die konzentrationsabhängige Steigerung der LPS-induzierten IL-12p40-Bildung durch SP600125 [3,10,30 μ M] in einem Makrophagen-Zellmodell gezeigt²¹⁸. Im Gegensatz dazu, zeigten Ma et al. eine konzentrationsabhängige Hemmung der IL-12p40-Sekretion durch SP600125 [1 μ M bis 50 μ M] in einem LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozytenmodell, wobei THP-1-Zellen mit der cDNA von CD14 transfiziert wurden⁷³. Ma et al. zeigte die IL-12p40-Hemmung durch SP600125 im Luciferase-Assay, was wiederum auf eine Beteiligung der JNK an der LPS-induzierten Bildung von IL-12p40 deutet⁷³. Die widersprüchlichen Ergebnisse zur Wirkung von SP600125 auf die LPS-induzierte IL-12p40-Bildung liegen vermutlich in den unterschiedlichen Zelleigenschaften von Makrophagen-Zellen, THP-1-Zellen und Monozyten begründet. Unterstützt wird diese Hypothese von Rutault et al., welche darauf hinwiesen, dass verschiedene Zelllinien sich im Differenzierungszustand zu reifen Monozyten unterscheiden und daher möglicherweise nicht die Situation in reifen CD-14⁺-Monozyten widerspiegeln¹⁰⁶.

SP600125 dezimierte ab einer Konzentration von 0,93 μ M die **IL-10**-Proteinmenge im Kulturüberstand von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten in eigenen Versuchen (Abb. 51), während im Gegensatz dazu, im oben genannten CD-14⁺-Monozytenmodell von Ma et al., keine Beeinflussung der IL-10-Bildung durch SP6001256 nachgewiesen wurde⁷³.

Von Bain et al. wurde kürzlich beschrieben, dass SP600125 mehr als 13 zusätzliche Kinasen mit z.T. höherer Stärke im Kinaseassay inhibierte¹⁶⁴. Die geringe Spezifität des Inhibitors SP600125 in Bezug auf die Hemmung der JNK, erlaubte daher keine eindeutige Interpretation der Bedeutung der JNK für die Zytokinbildung von TNF α , IL-12p40 und IL-10.

3.5.2 ERK1/2-Signalweg

Die Hemmung der LPS-induzierten TNF α -Proteinmenge durch PD98059 wurde in eigenen Versuchen bestätigt (Abb. 52)^{106;219}. Da die Substanz PD98059 an die inaktive dephosphorylierte MEK1/2-Kinase bindet und somit die Aktivierung der MEK1/2 verhindert, deutet dies auf die Beteiligung des ERK1/2-Signalweges an der LPS-induzierten TNF α -Proteinbildung in CD-14⁺-Monozyten. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass auch die potentere Substanz UO126, welche die Aktivität der bereits aktiven MEK1/2 verringert, zu einer Hemmung der LPS-induzierten TNF α -Proteinmenge in eigenen Versuchen führte (Abb. 54)²¹.

In Gegenwart von PD98059 wurde die IL-12p40-Proteinmenge im Kulturüberstand der LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten nicht signifikant verändert (Abb. 52). Untersuchungen zur Wirkung des Inhibitors PD98059 auf die LPS-induzierte Bildung von IL-12(p40) von Monozyten finden sich in der Literatur nicht. Allerdings wurde in LPS-stimulierten Makrophagen bzw. Dendritischen Zellen die IL-12(p40)-Proteinmenge durch den Inhibitor PD98059 bzw. UO126 erhöht, sodass die Aktivierung des ERK1/2-Signalweges die LPS-induzierte IL-12-Proteinbildung, in differenzierten Monozyten (Makrophagen bzw. Dendritischen Zellen) zu unterdrücken scheint^{220;221}.

Die gesteigerte IL-12p40-Proteinbildung in LPS-aktivierten Dendritischen Zellen durch PD98059 war von einer dezimierten IL-10-Proteinbildung begleitet²²⁰. Im Gegensatz zu den Ergebnissen in Dendritischen Zellen, zeigte die Konzentrations-Wirkungskurve für den Inhibitor PD98059 in eigenen Versuchen eine leicht erhöhte IL-10-Proteinmenge (Abb. 52).

Im Konzentrationsbereich von 1,25 μ M–10 μ M beeinflusste der Inhibitor die IL-10-Proteinmenge im Kulturüberstand von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten nicht signifikant (Abb. 55), was auch durch Foey et al. und Lim et al. beschrieben wurde^{96;107}. Da der ERK1/2-Signalweg für die LPS-induzierte Bildung von IL-12p40 und IL-10 in Monozyten, aufgrund der fehlenden bzw. geringen Wirkung des Inhibitors PD98059, nicht essentiell notwendig war, wurde auf weiterführende Untersuchungen zur Beeinflussung des ERK1/2-Signalweges durch Aminothalidomid und Suramin verzichtet.

3.5.3 p38-MAPK-Signalweg

Die Bedeutung der p38-MAPK für die Bildung von TNF α deutet auf eine Beteiligung des p38-MAPK-Signalweges bei Entzündungsreaktionen hin²²²⁻²²⁴. In eigenen Versuchen wurde die konzentrationsabhängige Hemmung der TNF α -Sekretion in den Kulturüberstand von LPS-induzierten CD-14⁺-Monozyten durch den p38-MAPK-Inhibitor (SB203580) nach 24 h bestätigt (Abb. 53)²²³. Foey et al. zeigte ebenfalls für 0,016 μ M–10 μ M SB203580 eine konzentrationsabhängige Hemmung der LPS-induzierten Bildung von TNF α in Monozyten⁹⁶.

Durch 4 μ M SB203580, eine Konzentration, welche im Kinaseassay die spezifische Aktivierung der MAPK Kinase (MKK1) verhinderte und somit zu einer spezifischen Hemmung der p38-MAPK führte, wurde eine 92 %ige verringerte TNF α -Proteinmenge im Kulturüberstand detektiert (Abb. 54)¹⁹. Es handelte sich um eine spezifische Wirkung des p38-MAPK-Inhibitors SB203580, da die inaktive Negativkontrolle SB202474 die TNF α -Sekretion wesentlich geringer beeinflusste (Abb. 54)¹⁹. Die leichte Hemmung der TNF α -Proteinbildung durch die inaktive Kontrollsubstanz SB202474, deutet auf die von Kumar et al. beschriebene unspezifische Wirkung der Pyridinyl-Imidazole¹⁹. Bei Betrachtung der Kinetik der TNF α -Proteinbildung hemmte SB203580 [4 μ M] die Freisetzung von TNF α -Protein innerhalb der ersten 5 min-30 min nach LPS-Stimulation um 98 % gegenüber unstimulierten Monozyten (Abb. 60C+D). Auch Lee et al. und Manthey et al. beschrieben eine Hemmung der TNF α -Proteinfreisetzung durch den p38-MAPK-Inhibitor^{223,225}. In den eigenen Versuchen wurde zwischen 1,5 h-17 h LPS-Stimulation die TNF α -mRNA-Bildung mit der gleichen Stärke wie die TNF α -Protein-Bildung gehemmt (Abb. 58). Diese Versuche bestätigten, dass die Reduktion des TNF α -Proteins sowohl auf eine verringerte TNF α -mRNA-Bildung als auch auf eine dezimierte Proteinfreisetzung zurück zu führen ist^{226;227,106}. Rutault et al. zeigte eine stärkere Beeinflussung der TNF α -mRNA-Bildung als der TNF α -Proteinbildung durch SB203580¹⁰⁶. Im Gegensatz dazu wurde in Versuchen von Lee et al. die TNF α -mRNA-Bildung nicht beeinflusst²²³.

Die Wirkung von SB203580 auf die Proteinfreisetzung von TNF α wurde in Gegenwart von Anisomycin, welches die Transkription verhindert, beobachtet¹⁷⁰. Die Versuche zur Aktivierung der p38-MAPK durch Anisomycin führten zu einer 92 %-99 %igen Hemmung der TNF α -Freisetzung durch SB203580 (Abb. 61B), was die dezimierte Freisetzung des TNF α -Proteins durch SB203580 zeigte.

Der Inhibitor SB203580 scheint demnach sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene/Proteinfreisetzung eine Verringerung des TNF α -Proteins zu bewirken.

Die zusätzliche Hemmung des p38-Signalweges bei schon erfolgter verringerter MEK1/2-Aktivität durch PD98059 führte zu einer größeren Hemmung der TNF α -Proteinmenge im Kulturüberstand, als bei alleiniger Hemmung der p38-MAPK durch SB203580 (Abb. 55). Allerdings verstärkte die zusätzliche Gabe von SB203580 die TNF α -Proteinhemmung nur um den gleichen Stärke, und zwar unabhängig von der eingesetzten Konzentration des MEK1/2-Inhibitors PD98059, wodurch die Ergebnisse von Rutault et al. bestätigt wurden¹⁰⁶. Diese Ergebnisse deuten auf eine unabhängige Beteiligung des ERK1/2- und p38-MAPK-Signalweges an der LPS-induzierten TNF α -Proteinbildung.

In der Literatur sind widersprüchliche Ergebnisse zur Wirkung von p38-MAPK-Inhibitoren auf die **IL-12p40**-Bildung beschrieben. Utsugi et al. zeigten in Monozyten eine verringerte IL-12p40-Bildung durch SB203580 und postulierten daher eine positive Regulation der IL-12p40-Bildung durch die p38-MAPK²²⁸. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit die IL-12p40-Bildung nach 22 h LPS-Stimulation in Gegenwart des p38-MAPK-Inhibitors SB203580 um 51 % gesteigert, wobei die, durch die Negativkontrolle SB202474 um 45 % verringerte IL-12p40-Bildung erneut auf die geringfügige, unspezifische Beeinflussung der Zytokinbildung durch Pyridinyl-Imidazole deutet (Abb. 54)^{229;230}. Von Ma et al. wurden durch einen anderen p38-MAPK-Inhibitor (SB202190, [1 μ M-12 μ M]) eine erhöhte Menge an IL-12p40-Protein nach 48 h LPS-Stimulation im Kulturüberstand von Monozyten nachgewiesen⁷³.

Die in eigenen Versuchen gezeigte, signifikante Steigerung der IL-12p40-Bildung durch SB203580 (Abb. 53) deuten, in Übereinstimmung mit Ma et al. aber im Gegensatz zu Utsugi et al. auf eine negative Regulation der IL-12p40-Bildung durch die p38-MAPK²²⁸. Die unterschiedlichen Ergebnisse auf die IL-12p40-Proteinmenge beim Einsatz von p38-MAPK-Inhibitoren könnten möglicherweise in der unterschiedlich Reinigung der Monozyten oder verschiedenen Versuchsdurchführung begründet liegen. Von Marriott et al. wurde auch in LPS-stimulierten Gesamtblut und PBMCs für den p38-MAPK-Inhibitor SB203580 eine erhöhte IL-12p40-Proteinmenge gezeigt²³¹. Diese in LPS-stimulierten Gesamtblut und PBMCs gesteigerte IL-12p40-Bildung könnte aufgrund des von T-Zellen produzierten IFN- γ -Proteins erfolgen²³¹.

Allerdings erklärt die Produktion des IFN- γ -Proteins nicht die gesteigerte IL-12p40-Bildung in CD-14⁺-Monozyten, da diese nach LPS-Stimulation nur geringfügige Mengen an IFN- γ -Protein produzieren⁷⁰.

Ma et al. vermutete eine indirekte Erhöhung der IL-12p40-Sekretion aufgrund einer dezimierten IL-10-Sekretion durch den p38-MAPK-Inhibitor und der somit verringerten hemmenden Wirkung des IL-10-Proteins auf die IL-12p40-Proteinbildung⁷³. In eigenen Versuchen hemmte der p38-MAPK-Inhibitor SB203580 sowohl die **IL-10**-Proteinmenge im Kulturüberstand als auch die IL-10-mRNA-Bildung (Abb. 58). Die inaktive Negativkontrolle SB202474 verringerte hingegen die LPS-induzierte IL-10-Proteinbildung kaum (Abb. 54C), sodass die Beeinflussung der LPS-induzierten Bildung von IL-10 durch p38-MAPK-Inhibitoren bestätigt wurde^{96;107,73}. Die eigenen Versuche deuten auf eine direkte Steigerung der IL-12p40-Proteinbildung, da der p38-MAPK-Inhibitor SB203580 bereits nach 4 h LPS-Stimulation die IL-12p40-Sekretion erhöhte (Abb. 55). Da nach 4 h LPS-Stimulation kaum IL-10 im Kulturüberstand nachweisbar war (Abb. 15) und daher die bekannte, hemmende Wirkung des IL-10-Proteins auf die IL-12p40-Proteinbildung vernachlässigbar ist, führt SB203580 wahrscheinlich unabhängig von der IL-10-Bildung zu einer IL-12p40-Proteinerhöhung. Unterstützt wird diese Annahme durch die Versuche mit Suramin. Nach 4 h und 22 h LPS-Stimulation wurde bei gemeinsamer Gabe von SB203580 und Suramin die IL-12p40-Proteinmenge im Vergleich zu alleiniger Gabe beider Substanzen gesteigert, obwohl bei 200 μ M Suramin kein biologisch aktives IL-10-Protein vorliegt (Abb. 59C). Befunde in der MAPKK3 (MKK-3) Knockout Maus, bei welchen nach LPS-Stimulation keine IL-12p40-Produktion von Makrophagen mehr möglich ist, unterstützen die notwendige Aktivierung der p38-MAPK durch die MKK-3 für die IL-12p40-Bildung²³².

Bei gemeinsamer Hemmung des p38-MAPK-Signalweges und des ERK1/2-Signalweges setzte sich die Wirkung des p38-MAPK-Inhibitors, unabhängig von der Konzentration des MEK1/2-Inhibitors PD98059, auch bei der Beeinflussung der IL-12p40- und IL-10-Proteinbildung durch (Abb. 55), sodass eine Beteiligung des ERK1/2-Signalweges an der LPS-induzierten IL-12p40- und IL-10-Proteinbildung unwahrscheinlich ist.

3.5.4 Beeinflussung der MAPK durch Aminothalidomid und Suramin

3.5.4.1 Wirkung von Aminothalidomid auf den ERK1/2- und p38-MAPK-Signalweg

In Gegenwart von Aminothalidomid wurde eine dezimierte TNF α - und IL-12p40-Proteinmenge und eine gesteigerte IL-10-Proteinmenge im Kulturüberstand von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten nachgewiesen (Abb. 26-Abb. 28).

Die verringerte TNF α -Proteinbildung durch Aminothalidomid kann nicht durch eine Beeinflussung des ERK1/2-Signalweges erklärt werden, da Aminothalidomid konzentrationsabhängig die TNF α -Proteinbildung in der gleichen Stärke verringerte, wie in Gegenwart 5 μ M PD98059 (Abb. 56). Aminothalidomid scheint daher die TNF α -Proteinbildung in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten über einen unbekanntem Signalweg zu verringern. In der Literatur finden sich keine Untersuchungen zur Beeinflussung des **ERK1/2**-Signalweges durch Thalidomid oder Aminothalidomid in humanen Monozyten. Die ERK1/2-Phosphorylierung wurde in aktivierten T-Zellen durch Aminothalidomid nicht beeinflusst¹⁶⁸. Hingegen phosphorylierte Thalidomid die ERK1/2 in Rattenzellen und die Phosphorylierung konnte durch die Substanz PD98059 aufgehoben werden²³³. Diese widersprüchlichen Ergebnisse deuten darauf, dass die Beeinflussung des ERK1/2-Signalweges durch Thalidomid bzw. Aminothalidomid möglicherweise erneut, wie bei der Beeinflussung der Zytokinbildung- von den untersuchten Zellen und dem Stimulus abhängig ist.

Bei Hemmung der **p38-MAPK** in Gegenwart von Aminothalidomid, war eine additive Beeinflussung gegenüber der Einzelwirkungen beider Substanzen (SB203580 und Aminothalidomid) sowohl auf Protein als auch auf mRNA-Bildung zu beobachten (Abb. 58). So wurde die hemmende Wirkung von Aminothalidomid auf die TNF α -Proteinbildung durch SB203580 verstärkt (Abb. 58A), während die hemmende Wirkung von Aminothalidomid auf die IL-12p40-Proteinbildung durch SB203580 vermindert wurde (Abb. 58B). Die durch Aminothalidomid bewirkte IL-10-Proteinsteigerung wurde in Gegenwart des p38-MAPK-Inhibitors SB203580 verringert (Abb. 58C). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Wirkung von Aminothalidomid auf die IL-10 und IL-12p40-Bildung nicht über den Mechanismus, welcher von den p38-MAPK-Inhibitoren beeinflusst wird, sondern über einen anderen Wirkmechanismus erfolgt. Unterstützt wird diese These durch die Untersuchungen zur Phosphorylierung der p38-MAPK. In aktivierten T-Zellen wurde durch Aminothalidomid keine Phosphorylierung der p38-MAPK beobachtet¹⁶⁸. Die Untersuchungen in CD-14⁺-Monozyten zur Phosphorylierung der p38 α -MAPK zeigten ebenfalls keine Beeinflussung des Phosphorylierungszustands der p38 α -MAPK durch Aminothalidomid innerhalb der ersten 30 min nach LPS- bzw. Anisomycin-Stimulation (Abb. 60A+B, Abb. 61A).

Daher kann davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Wirkungen von Aminothalidomid auf die Zytokine TNF α , IL-12p40 und IL-10 nicht über eine Beeinflussung der p38-MAPK in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten erfolgten.

3.5.4.2 Beeinflussung des p38-MAPK-Signalweges durch Suramin

Verschiedene Autoren berichteten von einer verringerten Aktivität von Serin-Threonin-Kinasen, der PKC und der cdc2 durch Suramin [1 μM bis 100 μM]^{148;150;234}. Insbesondere der Bericht von Kopp und Pfeiffer et al. über die verringerte Aktivität der cdc2 durch Suramin, unterstützt eine mögliche Hemmung der Aktivität der p38-MAPK, da die p38-MAPK auch cdc2-related Kinase benannt, eng mit der cdc2-Kinase verwandt ist¹⁴⁸. In eigenen Untersuchungen wurde in CD-14⁺-Monozyten die LPS-induzierte Sekretion von TNF α durch 200 μM Suramin innerhalb der ersten 30 min gehemmt (Abb. 60D). Diese frühzeitige Hemmung der TNF α -Sekretion schien zunächst mit der erstmals gezeigten, verringerten Phosphorylierung der p38-MAPK durch 200 μM Suramin erklärbar zu sein (Abb. 60B). Wurde allerdings die p38-MAPK durch Anisomycin direkt aktiviert, zeigte Suramin keine Wirkung auf die Phosphorylierung der p38-MAPK (Abb. 61A). Daher scheint die beobachtete Verringerung der Aktivität der LPS-induzierten p38-MAPK durch Suramin nicht über eine direkte Hemmung der Phosphorylierung der p38-MAPK zu erfolgen. Denkbar wäre eine indirekte Beeinflussung der Phosphorylierung der p38-MAPK, beispielweise über die veränderte Aktivität von Phosphatasen durch Binden von Suramin an die Aktivierungsstelle von Protein-Tyrosin Phosphatasen, wie dies für Suramin beschrieben wurde¹⁴⁷. Suramin scheint pleiotroph zu wirken, denn es verringerte nicht nur Aktivität der cdc2, sondern erhöhte ebenfalls die Tyrosin-Phosphorylierung der cdc2-Kinase in Kernextrakten von humanen Lungenzellen¹⁴⁸. Zusammenfassend kann formuliert werden, dass bei einer Konzentration von 1 μM bis 200 μM Suramin eine Beeinflussung der Aktivität verschiedener Enzyme und bestimmter Protein-Interaktionen durch Suramin möglich ist.

3.6 Ausblick

Die Hemmung der TNF α -Produktion erklären teilweise die immunmodulatorischen und anti-inflammatorischen Eigenschaften, die Thalidomid zugeschrieben werden. Dennoch ist der Wirkmechanismus von Thalidomid oder seinen Derivaten nicht vollständig aufgeklärt. In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass **Aminothalidomid** die Bildung der Zytokine IL-12(p40)- und IL-10 auf mRNA-Ebene unabhängig voneinander und über die Anzahl der zytokinbildenden CD-14⁺-Monozyten reguliert.

Da Aminothalidomid die Zytokinbildung von TNF α , IL-12p40 und IL-10 auf Transkriptionsebene beeinflusst, sind weiterführende Untersuchungen vor allem am IL-12p40- und IL-10-Promotor und die Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren notwendig. Die Untersuchungen an humanen monozytären Zelllinien zeigten jedoch, dass die Zytokinbildung der Zelllinien nicht der Zytokinbildung von frisch isolierten humanen CD-14⁺-Monozyten entspricht. Daher müsste es für Untersuchungen zur Wirkung von Aminothalidomid am Promotor von IL-12p40 oder IL-10 gelingen, humane CD-14⁺-Monozyten zu transfizieren.

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass **Suramin** die biologische Aktivität von IL-10-Protein inaktivierte. Bei diesen Untersuchungen wurde nicht geklärt, ob und an welche Aminosäuren im IL-10-Protein das Suramin möglicherweise bindet. Hierfür wären Untersuchungen mittels „proton nuclear magnetic resonance“ (¹H-NMR), wie sie für die Bindung von Suramin an das PDGF durchgeführt wurden, notwendig¹³⁶. Ebenfalls würden Untersuchungen, zur Bindung von IL-10 an seinen Rezeptor in Gegenwart von Suramin zeigen, ob Suramin diese Bindung -ähnlich wie beispielsweise für IL-1 und IL-6 beschrieben- verhindert^{213;235}.

Die erhöhte Produktion von TNF α - und IL-12p40-Protein durch Suramin wurde erstmals auf Protein- und auf mRNA-Ebene gezeigt. Untersuchungen mittels geeignetem Bioassay zur Bioaktivität der -in Gegenwart von Suramin- produzierten Zytokine TNF α und IL-12, würden die Frage beantworten, ob Suramin auch diese beiden Zytokine in ihrer Bioaktivität beeinträchtigt.

Die Tatsache, dass Suramin biologisch aktives IL-10-Protein inaktiviert, kann im Screening-Assay genutzt werden. Hier könnte die Wirkung von Substanzen auf die TNF α - und/oder IL-12p40-Bildung, unabhängig von der Beeinflussung der IL-10-Bildung untersucht werden. Die Substanzen müssten hierfür gemeinsam mit Suramin zu den LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten gegeben werden und die TNF α - und/oder IL-12p40-Bildung müsste gemessen werden.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Ein Ansatz zur Therapie von Autoimmunerkrankungen, bei welchen eine Fehlregulation der Zytokinbildung besteht, ist die Beeinflussung der Zytokinbildung von Immunzellen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation der Bildung der pro-entzündlichen Zytokine TNF α und IL-12(p40) sowie des anti-entzündlichen Zytokins IL-10 im Modell der LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten durch Aminothalidomid und Suramin untersucht.

Die Analyse der mRNA-Transkripte und Proteinmengen mittels RT-PCR, Proteinarray, ELISA und ELISpot zeigten, dass **Aminothalidomid** in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten die TNF α - und IL-12(p40)-Bildung fast vollständig verringerte, während die IL-10-Bildung gesteigert wurde. Die Verringerung der TNF α - und IL-12(p40)-Bildung war nicht auf eine reduzierte Anzahl an lebenden CD-14⁺-Monozyten zurück zu führen, da Aminothalidomid sowohl die Viabilität als auch die Apoptose und Nekrose in CD-14⁺-Monozyten nicht beeinflusste. Die dezimierte TNF α -Bildung erfolgte nicht über eine Hemmung der Aktivität der p38-MAPK, da die Phosphorylierung der p38-MAPK weder in LPS- noch in Anisomycin-stimulierten CD-14⁺-Monozyten durch Aminothalidomid beeinflusst wurde.

Durch Aminothalidomid wurde die IL-10-Bildung beschleunigt, während die TNF α - und IL-12p40-Bildung bereits kurz nach LPS-Stimulation dezimiert wurde. Die Untersuchung der sezernierten Zytokinmenge einzelner CD-14⁺-Monozyten in Gegenwart von Aminothalidomid zeigte, dass die dezimierte IL-12(p40)-Bildung als auch die gesteigerte IL-10-Bildung aufgrund einer veränderten Zahl an sezernierenden CD-14⁺-Monozyten erfolgte. Aminothalidomid scheint daher die Proteinbildung hauptsächlich über die Anzahl der zytokinbildenden Zellen zu regulieren. Wie Untersuchungen mit neutralisierenden Antikörpern zeigten, erfolgte die Wirkung von Aminothalidomid auf die IL-12(p40)-Bildung unabhängig von der gleichzeitigen Steigerung der IL-10-Bildung und wurde nicht über die bekannte hemmende Wirkung des IL-10-Proteins auf die IL-12-Bildung vermittelt.

Die Analyse der mRNA und Proteinmenge mit den oben genannten Methoden, zeigte, dass **Suramin** die TNF α - und IL-12p40-Bildung steigerte, während die IL-10-Bildung nicht beeinflusst wurde.

Das rhIL-10-Protein, welches thermisch und chemisch denaturiert wurde, war mit dem IL-10-ELISA der Fa. Biosource nicht messbar. In Gegenwart von Suramin wurde im Proteinarray und im ELISA der Fa. Biosource kein IL-10-Protein gemessen, während im ELISA der Fa. R&D die IL-10-Proteinmenge durch Suramin nicht verändert wurde. Suramin inaktivierte das biologisch aktive IL-10-Protein, wodurch sich die fehlende Erkennung von IL-10-Protein im ELISA der Fa. Biosource und im Proteinarray in Gegenwart von Suramin erklärte.

Suramin inaktivierte biologisch aktives IL-10-Protein, da die hemmende Wirkung von rhIL-10-Protein auf die TNF α - und IL-12(p40)-Bildung in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten in Gegenwart von Suramin nicht erfolgte. Die durch Suramin gesteigerte TNF α - und IL-12(p40)-Bildung wurde über die Inaktivierung des IL-10-Proteins vermittelt und erfolgte daher indirekt. Die kinetischen Untersuchungen bestätigen die indirekte Wirkung, da Suramin erst nach 15 h LPS-Stimulation die TNF α - und IL-12(p40)-Proteinbildung steigerte.

Die verstärkte TNF α - und IL-12(p40)-Bildung nach 24 h LPS-Stimulation könnte zusätzlich durch die, in Gegenwart von Suramin verringerte spontane Apoptose und erhöhte Viabilität der CD-14⁺-Monozyten gefördert werden. Suramin und der p38-MAPK-Inhibitor SB203580 verringerten innerhalb der ersten 30 min nach LPS- oder Anisomycin-Stimulation die TNF α -Proteinmenge im Kulturüberstand der CD-14⁺-Monozyten. Da Suramin auch die Phosphorylierung der p38-MAPK innerhalb der ersten 20 min nach LPS-Stimulation verringerte, könnte die frühzeitige Hemmung der Sekretion von TNF α -Protein durch Suramin über eine verringerte Aktivierung der p38-MAPK erfolgen.

Aminothalidomid und Suramin bewirkten die gleichen Veränderungen an der IL-12p40- und der IL-10-Proteinmenge nach Stimulation mit rhTNF α -Protein, wie sie in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten beobachtet wurden. Dies lässt vermuten, dass Aminothalidomid möglicherweise in einen Signalweg eingreift, welcher sowohl bei Stimulation mit LPS als auch mit TNF α -Protein aktiviert wird. Durch den Einsatz von Suramin und der daraus resultierenden Inaktivierung des TNF α -induzierten IL-10-Proteins im Kulturüberstand, wurde erstmals gezeigt, dass die Zugabe von rhTNF α -Protein die Bildung von IL-12p40 in CD-14⁺-Monozyten induziert.

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1 Laborgeräte

CO ₂ -Begasungsschrank: Typ BBD 6220	Heraeus
Digitaler Multi-Imager für Weißlicht-, Fluoreszenz- und Lumineszenz-Aufnahmen und Multianalyst Software	Biorad Laboratories GmbH
Elektrophorese-Kammer und Zubehör für EMSA-Analysen, Protean Ixi-System	Biorad Laboratories GmbH
Elektrophorese-Kammer und Zubehör für Western-Analysen, NuPAGE Electrophoresis System	Invitrogen, NOVEX-Elektrophoresis
ELISA-Reader	Biotek
Fluoreszenz Platten-Messgerät (HTS7000)	Biotek
Laminair HB2010	Mahl GmbH
LightCycler® Instrument mit Realtime PCR und Auswertesoftware	Roche
Magnetischer Zellseparator (MACS)	Miltenyi Biotec
Neubauer-Zählkammer	Jürgens-Omnilab Laborbedarf
Photometer UV-2401PC/ UV-2501PC	Shimadzu
Plattenleser Dynatech MR 600	Biotek
Sterilwerkbank Laminair HB2010	Mahl
Thermocycler GeneAmp 9600	Eppendorf
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus
Wasserbad	Heraeus
Graph Pad Prism4.0®	Graph PAD PRISM
Microsoft® Windows 2000	Microsoft
Microsoft® Office 2000 (Word, Excel, Draw)	Microsoft

5.2 Chemikalien

3-Morpholinpropansulfonsäure (MOPS)	Carl Roth
96-100 %iges Ethanol, 70 %iges Ethanol	Carl Roth
Agarose	SERVA
AlamarBlue™-Lösung	Biosource
Anisomycin	Calbiochem
anti-DNA Peroxidase	Roche
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay	Promega
Basismedium (RPMI 1640 mit 2mM L-Glutamin)	Gibco
BlueJuice Gel Loading Buffer	Gibco
Bromphenolblau	SERVA
BSA (Fraktion V)	Boehringer Mannheim
BSA Fraktion V	Boehringer
Caspase-Inhibitor DEVD-CHO	Calbiochem
Caspase-Inhibitor inaktiv	Calbiochem
Caspase-Inhibitor ZVAD-FMK	Calbiochem

CD14 ⁺ -Microbeads	Miltenyi Biotec
Cell Death Detection ELISA [®]	Roche
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Calbiochem
DMSO = Dimethylsulfoxid	Calbiochem
DNA Master SYBR-Green I	Roche
DNA-Molekulargewichtsmarker „100 Bp-Ladder“	Invitrogen
Ethidiumbromid	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Extraktionspuffer für MAPK-Phosphorylierung mit Protease Inhibitor Complete (Fa. Roche)	Biosource
FCS (fötales Kälberserum)	PAA
Glycerin	Merck
Heparin (Liquemin N 25000)	Hoffmann-La Roche
Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth
Isopropanol	Merck
isotonischen Trypanblaulösung (Natriumchlorid 0,85% (w/v), Trypanblau 0,16% (w/v))	Sigma
Kinase Inhibitor PD 98059 und UO126	Calbiochem
Kinase Inhibitor SB 203580 und SB202474	Calbiochem
Kinase Inhibitor SP600125	Calbiochem
LPS mit Stamm <i>Escherichia coli</i> O55:B5	Calbiochem
Magermilchpulver	Biorad Laboratories
Magnesiumsulfat	Merck
Methanol	Carl Roth
Mikrolite-Platte (geeignet zur Fluoreszenzmessung)	Nunc
Milli-Q-Wasser (Reinstwasser zur Herstellung von Lösungen)	Millipore
Natriumacetat	Sigma Chemie
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumcitrat	Carl Roth
Natriumdihydrogencarbonat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Chemie
Natriumhydroxid	Merck
Natriumphosphat	Sigma Chemie
Oligonukleotide / Primer (entsalzt, HPLC-gereinigt)	MWG-Biotech AG
Omniscrypt- Reverse Transkriptase inkl. 10-fach Puffer, Nukleosid-Tri-Phosphate-Mix, Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ , 0,5 µl RNase Inhibitor und Omniscrypt Reverse Transkriptase	Qiagen
Peroxidase-markiertes Avidin	Calbiochem
Phosphate buffered saline (PBS)	Biochrom
Protease-Inhibitor-Complete [®]	Roche
QuantiTec SYBR-Green PCR	Qiagen
rhTNF α - bzw. rhIL-10-Protein	Biosource
Rhodamine 110	Promega
RiboGreen Quantitation Kit. RiboGreen mit Ribo-Green-Reagenz und Tris-Puffer	Roche
RNase freies-H ₂ O	Sigma

RNase-Free Dnase Set	Qiagen
RPMI 1640 mit 2mM L-Glutamin	Gibco
Streptavidin Horseradish Peroxidase	Boehringer Mannheim
Suramin	Calbiochem
Thalidomid und Aminothalidomid	Grünenthal
Tris ultra pure	ICN Biomedicals
Triton X-100	SERVA
Trypanblau	Biosource
Tween-20	Sigma Chemie
Wasserstoffperoxid	Carl Roth

5.3 Verbrauchsmaterialien

Eppendorf-Reaktionsgefäße, Plastikpipettenspitzen, Kulturplatten (6-well, 24-well und 96-well), Zentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml), Pipetten, Zellschaber, Mikrolite-Platte	VWR
Proteinarray	Raybiotek
QIAshredder	Qiagen
RNeasy Mini Kit Puffer RW1, RLT und RPE	Qiagen
Spritzen (50 ml)	Greiner
Sterilfilter (0,2 µm Porengröße)	Sartorius

5.4 Zellkultur

Die Zellkulturarbeiten erfolgten entsprechend den allgemeinen Methoden der Zellkultur und sind ebenso wie die Behandlungsweisen sämtlicher Geräte, Chemikalien und Labormaterialien für zellbiologische Arbeiten aus Lindl und Bauer entnommen²³⁶. Kunststoffmaterialien wie Eppendorf-Reaktionsgefäße und Plastikpipettenspitzen wurden vor Gebrauch bei 121°C und 2 bar für 15 min autoklaviert und im Trockenschrank bei 100°C getrocknet. Glasgeräte (Flaschen und Messzylinder) wurden für 2 h bei 160°C und 2 bar sterilisiert. Die sterilen Arbeiten wurden an einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre in elektronisch geregelten CO₂-Begasungsschränken bei einer konstanten Temperatur von 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5 %.

5.4.1 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Die Bestimmung der Zellzahl und Vitalität erfolgte durch die Trypanblau-Exklusionsmethode. Der Farbstoff Trypanblau kann die intakten Plasmamembranen nicht durchdringen und somit können lebende Zellen nicht angefärbt werden. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und erscheinen unter dem Lichtmikroskop blau.

Für die Durchführung wurde das Zellsediment in einem Volumen von 5 ml resuspendiert. 20 µl der Zellsuspension wurden mit 180 µl einer isotonischen Trypanblaulösung verdünnt. Die lebenden Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und entsprechend den Angaben des Herstellers berechnet.

5.4.2 Lösungen, Medien und Medienzusätze

Alle Lösungen wurden mit Milli-Q-Wasser hergestellt. Die Sterilisation hitzeresistenter Lösungen erfolgte durch Autoklavieren bei 121°C und 2 bar. Lösungen mit hitzelabilen Komponenten wurden durch einen Sterilfilter filtriert.

Als Basismedium für die Zellkultur diente - soweit nicht anders vermerkt - RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin. Als Kulturmedium diente Basismedium plus 10% FCS (FCS = Fötale Kälberserum). Die durchgeführten Arbeiten wurden mit einer Charge FCS durchgeführt. Die Seren wurden vor Gebrauch hitzeinaktiviert (56 °C, 30 min), aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -20°C aufbewahrt.

5.4.3 Isolierung von PBMCs und CD14⁺-Monozyten

Isolierung von PBMCs (PBMCs = Peripheral blood mononuclear cells)

Aus dem Blut wurden die PBMCs durch Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnen. Zur Aufarbeitung von 250 ml Humanblut wurden in 20 Stück 50 ml-Greiner-Röhrchen je 20 ml Ficoll-Paque[®] vorgelegt. Das Blut und das Kulturmedium wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und das Ficoll damit vorsichtig überschichtet und für 35 min bei 1400 rpm, ohne Bremse zentrifugiert. Der Erfolg der Dichtegradientenzentrifugation konnte an der Ausbildung von drei Phasen und einer Interphase, welche die PBMCs enthält, kontrolliert werden. Nach der Zentrifugation wurde die obere der vier Phasen (Serum) verworfen. Der weiße Lymphozyten-Ring wurde abgenommen. Je zwei Röhrchen des abgenommenen Lymphozyten-Rings wurden vereinigt und mit Kulturmedium auf 30 ml aufgefüllt. Es erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 1200 rpm mit Bremse. Die entstandenen Pellets wurden mit MACS-Puffer auf 30 ml aufgefüllt und 10 min bei 1000 rpm mit Bremse zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets wurde in jeweils 5 ml MACS-Puffer resuspendiert und die Zellzahl wurde bestimmt. Die PBMCs wurden direkt in Stimulationsexperimenten eingesetzt oder weiter zu CD-14⁺-Monozyten aufgereinigt.

Isolierung der CD-14⁺-Monozyten durch MACS

Die Methode der Magnetische Zellseparation (MACS) und dient der Isolation von Monozyten, welche membranständiges CD14 exprimieren¹⁰³. Nach der Markierung der CD14-Moleküle durch Magnetpartikel erfolgt die Separation durch Positivselektion in einem Magnetfeld. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 1000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet in MACS-Puffer (80 µl MACS-Puffer pro 1*10⁷ Zellen) resuspendiert und mit CD14-Microbeads (20 µl Microbeads pro 1*10⁷ Zellen) versetzt. und für 15 min bei +4°C im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 10-fachen Ausgangsvolumen MACS-Puffer aufgenommen und für 15 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden auf die im Magnetfeld befindliche VS⁺-Säule (mit 3ml MACS-Puffer vorgespült) gegeben. Der Durchfluss enthielt die PBMCs ohne CD-14⁺-Monozyten. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen mit 5 ml MACS-Puffer von der Säule eluiert. Die Zellzahl von CD-14⁺-Monozyten wurde bestimmt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellpellets soweit nicht anderes vermerkt – in Basismedium aufgenommen.

5.4.4 Zellkultur und Stimulationsexperimente

Das Gesamtblut, die CD-14⁺-Monozyten und die PBMCs wurden in Stimulationsexperimenten eingesetzt. Die Zellen wurden in Kulturplatten (6-well, 24-well, 96-well) im Basismedium in 6 Ansätzen kultiviert mit entsprechender Zellzahl in den Stimulationsexperimenten eingesetzt und nach erfolgter Stimulation für unterschiedliche Dauer inkubiert. Tab. 12 zeigt in Abhängigkeit von der Analysemethode die verschiedenen Ansätze und die verwendeten Kulturplatten.

Tab. 12: Übersicht über verwendete Zellzahlen in Abhängigkeit der jeweiligen Analysemethode

Methoden	Kulturplatte
ELISA* (Ansatz 1)	96 well-Format mit 1×10^6 Zellen/ml in einem Gesamtvolumen von 0,25 ml
RT-PCR** (Ansatz 2)	24 well-Format mit $2-4 \times 10^6$ Zellen/ml in einem Gesamtvolumen von 1,25 ml
ELISpot (Ansatz 3)	Gesamtvolumen von 0,25 ml mit $1 \times 10^3-10^6$ Zellen/ml im 96 well Format
ELISA-based phosphorylation assay (Ansatz 4)	2 ml Eppendorfgefäß mit 5×10^6 Zellen/ml in einem Gesamtvolumen von 1 ml
Proteinarray (Ansatz 5)	6 well-Format mit 4×10^6 Zellen/ml in einem Gesamtvolumen von 1,25 ml
ELISA für Gesamtblut (Ansatz 6)	6 well-Format mit 1 ml (1:2 Gemisch Blut + Kulturmedium) in einem Gesamtvolumen von 1,25 ml

ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

RT-PCR = Reverse Transkription- Polymerase-Kettenreaktion

Die Zellernte und Aufarbeitung erfolgte entsprechend der jeweiligen Analysemethode. Nach der Stimulation wurden die Kulturüberstände nach Zentrifugation (5 min bei 1200 rpm) abgenommen und bei -20°C eingefroren. Die Untersuchung auf die Zytokinmenge erfolgte innerhalb der nächsten 3 Kalendertage.

Für die in vitro Stimulation wurden LPS (in der Regel 10 µg/ml), rh TNFα-Protein (100 ng/ml), rhIL-10-Protein (in der Regel 5 pg/ml) und Anisomycin (in der Regel 20 µM) verwendet. Die Substanzen und Inhibitoren wurden -falls nicht anders vermerkt- 30 min vor Stimulus mit den Zellen inkubiert.

Bei den Kinetikexperimenten wurden die Versuche so durchgeführt, dass alle Versuchsgruppen die gleiche Behandlungsdauer erfuhren. Es wurden jeweils 250-fach konzentrierte Inhibitor-Lösungen hergestellt, welche durch Zugabe zu den Zellen auf die jeweilige Endkonzentration verdünnt wurden. Es wurden nur Konzentrationen der Inhibitoren eingesetzt, welche die Zellviabilität im AlamarBlue™ nicht beeinflussten.

Um eine Verunreinigung des Kulturüberstandes mit membrangebundenen Zytokinen (z.B. dem membrangebunden TNFα) zu vermeiden, wurde der Kulturüberstand vorsichtig abgenommen und zentrifugiert, um zelluläre Bestandteile aus dem Kulturüberstand zu entfernen.

Die Wirkung der Substanzen wurde in einer Konzentrations-Wirkungskurve dargestellt und der EC₅₀-Wert (molare Konzentration eines Agonisten, bei 50 % der maximal möglichen Wirkung) wurde mit Graph PadPrism4.0[®] errechnet.

5.5 Nachweis der Zytokinproduktion

5.5.1 ELISA

Der Nachweis der Zytokine in den Kulturüberständen erfolgte über den enzymgebundenen Immunoassay (ELISA-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Abb. 62). Diese Untersuchung basiert auf dem Prinzip des Nachweises eines Proteins (Zytokins) als Antigen, bei welcher ein gesuchtes Zielmolekül über Antikörper fixiert wird. Diese Antikörper sind wiederum an ein enzymatisches Detektionssystem gekoppelt.

Im ELISA wurde das Standardprotein in einer Verdünnungsreihe eingesetzt und wie die zu untersuchenden Kulturüberstände im ELISA analysiert. Das in den Kulturüberstand sezernierte Zytokin wurde –soweit nicht anders vermerkt- als Dreifachbestimmung je Probe nachgewiesen. Durch die Inkubation der pharmakologischen Substanzen mit dem Standardprotein des ELISA's für 30 min und der anschliessenden Messung des Standardproteins wurde der Einfluss der Substanzen auf die Erkennung der Zytokine im ELISA überprüft.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen arithmetische $MW \pm SEM$. [pg/ml] eines Versuches beispielhaft für die Ergebnisse aus –soweit nicht anders vermerkt- drei unabhängigen Versuchen dar.

Für die Erstellung der Dosis-Wirkungskurve wurden die erhaltenen Messgrößen der Zytokine von 9 unabhängigen Versuchen/verschiedenen Spendern auf Ihre jeweilige LPS-Kontrolle (100 %) im Versuch bezogen. Die Stärke der sezernierten Zytokinmenge von CD-14⁺-Monozyten kann in Abhängigkeit vom Spender variieren, wodurch eine Darstellung der Mittelwerte der Zytokinmenge verschiedener Spender nicht sinnvoll ist. Es wurde die Zytokinbildung eines repräsentativen Versuches (eines Spenders) dargestellt^{60;96;100;101;107;237}.

Die Substanzwirkungen wurden als % Hemmung aus den einzelnen Versuchen nach folgender Formel errechnet:

$((\text{Werte LPS-Kontrolle} - \text{Werte LPS} + \text{Substanz}) / \text{Werte LPS-Kontrolle}) \times 100$.

Routinemäßig erfolgte die Messung der Zytokine IL-10 (Kat. Nr. CH1324C), IL-12p40 (Kat. Nr. CHC1564) und TNF α (Kat. Nr. CHC1754) mit dem ELISA der Fa. Biosource nach Angaben des Herstellers, wobei der primäre Antikörper über Nacht bei +4°C inkubiert wurde. Die Absorptionsmessung erfolgte im ELISA-Reader.

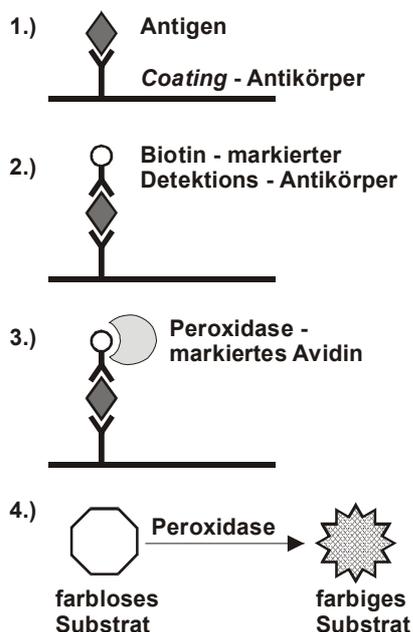


Abb. 62: Prinzip des enzymgebundenen Immunoassay (ELISA) nach der Sandwich-Methode

Bei der Sandwich-Methode wird ein spezifischer, an eine feste Phase (z.B. Mikrotiterplatte) gebundener Erstantikörper mit einer Antigenlösung unbekanntes Gehaltes inkubiert. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden die Mikrotiterplatten mit 5 %iger BSA-Lösung blockiert. Nach 4-maligen Waschen wurden die Mikrotiterplatten mit einem zweiten, biotinmarkiertem Detektionsantikörper, welcher das Antigen spezifisch erkennt, inkubiert. Nach erneutem 4-maligen Waschen wurde dem System Peroxidase-markiertes Avidin hinzugegeben. Dieses bindet an das Biotin des Detektionsantikörpers. Die Peroxidase spaltet eine farblose Substratlösung. Es entsteht ein farbiges Spaltprodukt, welches spektralphotometrisch gemessen wird (Messung bei 450 nm, Referenz bei 690 nm). Über den mitgeführten Antigenstandard wird die Konzentration der Antigen-Lösung ermittelt.

Reagentien:Coating-Puffer (PBS):

8,0 g NaCl, 1,42 g Na₂HPO₄ x H₂O, 0,2 g KH₂PO₄, 0,2 g KCl in 1 Liter Millipore-H₂O, pH-Wert: 7,4

Blocking-Puffer (PBS + 0,5% BSA):

5,0 g BSA in 1 Liter Coating-Puffer, pH-Wert: 7,0-7,4

Wasch-Lösung (PBS + 0,1% Tween 20):

1 mL Tween 20 in 1 Liter Coating-Puffer, pH-Wert: 7,4

Standard-Diluent / Assay-Puffer (PBS + 0,5% BSA + 0,1% Tween 20):

5,0 g BSA in 1 Liter Coating-Puffer plus 1 mL Tween 20, pH-Wert: 7,4

Substrat-Puffer (0,05 M Phosphat-Citrat-Puffer):

257 mL 0,2 M Na₂HPO₄ anhydriert plus 243 mL 0,1 M Citronensäure und 500 mL Millipore-H₂O, pH-Wert: 5,0

Stop-Lösung (1,8 N H₂SO₄):

49 mL konzentrierte H₂SO₄ plus 951 mL Millipore-Wasser.

Besonderheiten zur Messung des IL-10-Proteins

Das Protein IL-10 wurde zusätzlich zum ELISA der Fa. Biosource mit dem R&D ELISA untersucht. Beide IL-10-Standardproteine wurden gegen biologisch aktives rhIL-10-Protein (160 kDa Homodimer) hergestellt (Auskunft Fa. Biosource und Fa. R&D).

Im Biosource ELISA wird ein monoklonaler Erstantikörper (MAB 19) und ein monoklonaler Zweitantikörper (MAB 17) verwendet.

Der MAB 19 der Fa. Biosource erkennt spezifische Regionen (Epitope) im humanen IL-10-Protein, welche an der Rezeptorbindung und Induktion der biologischen Aktivität beteiligt sind²⁰⁹. Der IL-10 ELISA der Fa. R&D (Kat. Nr. DY217) verwendet einen monoklonalen Erstantikörper (MAB 217) und einen polyklonalen Zweitantikörper und wurde entsprechend den Angaben des Herstellers R&D Systems, Europe durchgeführt.

5.5.2 ELISpot

Der ELISpot für IL-12p40 (Kat. Nr. KHE1565 Hu IL-12) und IL-10 (Kat. Nr. KHE1325 Hu IL-10) wurde mit den käuflichen Kits der Fa. Biosource nach den Anweisungen des Herstellers (Fa. Cytech) durchgeführt. Die MW ± S.E.M. aus zwei Proben von drei Versuchen verschiedener Spender wurde aus der Spotbildung von IL-12- bzw. IL-10-Protein der CD-14⁺-Monozyten errechnet.

Der monoklonale Erstantikörper im ELISpot IL-10, wurde gegen rhIL-10-Protein (Heterodimer mit 160 kDa) produziert. Die spezifische Erkennung wurde getestet, indem die neutralisierende Wirkung des Erst-Antikörpers auf die, durch IL-10-Protein vermittelte TNF α -Hemmung in LPS-stimulierten PBMCs überprüft wurde (persönliche Auskunft von P. H. van der Meide, Fa. Cytech).

5.5.3 Proteinarray

Der Proteinarray funktioniert prinzipiell wie ein ELISA, wobei unterschiedliche Antikörper in abgegrenzten Feldern auf einer Membran fixiert sind (Abb. 63). Die Durchführung des Proteinarray erfolgte nach Angaben des Herstellers (Fa. Raybiotek). Der Kulturüberstand von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 2) wurde unverdünnt analysiert.

Die Messung der chemilumineszierenden Punkte (Spots) erfolgte nach 10 min im Multi-Imager. Der Hintergrund jeder Membran (Negativkontrolle) wurde von der Stärke jedes Signals subtrahiert. Die Stärke des Signals auf einer standardisierten Fläche wurde mit dem Auswerteprogramm des Multi-Imager ausgewertet. Die relative Menge der einzelnen Zytokine wurde im Vergleich zu den Positivkontrollen bestimmt. Der Coefficient of Variation für jede Membran errechnete sich nach folgender Formel: Standardabweichung * 100 / mean. Die 6 Positivkontrollen einer Membran wurden als Standard (100 %) verwendet und gegen die gemessenen Proteine auf die Positivkontrolle genormt³². Damit eine Aussage über die Potenz von pharmakologischen Substanzen (Aminothalidomid und Thalidomid) getroffen werden konnte, wurden beide Substanzen äquimolar mit 4 µM eingesetzt. Die Wirkung der pharmakologischen Substanzen wurde als % Hemmung gegenüber der LPS-Kontrolle berechnet.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Pos	Pos	Neg	Neg	ENA-78	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO-a	I-309	IL1 α	IL1 β
2	Pos	Pos	Neg	Neg	ENA-78	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO-a	I-309	IL1 α	IL1 β
3	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10	IL-12p70	IL-13	IL-15	IFN γ
4	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10	IL-12p70	IL-13	IL-15	IFN γ
5	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCSF	MDC	MIG	MIP-1b	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF- β 1
6	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCSF	MDC	MIG	MIP-1b	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF- β 1
7	TNF α	TNF β	EGF	IGF-I	Ang	OSM	Tpo	VEGF	PDGF- β	Leptin	Neg	Pos
8	TNF α	TNF β	EGF	IGF-I	Ang	OSM	Tpo	VEGF	PDGF- β	Leptin	Neg	Pos

Abb. 63: Darstellung der Membran RayBio™ Human Cytokine Array III

Jede Membran ist in 96 Kästchen eingeteilt. Es befinden sich 6 Felder einer Positivkontrolle (Pos, dunkelgraues Feld) und 2 Felder einer Negativkontrolle (Neg, hellgraues Feld) auf jeder Membran. Indem die Positivkontrolle als Bezugsgröße dient, lassen sich die verschiedenen Membranen über die Stärke der Positivkontrolle miteinander relativ vergleichen. Die gelben Felder zeigen Zytokine, welche von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten nach 24 h in den Kulturüberstand sezerniert wurden. Die im Kulturüberstand enthaltenen Zytokine werden durch die spezifischen Antikörper auf der Membran gebunden. Über einen zweiten Antikörper, welcher an ein enzymatisches Detektionssystem gekoppelt ist, erfolgt eine Anfärbung der Membran, welche als „Spot“ sichtbar wird. Die Stärke der gemessenen „Spots“ entspricht der sezernierten Zytokinmenge.

5.6 RNA-Isolierung und RT-PCR

Die RNA-Isolierung und RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion) wurde nach den Grundsätzen der molekularbiologischen Methoden durchgeführt²³⁸. Die Reverse Transkription (RT) wird durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase durchgeführt. Dieses Enzym verwendet ssRNA (einzelsträngige RNA) als Matrize und stellt von dieser eine dsDNA-Kopie her (doppelsträngige DNA, cDNA). Das Primerpaar (synthetisch hergestellte Oligonukleotide) lagert sich am entsprechenden Gegenstück der RNA an und bildet den Startpunkt, an welchem die Synthese beginnt. Die hergestellte cDNA (dsDNA) wird in der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und stellt ein Maß für die steady state mRNA-Menge dar. Durch einen Vergleich der amplifizierten Produktmenge kann somit auf die Regulation der Transkription geschlossen werden.

5.6.1 RNA-Isolierung

Die RNA wurde bei 22°C mittels QIAshreddersäule und RNeasy Mini Kit isoliert (Fa. Qiagen). Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation bei 2000 rpm für 5 min, der Überstand wurde in neues Eppendorfgefäß übertragen und für die Bestimmung im ELISA bei -20°C eingefroren. Die Zellen wurden durch Zugabe von Puffer RLT (350 µl bei bis 5 x 10⁶ Z/ml bzw. 600 µl 5 x 10⁶ bis 1 x 10⁷ Z/ml lysiert und für 1 min gevortext. Das Lysat wurde auf die QIAshreddersäule gegeben und 2 min bei 13000 rpm zentrifugieren. Durch Zugabe von einem Volumen (350 µl oder 600 µl) 70 %-iges Ethanol auf das homogenisierte Lysat wurde DNA gefällt. Anschließend wurden bis zu 700 µl des Gemischs auf die RNeasy-mini-spin-Säule geben und für 15 sec bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule wurde durch Zugabe von 700 µl Puffer RW1 auf die RNeasy-mini-spin-Säule und anschließender Zentrifugation für 15 sec bei 10000 rpm gewaschen. Es erfolgte ein zweiter Waschschrift mit 500 µl ethanolhaltigem Puffer RPE. Der Durchfluss wurde verworfen und das überflüssigem Ethanol durch Zugabe von 500 µl Puffer RPE entfernt. Anschließend wurde die RNeasy-mini-spin-Säule für 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Durch Zugabe von 30 µl RNase freiem-H₂O auf die RNeasy-mini-spin-Säule und erneuter Zentrifugation für 1 min bei 10000 rpm wurde die RNA isoliert.

5.6.2 Bestimmung der Reinheit und Konzentration der RNA

Die RNA wurde zur Denaturierung in Vorbereitung auf die Reverse Transkription für 15 min bei 60 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend im Eisbad kurz abgekühlt. Für die Bestimmung der Reinheit der RNA-Konzentration wurden 2 ml der RNA-Lösung 1:100 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und die optische Dichte (OD) bei 260 nm und 290 nm im Shimadzu-Photometer gemessen. Der Quotient aus der OD_{260nm}/OD_{290nm} wurde bestimmt.

Lag dieser Wert zwischen 1,9 - 2,0, so handelte es sich um eine saubere RNA. War der Quotient < 1,9 lagen Verunreinigung durch Proteine vor und die RNA wurde nicht zur Analyse verwendet.

Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem RiboGreen Quantitation Kit (Fa. Roche). RiboGreen ist ein extrem-empfindlicher Farbstoff, der eine einfache und schnelle Bestimmung der RNA-Konzentration erlaubt. RiboGreen ist, wenn es frei in gelöster Form auftritt, nichtfluoreszierend. Nach Bindung an die RNA erhöht sich die Fluoreszenz der RiboGreen-Lösung um mehr als das 1000-fache. Das RiboGreen-Reagenz wurde in einfach Tris-Puffer 1:200 verdünnt. Die mitgelieferte RNA diente als Standard (15 ng/ml – 1000 ng/ml). Bei einem Einsatz von 5 x 10⁶ Zellen/well wurde die isolierte RNA 1:280 in der Messung eingesetzt. In eine Mikrolite-Platte wurden zu 50 µl Standard bzw. 50 µl Probe pro well 50 µl RiboGreen Reagenz zugegeben. Die Messung erfolgte im Fluoreszenz Platten-Messgerät bei einer Extinktionswellenlänge von 495 nm, einer Emissionswellenlänge von 535 nm, einer Einstellung gain optimal (ca. 60), 3 flashes und 40 µs Integration. Die Eichkurve war bis 1000 nmol RNA/ml linear. Die Auswertung erfolgte mit Excel 97 und GraphPad Prism4.0®.

5.6.3 Reverse Transkription

Zur Synthese eines komplementären DNA-Stranges der mRNA-Matrize wurde die Reverse Transkriptase (Omniscript) verwendet. Die RNA wurde in allen Proben auf die höchstmögliche gemeinsame Konzentration eingestellt (1 µg - 1,5 µg RNA/25 µl). Für die Reverse Transkription wurde pro Probe ein Mastermix mit folgenden Lösungen hergestellt: 5,5 µl RNase-freies Wasser, 4 µl 10-fach Puffer, 4 µl Nukleosid-Tri-Phosphate-Mix (5 mM), 4 µl Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (500 µg/ml, 8 µM), 0,5 µl RNase Inhibitor (20 U / 40 µl Reaktion-RNaseOut) und 2 µl Omniscript Reverse Transkriptase. Zu 25 µl RNA-Lösung wurden je 15 µl Mastermix gegeben. Als Kontrolle wurde eine Reaktion ohne das Enzym Reverse Transkriptase (RT-Kontrolle) mitgeführt. Die Reverse Transkription wurde im Thermocycler der Fa. Eppendorf bei 37°C für 60 min durchgeführt. Das Enzym wurde nach der Reaktion durch Erhitzen (93°C, 5 min) inaktiviert und auf +4°C abgekühlt.

Das Reaktionsgemisch wurde durch Zugabe von 160 µl RNase-freiem Wasser vor dem Einsatz in der PCR verdünnt. Die Proben wurden während der Analyse bei +4°C gelagert und anschließend bei -20°C aufbewahrt.

5.6.4 Real Time PCR

Prinzip:

Das dem Light-Cycler™-Verfahren zugrunde liegende Prinzip der Real Time PCR besteht in der kontinuierlichen Messung eines Fluoreszenzsignals, welches während der PCR proportional mit der Menge des Amplifikationsprodukts ansteigt. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde SYBR-Green I verwendet, welcher unspezifisch in die Doppelstrang-DNA interkaliert. Der Vorteil der Methode liegt in der ständigen Messung (Real Time) des entstehenden PCR-Produkts, wodurch nur die in der linearen Phase der PCR-Reaktion gebildeten PCR-Produkte ermittelt werden³⁵.

Die amplifizierten PCR-Produkte können anschließend aufgeschmolzen werden und anhand des spezifischen Schmelzpunktes eines jeden Produktes kann die Bildung der spezifischen PCR-Fragmente überprüft werden. Die Möglichkeit der Bildung von Primer-Dimern wurde durch die Verwendung von hot-start Polymerasen sehr gering gehalten²³⁹.

Um Abweichungen in einzelnen Proben, welche während der Zwischenschritte z.B. bei der Umschreibung der mRNA in die cDNA während der Reversen Transkription oder bei der Probenbeladung für die Real-Time PCR auszugleichen („Normierung“ der Proben), wird die Expressionsmenge der Zytokine (Ziel-mRNA) auf die Expressionsmenge eines unveränderlichen Genes bezogen^{33;35;162}. Haushaltsgene, wie die GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase) eignen sich besonders für „Normierung“ der Proben, da die Synthese der Haushaltsgene in der Regel gleichmäßig erfolgt^{159;160}.

Die Synthese der Oligonukleotide / Primer (entsalzt, HPLC-gereinigt) erfolgte durch die Firma MWG-Biotech AG. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden zur Herstellung einer 200 µM Stocklösung in der entsprechenden Menge RNase-freiem Wasser gelöst.

Die PCR-Reaktionsprodukte wurden im Agarosegel (2,5 %) auf ihre Größe und Reinheit überprüft und nur die Primerpaare, welche Amplifikationsprodukte mit der richtigen Größe lieferten, wurden für die Analyse verwendet.

Das PCR-Produkt wurde in BlueJuice Gel Loading Buffer auf ein Agarosegel (2,5 %) aufgetragen und elektrophoretisch (200 V, 35 min) getrennt (Daten nicht gezeigt). Zur Bestimmung der Fragmentlänge diente der DNA-Molekulargewichtsmarker „100 Bp-Ladder“. Die Detektion und Berechnung der Proben erfolgte mit dem Fluor-S Multimager und der Software der Fa. Biorad. Die Ergebnisse für die Parameter IL-12p40 und IL-10 wurden durch je eine zweites Primerpaar, welche andere PCR-Produkte amplifiziert, bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Durchführung:

Die PCR-Reaktion erfolgte im LightCycler™ der Fa. Roche nach den Angaben des Herstellers. In Abhängigkeit von den etablierten Primerbedingungen wurde der DNA Master SYBRGreen (Roche) oder das QuantiTec SYBRGreen (Qiagen) verwendet. Es wurden 2 µl Template (cDNA) in einem Gesamtvolumen von 20 µl in der PCR eingesetzt. Der Primermix für eine Reaktion wurde aus 1 µl (4 µM) Sense-Primer und 1 µl (4 µM) Antisense-Primer hergestellt (Tab. 13).

Tab. 13: : PCR-Lösungen für die Reaktion im LightCycler™

Die Sequenzen der Primerpaare und die amplifizierte Produktlängen sind in Tab. 14 aufgelistet. Die Primer für HPRT, β2 Mikroglobulin, β-aktin, GAPDH zur Bestimmung der Kopien wurden bei der Fa. Roche gekauft und die PCR erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Die Quantifizierung erfolgte über die mitgelieferte cDNA in pg genomischer DNA/Reaktion.

	QuantiTec SYBRGreen (Qiagen)	DNA Master SYBRGreen (Roche)
SybrGreenMaster	10 µl	2 µl
H ₂ O	6 µl	11,6 µl
MgCL ₂ 2 mM)	---	2,4 µl
Primermix	2 µl	2 µl
Inaktivierung der Polymerase	15 min	10 min

Tab. 14: In der PCR verwendete Primerpaare mit den zugehörigen PCR-Bedingungen:

Die Amplifikation aller verwendeten Primerpaare hatte ihren linearen Bereich zwischen 30 und 40 Zyklen. Das PCR-Programm wurde je nach verwendeten Primerpaar im LightCycler™ gestartet. Vorinkubation 95°C 10-15 Min – zur Inaktivierung der Polymerase, 95°C 30 Sekunden zu Denaturierung der DNA, Annealing Temperatur 30 Sekunden bei der entsprechenden Temperatur für das Primer, 72° für 18-40 Sekunden (1 sec/25 Bp amplifiziertem Produkt), Wiederholung des Zyklus ab dem 2. Schritt entsprechend der 40 Zyklen, Aufschmelzen der amplifizierten Produkte.

* in der Arbeit gezeigte Ergebnisse

Name	Sequenz Sense (5' nach 3')	Sequenz Antisense (5' nach 3')	Fragmentgröße / Annealing Temperatur	Quelle
TNFα *	GGC TCC AGG CGG TGC TTG TTC	AGA CGG CGA TGC GGC TGA TG	409 Bp / 67°C	eigene Primer
TNFα	CGG GAC GTG GAG CTG GCC GAG GAG	CAC CAG CTG GTT ATC TCT CAG CTC	355 Bp / 60°C	eigene Primer
IL-12p40-neu*	GAG TCT GCC CAT TGA GGT CAT	AAT TTT CAT CCT GGA TCA GAA CC	397 Bp / 60°C	eigene Primer
IL-12p40	bei Fa. Biosource gekauft		273 Bp / 50° C	Fa. Biosource
IL-10-DA*	GCC TAA CAT GCT TCG AGA TC	TGA TGT CTG GGT CTT GGT TC	204 Bp / 60 °C	²⁴⁰
IL-10-alt	ATG CCC CAA GCT GAG AAC CAA GAC CCA G	TGG GAT AGC TGA CCC AGC CCC TTG AGA	189 Bp / 60°C	eigene Primerkombination

Name	Sequenz Sense (5' nach 3')	Sequenz Antisense (5' nach 3')	Fragmentgröße / Annealing Temperatur	Quelle
18S rRNA	GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT	CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG	111 Bp / 53 °C	¹⁶⁰
GAPDH	TGC ACC ACC AAC TGC TTAG	GAT GCA GGG ATG ATG TTC	190 Bp / 60 °C	³⁵
β-aktin	ACC AAC TGG GAC GAT ATG GAG AAG A	TAC GAC CAG AGG CAT ACA GGG ACAA	192 Bp / 58 °C	³⁵

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach den Angaben der Fa. Roche mit dem Auswerteprogramm des Light-Cycler™. Eine Verdünnungsreihe aus einem cDNApool verschiedener CD14⁺-Monozyten mehrerer Spender wurde als Standard eingesetzt. In Anlehnung an die konventionelle PCR wurde die Expressionsmenge der Ziel-mRNA normalisiert. Hierbei wurde der Quotient aus der Ziel-mRNA-Menge und der Haushaltsgen-mRNA-Menge (GAPDH) einer Probe gebildet, um eventuelle Beladungsfehler oder Schwankungen in der RT auszugleichen^{35;160;162}. Die Menge der mRNA wurde in der log Abbildung dargestellt¹⁷⁸.

5.7 Messung der Zytotoxizität und Apoptose

5.7.1 AlamarBlue™

Der Einfluss von Testsubstanzen auf die Zytotoxizität wurde im AlamarBlue™ bestimmt. Der AlamarBlue™ ist ein ungiftiger Oxidations-Reduktions-Indikator, der bei erfolgter chemischer Reduktion seine Fluoreszenz als auch seine Farbe ändert. Die chemische Reduktion von AlamarBlue™ findet in lebenden Zellen proportional zum zellulären Metabolismus und zur intrazellulären Enzymaktivität statt und stellt somit ein Maß der Anzahl lebender Zellen dar.

Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die AlamarBlue™-Lösung wurde mit im Kulturmedium zu 5 % verdünnt. Je 100 µl/well wurden auf die Zellen (96-well Format) gegeben und im Brutschrank inkubiert. Nach 4 h erfolgte die photometrische Messung bei 570 nm und bei 600 nm. Aus den gemessenen Extinktionen wird mit den Korrekturfaktoren der jeweiligen molaren Extinktionskoeffizienten die prozentuale Hemmung (auf die Kontrolle bezogen) nach folgender Formel ermittelt:

$$\frac{100 - (117,216 \cdot OD_{570nm} \text{ Probe}) - (80,586 \cdot OD_{600nm} \text{ Probe})}{((117,216 \cdot OD_{570nm} \text{ Kontrolle}) - (80,586 \cdot OD_{600nm} \text{ Kontrolle})) \cdot 100}$$

Als Maß der Zytotoxizität wurde die prozentuale Veränderung der behandelten Zellen gegen die jeweiligen Kontrollen ermittelt. Hemmungen größer als 20 % wurden als zytotoxische Effekte betrachtet.

5.7.2 Cell Death Detection ELISA®

Im Cell Death Detection ELISA® werden mono- und oligonukleosome DNA-Fragmente über gegen Histone gerichtete Antikörper mittels ELISA's nachgewiesen. Für die Messung der Apoptose wurden die CD-14⁺-Monozyten (Ansatz 1) mit dem Cell Death Detection ELISA® entsprechend den Angaben des Herstellers lysiert.

Zur Bestimmung der Apoptose wurden die Zellysate 1:100 verdünnt. Zur Untersuchung der Nekrose wurde der Kulturüberstand unverdünnt eingesetzt.

Die Durchführung des Cell Death Detection ELISA[®] erfolgte mit den im Kit enthaltenen Reagenzien nach folgender Anleitung:

- 50 µl Anti-Histone-Antikörper auf eine Mikrotiterplatte geben, waschen mit 200 µl Waschpuffer
- Inkubation mit 200 µl Inkubationspuffer für 30 min und erneutes Waschen
- mit 100 µl der Probe (Kulturüberstand oder Zellysat) für 90 min bei 22 °C inkubieren und erneut Waschen
- Inkubation mit 100 µl anti-DNA Peroxidase für 90 min
- Zugabe der Substratlösung und 9 min inkubieren
- Messen bei 405 nm (490 nm Referenz) im Plattenleser.

Die Linearität der Entwicklung war bis 9 min nach Zugabe des Substrates gegeben.

5.7.3 Apo-ONE[®] Homogeneous Caspase-3/7 Assay

Das „Apo-ONE[®] Homogeneous Caspase-3/7 Assay“ erlaubt die indirekt Messung des aktiven Caspase 3/7-Enzyms. Die Caspase-3/7 spaltet einen Aspartat-Rest vom prä-floureszierendem Caspase-3/7 Substrate Rhodamine 110 ab, wodurch ein floureszierenden Produkt entsteht, welches bei einer bestimmten Wellenlänge (Extinktion_{498 nm} und Emision_{521 nm}) gemessen wird. Zunächst wurden die CD-14⁺-Monozyten nach verschiedenen Zeiten der LPS-Stimulation unter Zugabe eines Lyse/Aktivitätspuffers, welcher das prä-floureszierende Caspase-3/7 Substrate enthielt, lysiert. Die endogenen Caspasen-3/7 wurde aus den CD-14⁺-Monozyten freigesetzt, wodurch diese das prä-floureszierende Caspase-3/7 Substrate spalten konnten. Zunächst wurden nach verschiedenen Stimulationszeiten 150 µl Kulturüberstand der CD14⁺-Monozyten abgenommen, zentrifugiert (4°C, 2000 g und 3 min) und bis zur Bestimmung der Zytokine mittels Apo-ONE[®] Homogeneous Caspase-3/7 Assay (Fa. Promega) bei -20°C gelagert. Zu den verbleibenden Zellen wurden 100 µl im Kit enthaltener Lysis/Aktivitätspuffer gegeben und die Zellen wurden zur Lyse für 1 h im Dunkeln bei RT geschüttelt. Das im Kit enthaltene floureszierende Substrat Rhodamine 110 (Extinktion 498 nm, Emision 521 nm) wurde 16 h nach Zellyse im Fluoreszenz Platten-Messgerät gemessen.

5.8 Nachweis der Phosphorylierung der p38-MAPK

5.8.1 Aufarbeitung der Proben

Die Untersuchung der Kinase-Aktivität anhand der Phosphorylierungsstärke wurden analog zu den Stimulationsversuchen Ansatz 2 durchgeführt. Die Stimulation erfolgte mit 10 µg/ml LPS oder 0,256 mM-20 µM Anisomycin. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation (4 °C, 2000 g, 3 min) und der Überstand wurde zur Bestimmung der freigesetzten Zytokine im ELISA abgenommen. Das Pellet wurde mit 1 ml eiskaltem sterilem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (4 °C, 2000 g, 3 min). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen sofort bei - 80°C eingefroren.

Die eingefrorenen Proben wurden auf Eis aufgetaut. Durch Zugabe von 100 µl Extraktionspuffer mit Protease-Inhibitor-Complete® und 3-maligem vortexen nach 10 min für insgesamt 30 min auf Eis, erfolgte die vollständige Lyse der Zellen. Das Volumen des Lysepuffers hing von der eingesetzten Zellzahl ab. Für 1×10^7 Zellen wurden je 100 µl Extraktionspuffer verwendet.

Der Extrakt wurde anschließend zentrifugiert (13.000 g, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

5.8.2 Untersuchung der MAPK-Phosphorylierung

Die Aktivierung der p38α-MAPK wurde anhand der Stärke der Phosphorylierung der p38α-MAPK an Threonin 180 und Tyrosin 182 im ELISA der Fa. Biosource quantifiziert. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Menge an p38α-phosphoryliertem Protein bzw. die Gesamtmenge an isolierter p38α-MAPK wurde über ein entsprechendes Standardprotein quantifiziert. Durch einen spezifischen primären Kaninchen-Antikörper, welcher nur die phosphorylierte Form der p38α-MAPK [pTpY180/182] erkennt, ist eine Quantifizierung der phosphorylierten Form der p38α-MAPK möglich. Für die Erkennung des Gesamtproteins diente als Primär-Antikörper ein spezifischer Kaninchen-Antikörper, welcher sowohl die phosphorylierte als auch die nicht-phosphorylierte Form der p38α-MAPK erkennt und somit die Quantifizierung des Gesamtproteins der p38α-MAPK erlaubt. Für beide Primär-Antikörper diente ein polyklonaler Immunglobulin (IgG) Kaninchen-Antikörper als Sekundär-Antikörper, welcher an eine Alkalische Phosphatase gekoppelt war. Die Ergebnisse aus dem p38α-MAPK [pTpY180/182] ELISA wurden auf die Gesamtmenge an p38α-MAPK im Kernextrakt bezogen (Normierung). Der prozentuale Anteil an phosphorylierter p38α-MAPK [pTpY180/182] wurde nach folgender Formel berechnet:

$(\text{Menge p38}\alpha\text{-MAPK [pTpY180/182]} / \text{Gesamtmenge an p38}\alpha\text{-MAPK}) \times 100 \%$
und graphisch dargestellt.

5.9 Statistik

Für den Vergleich einzelner Behandlungsgruppen wurde der ANOVA-Test (Two-Way Analysis Of Variance) verwendet. Die Daten der Substanzbehandlungen wurden als % Wert zu den Kontrollen dargestellt. Für den Vergleich zwischen den einzelnen Spendern wurde der Student's t-test verwendet. Für beide Tests wurde ein P-Wert < 0,05 als signifikant betrachtet. Die statistischen Tests wurden mit dem Programm GraphPadPrism4.0® durchgeführt.

6 LITERATUR

Reference List

1. Delves PJ, Roitt IM: The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* 343:108-117, 2000
2. Delves PJ, Roitt IM: The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 343:37-49, 2000
3. Imhof BA, Aurrand-Lions M: Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol* 4:432-444, 2004
4. Whitelaw DM: Observations on human monocyte kinetics after pulse labeling. *Cell Tissue Kinet* 5:311-317, 1972
5. Johnston RB, Jr.: Current concepts: immunology. Monocytes and macrophages. *N Engl J Med* 318:747-752, 1988
6. Zembala M., Asherson G.L.. *Human Monocytes*. 1989. Academic Press New York.
7. Medzhitov R, Janeway CA, Jr.: Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 9:4-9, 1997
8. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, et al: Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11:443-451, 1999
9. Beutler B, Poltorak A: The search for Lps: 1993-1998. *J Endotoxin Res* 6:269-293, 2000
10. Beutler B, Rietschel ET: Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* 3:169-176, 2003
11. Guha M, Mackman N: LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 13:85-94, 2001
12. Akira S, Takeda K: Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4:499-511, 2004
13. Boulton TG, Cobb MH: Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regul* 2:357-371, 1991
14. Robbins DJ, Zhen E, Owaki H, et al: Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. *J Biol Chem* 268:5097-5106, 1993
15. Ip YT, Davis RJ: Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 10:205-219, 1998
16. Han J, Lee JD, Bibbs L, et al: A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265:808-811, 1994
17. Songyang Z, Lu KP, Kwon YT, et al: A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Mol Cell Biol* 16:6486-6493, 1996
18. Chang F, Steelman LS, Lee JT, et al: Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia* 17:1263-1293, 2003
19. Davies SP, Reddy H, Caivano M, et al: Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351:95-105, 2000

20. Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, et al: Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 253:407-414, 1991
21. Cohen P: Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov* 1:309-315, 2002
22. Mullauer L, Gruber P, Sebinger D, et al: Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat Res* 488:211-231, 2001
23. Mangan DF, Welch GR, Wahl SM: Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and IL-1 beta prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood monocytes. *J Immunol* 146:1541-1546, 1991
24. Mangan DF, Wahl SM: Differential regulation of human monocyte programmed cell death (apoptosis) by chemotactic factors and pro-inflammatory cytokines. *J Immunol* 147:3408-3412, 1991
25. Mangan DF, Mergenhagen SE, Wahl SM: Apoptosis in human monocytes: possible role in chronic inflammatory diseases. *J Periodontol* 64:461-466, 1993
26. Bzowska M, Guzik K, Barczyk K, et al: Increased IL-10 production during spontaneous apoptosis of monocytes. *Eur J Immunol* 32:2011-2020, 2002
27. Deveraux QL, Stennicke HR, Salvesen GS, et al: Endogenous inhibitors of caspases. *J Clin Immunol* 19:388-398, 1999
28. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH: Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68:383-424.:383-424, 1999
29. Warny M, Kelly CP: Monocytic cell necrosis is mediated by potassium depletion and caspase-like proteases. *Am J Physiol* 276:C717-C724, 1999
30. Adams JM, Cory S: The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281:1322-1326, 1998
31. Balkwill FR, Burke F: The cytokine network. *Immunol Today* 10:299-304, 1989
32. Copeland S, Siddiqui J, Remick D: Direct comparison of traditional ELISAs and membrane protein arrays for detection and quantification of human cytokines. *J Immunol Methods* 284:99-106, 2004
33. Listvanova S, Temmerman S, Stordeur P, et al: Optimal kinetics for quantification of antigen-induced cytokines in human peripheral blood mononuclear cells by real-time PCR and by ELISA. *J Immunol Methods* 281:27-35, 2003
34. Kouwenhoven M, Ozenci V, Teleshova N, et al: Enzyme-linked immunospot assays provide a sensitive tool for detection of cytokine secretion by monocytes. *Clin Diagn Lab Immunol* 8:1248-1257, 2001
35. Blaschke V, Reich K, Blaschke S, et al: Rapid quantitation of proinflammatory and chemoattractant cytokine expression in small tissue samples and monocyte-derived dendritic cells: validation of a new real-time RT-PCR technology. *J Immunol Methods* 246:79-90, 2000
36. Loppnow H.. Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen. Band 42, Nummer 1 , 13-27. 2003. *Der Internist* , Springer-Verlag Heidelberg.
37. Asadullah K, Sterry W, Volk HD: Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev* 55:241-269, 2003

38. Beutler B, Bazzoni F: TNF, apoptosis and autoimmunity: a common thread? *Blood Cells Mol Dis* 24:216-230, 1998
39. Elenkov IJ, Chrousos GP, Wilder RL: Neuroendocrine regulation of IL-12 and TNF-alpha/IL-10 balance. Clinical implications. *Ann N Y Acad Sci* 917:94-105.:94-105, 2000
40. Fagiolo E, Toriani-Terenzi C: Th1 and Th2 cytokine modulation by IL-10/IL-12 imbalance in autoimmune haemolytic anaemia (AIHA). *Autoimmunity* 35:39-44, 2002
41. Trembleau S, Germann T, Gately MK, et al: The role of IL-12 in the induction of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* 16:383-386, 1995
42. Beebe AM, Cua DJ, de Waal MR: The role of interleukin-10 in autoimmune disease: systemic lupus erythematosus (SLE) and multiple sclerosis (MS). *Cytokine Growth Factor Rev* 13:403-412, 2002
43. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN: Rheumatoid arthritis. *Cell* 85:307-310, 1996
44. Marchetti F, Martelossi S, Ventura A: Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 347:1982-1984, 2002
45. Aggarwal BB: Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3:745-756, 2003
46. Campbell IK, Roberts LJ, Wicks IP: Molecular targets in immune-mediated diseases: the case of tumour necrosis factor and rheumatoid arthritis. *Immunol Cell Biol* 81:354-366, 2003
47. Vizcarra C: New perspectives and emerging therapies for immune-mediated inflammatory disorders. *J Infus Nurs* 26:319-325, 2003
48. Muller G, Saloga J, Germann T, et al: IL-12 as mediator and adjuvant for the induction of contact sensitivity in vivo. *J Immunol* 155:4661-4668, 1995
49. Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, et al: Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 182:1281-1290, 1995
50. Powrie F: T cells in inflammatory bowel disease: protective and pathogenic roles. *Immunity* 3:171-174, 1995
51. Rudolphi A, Bonhagen K, Reimann J: Polyclonal expansion of adoptively transferred CD4+ alpha beta T cells in the colonic lamina propria of scid mice with colitis. *Eur J Immunol* 26:1156-1163, 1996
52. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, et al: Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75:263-274, 1993
53. Braat H, Peppelenbosch MP, Hommes DW: Interleukin-10-based therapy for inflammatory bowel disease. *Expert Opin Biol Ther* 3:725-731, 2003
54. Janeway CA, Jr., Medzhitov R: Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.:197-216, 2002
55. Aggarwal BB, Eessalu TE, Hass PE: Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. *Nature* %19-1986 Jan 1;318:665-667, 1985
56. Raabe T, Bukrinsky M, Currie RA: Relative contribution of transcription and translation to the induction of tumor necrosis factor-alpha by lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 273:974-980, 1998

57. Myokai F, Takashiba S, Lebo R, et al: A novel lipopolysaccharide-induced transcription factor regulating tumor necrosis factor alpha gene expression: molecular cloning, sequencing, characterization, and chromosomal assignment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4518-4523, 1999
58. Eck MJ, Beutler B, Kuo G, et al: Crystallization of trimeric recombinant human tumor necrosis factor (cachectin). *J Biol Chem* 263:12816-12819, 1988
59. Imamura K, Spriggs D, Kufe D: Expression of tumor necrosis factor receptors on human monocytes and internalization of receptor bound ligand. *J Immunol* 139:2989-2992, 1987
60. Aste-Amezaga M, Ma X, Sartori A, et al: Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J Immunol* 160:5936-5944, 1998
61. Wanidworanun C, Strober W: Predominant role of tumor necrosis factor-alpha in human monocyte IL-10 synthesis. *J Immunol* 151:6853-6861, 1993
62. Beutler B, Cerami A: Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 320:584-588, 1986
63. Mutschler E., Geisslinger G, Kroemer H.K., et al. *Mutschler Arzneimittelwirkungen*. 2001. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2001.
64. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, et al: Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 10:4025-4031, 1991
65. D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante NM, et al: Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med* 176:1387-1398, 1992
66. Gubler U, Chua AO, Schoenhaut DS, et al: Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4143-4147, 1991
67. Podlaski FJ, Nanduri VB, Hulmes JD, et al: Molecular characterization of interleukin 12. *Arch Biochem Biophys* 294:230-237, 1992
68. Wolf SF, Temple PA, Kobayashi M, et al: Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J Immunol* 146:3074-3081, 1991
69. Sieburth D, Jabs EW, Warrington JA, et al: Assignment of genes encoding a unique cytokine (IL12) composed of two unrelated subunits to chromosomes 3 and 5. *Genomics* 14:59-62, 1992
70. Hayes MP, Wang J, Norcross MA: Regulation of interleukin-12 expression in human monocytes: selective priming by interferon-gamma of lipopolysaccharide-inducible p35 and p40 genes. *Blood* 86:646-650, 1995
71. Abdi K: IL-12: the role of p40 versus p75. *Scand J Immunol* 56:1-11, 2002
72. Becker C, Wirtz S, Blessing M, et al: Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *J Clin Invest* 112:693-706, 2003
73. Ma W, Gee K, Lim W, et al: Dexamethasone inhibits IL-12p40 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytic cells by down-regulating the activity of c-Jun N-terminal kinase, the activation protein-1, and NF-kappaB transcription factors. *J Immunol* 172:318-330, 2004
74. Trinchieri G: Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3:133-146, 2003
75. Yoon C, Johnston SC, Tang J, et al: Charged residues dominate a unique interlocking topography in the heterodimeric cytokine interleukin-12. *EMBO J* 19:3530-3541, 2000

76. Trinchieri G: Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 13:251-76.:251-276, 1995
77. Desai BB, Quinn PM, Wolitzky AG, et al: IL-12 receptor. II. Distribution and regulation of receptor expression. *J Immunol* 148:3125-3132, 1992
78. Chan SH, Kobayashi M, Santoli D, et al: Mechanisms of IFN-gamma induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12). Role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2. *J Immunol* 148:92-98, 1992
79. Biron CA, Gazzinelli RT: Effects of IL-12 on immune responses to microbial infections: a key mediator in regulating disease outcome. *Curr Opin Immunol* 7:485-496, 1995
80. de Waal MR, Yssel H, Roncarolo MG, et al: Interleukin-10. *Curr Opin Immunol* 4:314-320, 1992
81. Germann T, Gately MK, Schoenhaut DS, et al: Interleukin-12/T cell stimulating factor, a cytokine with multiple effects on T helper type 1 (Th1) but not on Th2 cells. *Eur J Immunol* 23:1762-1770, 1993
82. Dumoutier L, Renauld JC: Viral and cellular interleukin-10 (IL-10)-related cytokines: from structures to functions. *Eur Cytokine Netw* 13:5-15, 2002
83. Vieira P, Waal-Malefyt R, Dang MN, et al: Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1172-1176, 1991
84. Fickenscher H, Hor S, Kupers H, et al: The interleukin-10 family of cytokines. *Trends Immunol* 23:89-96, 2002
85. Syto R, Murgolo NJ, Braswell EH, et al: Structural and biological stability of the human interleukin 10 homodimer. *Biochemistry* 37:16943-16951, 1998
86. Renauld JC: Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators. *Nat Rev Immunol* 3:667-676, 2003
87. Cairns AP, Crockard AD, Bell AL: Interleukin-10 receptor expression in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 21:83-86, 2003
88. de Waal MR, Abrams J, Bennett B, et al: Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174:1209-1220, 1991
89. Howard M, Muchamuel T, Andrade S, et al: Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J Exp Med* 177:1205-1208, 1993
90. Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S, et al: In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 157:798-805, 1996
91. Ziegler-Heitbrock HW, Passlick B, Flieger D: The monoclonal antimonocyte antibody My4 stains B lymphocytes and two distinct monocyte subsets in human peripheral blood. *Hybridoma* 7:521-527, 1988
92. Geissmann F, Jung S, Littman DR: Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19:71-82, 2003
93. Donnelly RP, Fenton MJ, Finbloom DS, et al: Differential regulation of IL-1 production in human monocytes by IFN-gamma and IL-4. *J Immunol* 145:569-575, 1990

94. Arrighi JF, Rebsamen M, Rousset F, et al: A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF- α , and contact sensitizers. *J Immunol* 166:3837-3845, 2001
95. Moore KW, de Waal MR, Coffman RL, et al: Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19:683-765.:683-765, 2001
96. Foey AD, Parry SL, Williams LM, et al: Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF- α : role of the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. *J Immunol* 160:920-928, 1998
97. Arend WP, Smith MF, Jr., Janson RW, et al: IL-1 receptor antagonist and IL-1 beta production in human monocytes are regulated differently. *J Immunol* 147:1530-1536, 1991
98. Dickensheets HL, Freeman SL, Smith MF, et al: Interleukin-10 upregulates tumor necrosis factor receptor type-II (p75) gene expression in endotoxin-stimulated human monocytes. *Blood* 90:4162-4171, 1997
99. Hart PH, Hunt EK, Bonder CS, et al: Regulation of surface and soluble TNF receptor expression on human monocytes and synovial fluid macrophages by IL-4 and IL-10. *J Immunol* 157:3672-3680, 1996
100. Jenkins JK, Malyak M, Arend WP: The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils. *Lymphokine Cytokine Res* 13:47-54, 1994
101. Niho Y, Niiro H, Tanaka Y, et al: Role of IL-10 in the crossregulation of prostaglandins and cytokines in monocytes. *Acta Haematol* 99:165-170, 1998
102. MacKenzie S, Fernandez-Troy N, Espel E: Post-transcriptional regulation of TNF- α during in vitro differentiation of human monocytes/macrophages in primary culture. *J Leukoc Biol* 71:1026-1032, 2002
103. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, et al: High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11:231-238, 1990
104. Becker S, Warren MK, Haskill S: Colony-stimulating factor-induced monocyte survival and differentiation into macrophages in serum-free cultures. *J Immunol* 139:3703-3709, 1987
105. Lund PK, Westvik AB, Joo GB, et al: Flow cytometric evaluation of apoptosis, necrosis and recovery when culturing monocytes. *J Immunol Methods* 252:45-55, 2001
106. Rutault K, Hazzalin CA, Mahadevan LC: Combinations of ERK and p38 MAPK inhibitors ablate tumor necrosis factor- α (TNF- α) mRNA induction. Evidence for selective destabilization of TNF- α transcripts. *J Biol Chem* 276:6666-6674, 2001
107. Lim W, Ma W, Gee K, et al: Distinct role of p38 and c-Jun N-terminal kinases in IL-10-dependent and IL-10-independent regulation of the costimulatory molecule B7.2 in lipopolysaccharide-stimulated human monocytic cells. *J Immunol* 168:1759-1769, 2002
108. Ma W, Lim W, Gee K, et al: The p38 mitogen-activated kinase pathway regulates the human interleukin-10 promoter via the activation of Sp1 transcription factor in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages. *J Biol Chem* 276:13664-13674, 2001
109. Waetzig GH, Seegert D, Rosenstiel P, et al: p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF- α signaling in inflammatory bowel disease. *J Immunol* 168:5342-5351, 2002
110. Muller GW, Shire MG, Wong LM, et al: Thalidomide analogs and PDE4 inhibition. *Bioorg Med Chem Lett* 8:2669-2674, 1998

111. Wenzel D, Wenzel KH. Der Contergan-Prozess. 2, 56-70. 1968. Wissenschaft und Forschung GmbH.
112. Muller GW, Chen R, Huang SY, et al: Amino-substituted thalidomide analogs: potent inhibitors of TNF-alpha production. *Bioorg Med Chem Lett* 9:1625-1630, 1999
113. Laffitte E, Revuz J: Thalidomide: an old drug with new clinical applications. *Expert Opin Drug Saf* 3:47-56, 2004
114. Hashimoto Y: Structural development of biological response modifiers based on thalidomide. *Bioorg Med Chem* 10:461-479, 2002
115. Shames BD, McIntyre RC, Jr., Bensard DD, et al: Suppression of tumor necrosis factor alpha production by cAMP in human monocytes: dissociation with mRNA level and independent of interleukin-10. *J Surg Res* 99:187-193, 2001
116. Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, et al: Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med* 173:699-703, 1991
117. Corral LG, Muller GW, Moreira AL, et al: Selection of novel analogs of thalidomide with enhanced tumor necrosis factor alpha inhibitory activity. *Mol Med* 2:506-515, 1996
118. Teo SK, Sabourin PJ, O'Brien K, et al: Metabolism of thalidomide in human microsomes, cloned human cytochrome P-450 isozymes, and Hansen's disease patients. *J Biochem Mol Toxicol* 14:140-147, 2000
119. Corral LG, Haslett PA, Muller GW, et al: Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF-alpha. *J Immunol* 163:380-386, 1999
120. van Crevel R, Vonk AG, Netea MG, et al: Modulation of LPS-, PHA- and M. tuberculosis-mediated cytokine production by pentoxifylline and thalidomide. *Eur Cytokine Netw* 11:574-579, 2000
121. Shannon EJ, Sandoval F: Thalidomide can be either agonistic or antagonistic to LPS evoked synthesis of TNF-alpha by mononuclear cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 18:59-72, 1996
122. Marriott JB, Westby M, Cookson S, et al: CC-3052: a water-soluble analog of thalidomide and potent inhibitor of activation-induced TNF-alpha production. *J Immunol* 161:4236-4243, 1998
123. Rowland TL, McHugh SM, Deighton J, et al: Differential regulation by thalidomide and dexamethasone of cytokine expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunopharmacology* 40:11-20, 1998
124. Moller DR, Wysocka M, Greenlee BM, et al: Inhibition of IL-12 production by thalidomide. *J Immunol* 159:5157-5161, 1997
125. Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinis A, et al: Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med* 177:1675-1680, 1993
126. Moreira AL, Corral LG, Ye W, et al: Thalidomide and thalidomide analogs reduce HIV type 1 replication in human macrophages in vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses* 13:857-863, 1997
127. Moreira AL, Friedlander DR, Shif B, et al: Thalidomide and a thalidomide analogue inhibit endothelial cell proliferation in vitro. *J Neurooncol* 43:109-114, 1999
128. Keifer JA, Guttridge DC, Ashburner BP, et al: Inhibition of NF-kappa B activity by thalidomide through suppression of IkkappaB kinase activity. *J Biol Chem* 276:22382-22387, 2001

129. Majumdar S, Lamothe B, Aggarwal BB: Thalidomide suppresses NF-kappa B activation induced by TNF and H₂O₂, but not that activated by ceramide, lipopolysaccharides, or phorbol ester. *J Immunol* 168:2644-2651, 2002
130. Dredge K, Marriott JB, Dalgleish AG: Immunological effects of thalidomide and its chemical and functional analogs. *Crit Rev Immunol* 22:425-437, 2002
131. Dredge K, Marriott JB, Macdonald CD, et al: Novel thalidomide analogues display anti-angiogenic activity independently of immunomodulatory effects. *Br J Cancer* 87:1166-1172, 2002
132. Nok AJ: Arsenicals (melarsoprol), pentamidine and suramin in the treatment of human African trypanosomiasis. *Parasitol Res* 90:71-79, 2003
133. Dorfinger K, Niederle B, Vierhapper H, et al: Suramin and the human adrenocortex: results of experimental and clinical studies. *Surgery* 110:1100-1105, 1991
134. Kuyu H, Lee WR, Bare R, et al: Recent advances in the treatment of prostate cancer. *Ann Oncol* 10:891-898, 1999
135. Voogd TE, Vansterkenburg EL, Wilting J, et al: Recent research on the biological activity of suramin. *Pharmacol Rev* 45:177-203, 1993
136. Raj PA, Marcus E, Rein R: Conformational requirements of suramin to target angiogenic growth factors. *Angiogenesis* 2:183-199, 1998
137. Bos OJ, Vansterkenburg EL, Boon JP, et al: Location and characterization of the suramin binding sites of human serum albumin. *Biochem Pharmacol* 40:1595-1599, 1990
138. Klijn JG, Setyono-Han B, Bakker GH, et al: Growth factor-receptor pathway interfering treatment by somatostatin analogs and suramin: preclinical and clinical studies. *J Steroid Biochem Mol Biol* 20:1089-1095, 1990
139. Hosang M: Suramin binds to platelet-derived growth factor and inhibits its biological activity. *J Cell Biochem* 29:265-273, 1985
140. Coffey RJ, Jr., Leof EB, Shipley GD, et al: Suramin inhibition of growth factor receptor binding and mitogenicity in AKR-2B cells. *J Cell Physiol* 132:143-148, 1987
141. Moscatelli D, Quarto N: Transformation of NIH 3T3 cells with basic fibroblast growth factor or the hst/K-fgf oncogene causes downregulation of the fibroblast growth factor receptor: reversal of morphological transformation and restoration of receptor number by suramin. *J Cell Biol* 109:2519-2527, 1989
142. Mills GB, Zhang N, May C, et al: Suramin prevents binding of interleukin 2 to its cell surface receptor: a possible mechanism for immunosuppression. *Cancer Res* 50:3036-3042, 1990
143. Waldhoer M, Bofill-Cardona E, Milligan G, et al: Differential uncoupling of A1 adenosine and D2 dopamine receptors by suramin and didemethylated suramin (NF037). *Mol Pharmacol* 53:808-818, 1998
144. Butler SJ, Kelly EC, McKenzie FR, et al: Differential effects of suramin on the coupling of receptors to individual species of pertussis-toxin-sensitive guanine-nucleotide-binding proteins. *Biochem J* 251:201-205, 1988
145. Huang RR, Dehaven RN, Cheung AH, et al: Identification of allosteric antagonists of receptor-guanine nucleotide-binding protein interactions. *Mol Pharmacol* 37:304-310, 1990
146. Trieb K, Dorfinger K, Neuhold N, et al: Suramin affects differentiated and undifferentiated human thyroid epithelial cells in vitro. *J Endocrinol* 134:505-511, 1992

147. Zhang YL, Keng YF, Zhao Y, et al: Suramin is an active site-directed, reversible, and tight-binding inhibitor of protein-tyrosine phosphatases. *J Biol Chem* 273:12281-12287, 1998
148. Bojanowski K, Nishio K, Fukuda M, et al: Effect of suramin on p34cdc2 kinase in vitro and in extracts from human H69 cells: evidence for a double mechanism of action. *Biochem Biophys Res Commun* 203:1574-1580, 1994
149. Gschwendt M, Kittstein W, Johannes FJ: Differential effects of suramin on protein kinase C isoenzymes. A novel tool for discriminating protein kinase C activities. *FEBS Lett* 421:165-168, 1998
150. Hensey CE, Boscoboinik D, Azzi A: Suramin, an anti-cancer drug, inhibits protein kinase C and induces differentiation in neuroblastoma cell clone NB2A. *FEBS Lett* 258:156-158, 1989
151. De Clercq E: Suramin: a potent inhibitor of the reverse transcriptase of RNA tumor viruses. *Cancer Lett* 8:9-22, 1979
152. Kim JH, Sherwood ER, Sutkowski DM, et al: Inhibition of prostatic tumor cell proliferation by suramin: alterations in TGF alpha-mediated autocrine growth regulation and cell cycle distribution. *J Urol* 146:171-176, 1991
153. Gagliardi A, Hadd H, Collins DC: Inhibition of angiogenesis by suramin. *Cancer Res* 52:5073-5075, 1992
154. Fantini J, Verrier B, Robert C, et al: Suramin-induced differentiation of the human colic adenocarcinoma cell clone HT29-D4 in serum-free medium. *Exp Cell Res* 189:109-117, 1990
155. Yamazaki H, Dilworth A, Myers CE, et al: Suramin inhibits DNA damage in human prostate cancer cells treated with topoisomerase inhibitors in vitro. *Prostate* 23:25-36, 1993
156. Mozhaev VV: Mechanism-based strategies for protein thermostabilization. *Trends Biotechnol* 11:88-95, 1993
157. Grazu V, Ovsejevi K, Cuadra K, et al: Solid-phase reducing agents as alternative for reducing disulfide bonds in proteins. *Appl Biochem Biotechnol* 110:23-32, 2003
158. Wang P, Wu P, Siegel MI, et al: IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 153:811-816, 1994
159. Javorschi S, Labrousche S, Freyburger G: Tissue factor mRNA quantitation without prior monocyte isolation. *Biotechniques* 28:1116, 1118, 1120, 1122, 2000
160. Schmittgen TD, Zakrajsek BA: Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* 46:69-81, 2000
161. Wittmann M, Kienlin P, Mommert S, et al: Suppression of IL-12 production by soluble CD40 ligand: evidence for involvement of the p44/42 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Immunol* 168:3793-3800, 2002
162. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, et al: Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 75:291-295, 1999
163. Muller WA: New mechanisms and pathways for monocyte recruitment. *J Exp Med* 194:F47-F51, 2001
164. Bain J, McLauchlan H, Elliott M, et al: The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J* 371:199-204, 2003

165. Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, et al: SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13681-13686, 2001
166. Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, et al: PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 270:27489-27494, 1995
167. Dudley DT, Pang L, Decker SJ, et al: A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7686-7689, 1995
168. Schafer PH, Gandhi AK, Loveland MA, et al: Enhancement of cytokine production and AP-1 transcriptional activity in T cells by thalidomide-related immunomodulatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 305:1222-1232, 2003
169. Hale KK, Trollinger D, Rihaneck M, et al: Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma, and delta in inflammatory cell lineages. *J Immunol* 162:4246-4252, 1999
170. Hazzalin CA, Le Panse R, Cano E, et al: Anisomycin selectively desensitizes signalling components involved in stress kinase activation and fos and jun induction. *Mol Cell Biol* 18:1844-1854, 1998
171. Bariol C, Meagher AP, Vickers CR, et al: Early studies on the safety and efficacy of thalidomide for symptomatic inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 17:135-139, 2002
172. Dawson NA, Figg WD, Cooper MR, et al: Phase II trial of suramin, leuprolide, and flutamide in previously untreated metastatic prostate cancer. *J Clin Oncol* 15:1470-1477, 1997
173. Rao KM: MAP kinase activation in macrophages. *J Leukoc Biol* 69:3-10, 2001
174. Meyer-Wentrup F, Burdach S: Efficacy of dendritic cell generation for clinical use: recovery and purity of monocytes and mature dendritic cells after immunomagnetic sorting or adherence selection of CD14+ starting populations. *J Hematother Stem Cell Res* 12:289-299, 2003
175. Ma X, Chow JM, Gri G, et al: The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J Exp Med* 183:147-157, 1996
176. Lapteva N, Ando Y, Nieda M, et al: Profiling of genes expressed in human monocytes and monocyte-derived dendritic cells using cDNA expression array. *Br J Haematol* 114:191-197, 2001
177. Dent AL, Shaffer AL, Yu X, et al: Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science* 276:589-592, 1997
178. Macdonald R, Bingham S, Bond BC, et al: Determination of changes in mRNA expression in a rat model of neuropathic pain by Taqman quantitative RT-PCR. *Brain Res Mol Brain Res* 90:48-56, 2001
179. Fadok VA, McDonald PP, Bratton DL, et al: Regulation of macrophage cytokine production by phagocytosis of apoptotic and post-apoptotic cells. *Biochem Soc Trans* 26:653-656, 1998
180. Fahy RJ, Doseff AI, Wewers MD: Spontaneous human monocyte apoptosis utilizes a caspase-3-dependent pathway that is blocked by endotoxin and is independent of caspase-1. *J Immunol* 163:1755-1762, 1999
181. Lund PK, Namork E, Brorson SH, et al: The fate of monocytes during 24 h of culture as revealed by flow cytometry and electron microscopy. *J Immunol Methods* 270:63-76, 2002
182. Goyal A, Wang Y, Graham MM, et al: Monocyte survival factors induce Akt activation and suppress caspase-3. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26:224-230, 2002

183. Rozman-Pungercar J, Kopitar-Jerala N, Bogyo M, et al: Inhibition of papain-like cysteine proteases and legumain by caspase-specific inhibitors: when reaction mechanism is more important than specificity. *Cell Death Differ* 10:881-888, 2003
184. Chakravorty D, Kato Y, Sugiyama T, et al: Inhibition of caspase 3 abrogates lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by preventing activation of NF-kappaB and c-Jun NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase in RAW 264.7 murine macrophage cells. *Infect Immun* 69:1315-1321, 2001
185. Bhatt NY, Kelley TW, Khramtsov VV, et al: Macrophage-colony-stimulating factor-induced activation of extracellular-regulated kinase involves phosphatidylinositol 3-kinase and reactive oxygen species in human monocytes. *J Immunol* 169:6427-6434, 2002
186. Shiiki K, Yoshikawa H, Kinoshita H, et al: Potential mechanisms of resistance to TRAIL/Apo2L-induced apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells during granulocytic differentiation. *Cell Death Differ* 7:939-946, 2000
187. Hunt CJ, Armitage SE, Pegg DE: Cryopreservation of umbilical cord blood: 2. Tolerance of CD34(+) cells to multimolar dimethyl sulphoxide and the effect of cooling rate on recovery after freezing and thawing. *Cryobiology* 46:76-87, 2003
188. Luger A, Schmidt M, Luger N, et al: Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway. *Gastroenterology* 121:1145-1157, 2001
189. Schmidt M, Luger N, Luger A, et al: Role of the CD95/CD95 ligand system in glucocorticoid-induced monocyte apoptosis. *J Immunol* 166:1344-1351, 2001
190. Gockel HR, Luger A, Heidemann J, et al: Thalidomide induces apoptosis in human monocytes by using a cytochrome c-dependent pathway. *J Immunol* 172:5103-5109, 2004
191. Stein CA: Suramin: a novel antineoplastic agent with multiple potential mechanisms of action. *Cancer Res* 53:2239-2248, 1993
192. Ono K, Nakane H, Fukushima M: Differential inhibition of various deoxyribonucleic and ribonucleic acid polymerases by suramin. *Eur J Biochem* 172:349-353, 1988
193. Jindal HK, Anderson CW, Davis RG, et al: Suramin affects DNA synthesis in HeLa cells by inhibition of DNA polymerases. *Cancer Res* 50:7754-7757, 1990
194. Eichhorst ST, Krueger A, Muerkoster S, et al: Suramin inhibits death receptor-induced apoptosis in vitro and fulminant apoptotic liver damage in mice. *Nat Med* 10:602-609, 2004
195. Alzani R, Cozzi E, Corti A, et al: Mechanism of suramin-induced deoligomerization of tumor necrosis factor alpha. *Biochemistry* 34:6344-6350, 1995
196. Lambrecht G, Braun K, Damer M, et al: Structure-activity relationships of suramin and pyridoxal-5'-phosphate derivatives as P2 receptor antagonists. *Curr Pharm Des* 8:2371-2399, 2002
197. Grahames CB, Michel AD, Chessell IP, et al: Pharmacological characterization of ATP- and LPS-induced IL-1beta release in human monocytes. *Br J Pharmacol* 127:1915-1921, 1999
198. Huwiler A, Rolz W, Dorsch S, et al: Extracellular ATP and UTP activate the protein kinase B/Akt cascade via the P2Y(2) purinoceptor in renal mesangial cells. *Br J Pharmacol* 136:520-529, 2002
199. Keel M, Ungethum U, Steckholzer U, et al: Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. *Blood* 90:3356-3363, 1997

200. Conti P, Kempuraj D, Kandere K, et al: IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. *Immunol Lett* 86:123-129, 2003
201. Kobayashi M, Kweon MN, Kuwata H, et al: Toll-like receptor-dependent production of IL-12p40 causes chronic enterocolitis in myeloid cell-specific Stat3-deficient mice. *J Clin Invest* 111:1297-1308, 2003
202. Bousvaros A, Mueller B: Thalidomide in gastrointestinal disorders. *Drugs* 61:777-787, 2001
203. Miyachi H, Azuma A, Hioki E, et al: Inducer-specific bidirectional regulation by thalidomide and phenylphthalimides of tumor necrosis factor-alpha production. *Biochem Biophys Res Commun* 224:426-430, 1996
204. Haslett PA, Klausner JD, Makonkawkeyoon S, et al: Thalidomide stimulates T cell responses and interleukin 12 production in HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 15:1169-1179, 1999
205. Becker C, Wirtz S, Ma X, et al: Regulation of IL-12 p40 promoter activity in primary human monocytes: roles of NF-kappaB, CCAAT/enhancer-binding protein beta, and PU.1 and identification of a novel repressor element (GA-12) that responds to IL-4 and prostaglandin E(2). *J Immunol* 167:2608-2618, 2001
206. Cao S, Liu J, Chesi M, et al: Differential regulation of IL-12 and IL-10 gene expression in macrophages by the basic leucine zipper transcription factor c-Maf fibrosarcoma. *J Immunol* 169:5715-5725, 2002
207. Platzer C, Fritsch E, Elsner T, et al: Cyclic adenosine monophosphate-responsive elements are involved in the transcriptional activation of the human IL-10 gene in monocytic cells. *Eur J Immunol* 29:3098-3104, 1999
208. Thompson-Snipes L, Dhar V, Bond MW, et al: Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *J Exp Med* 173:507-510, 1991
209. De Groote D, Marchant A, Fauchet F, et al: Characterisation of monoclonal antibodies against human interleukin-10 and their use in an ELISA for the measurement of this cytokine. *J Immunol Methods* 177:225-234, 1994
210. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, et al: IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 147:3815-3822, 1991
211. Nakajima M, DeChavigny A, Johnson CE, et al: Suramin. A potent inhibitor of melanoma heparanase and invasion. *J Biol Chem* 266:9661-9666, 1991
212. Strassmann G, Graber N, Goyert SM, et al: Inhibition of lipopolysaccharide and IL-1 but not of TNF-induced activation of human endothelial cells by suramin. *J Immunol* 153:2239-2247, 1994
213. Strassmann G, D'Alessandro F, Fong M, et al: Suramin blocks the binding of interleukin-1 to its receptor and neutralizes IL-1 biological activities. *Int J Immunopharmacol* 16:931-939, 1994
214. LaPushin R, Totpal K, Higuchi M, et al: Suramin inhibits tumor cell cytotoxicity mediated through natural killer cells, lymphokine-activated killer cells, monocytes, and tumor necrosis factor. *J Clin Immunol* 14:39-49, 1994
215. Daigle I, Ruckert B, Schnetzler G, et al: Induction of the IL-10 gene via the fas receptor in monocytes--an anti-inflammatory mechanism in the absence of apoptosis. *Eur J Immunol* 30:2991-2997, 2000
216. Han Z, Boyle DL, Chang L, et al: c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 108:73-81, 2001

217. Nishiki S, Hato F, Kamata N, et al: Selective activation of STAT3 in human monocytes stimulated by G-CSF: implication in inhibition of LPS-induced TNF-alpha production. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C1302-C1311, 2004
218. Utsugi M, Dobashi K, Ishizuka T, et al: c-Jun N-terminal kinase negatively regulates lipopolysaccharide-induced IL-12 production in human macrophages: role of mitogen-activated protein kinase in glutathione redox regulation of IL-12 production. *J Immunol* 171:628-635, 2003
219. Scherle PA, Jones EA, Favata MF, et al: Inhibition of MAP kinase kinase prevents cytokine and prostaglandin E2 production in lipopolysaccharide-stimulated monocytes. *J Immunol* 161:5681-5686, 1998
220. Xia CQ, Kao KJ: Suppression of interleukin-12 production through endogenously secreted interleukin-10 in activated dendritic cells: involvement of activation of extracellular signal-regulated protein kinase. *Scand J Immunol* 58:23-32, 2003
221. Feng GJ, Goodridge HS, Harnett MM, et al: Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: Leishmania phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. *J Immunol* 163:6403-6412, 1999
222. Johnson GL, Lapadat R: Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298:1911-1912, 2002
223. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, et al: A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372:739-746, 1994
224. Lee JC, Kumar S, Griswold DE, et al: Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy. *Immunopharmacology* 47:185-201, 2000
225. Kurzrock R, Wetzler M, Estrov Z, et al: Interleukin-1 and its inhibitors: a biologic and therapeutic model for the role of growth regulatory factors in leukemias. *Cytokines Mol Ther* 1:177-184, 1995
226. Hazzalin CA, Cano E, Cuenda A, et al: p38/RK is essential for stress-induced nuclear responses: JNK/SAPKs and c-Jun/ATF-2 phosphorylation are insufficient. *Curr Biol* 6:1028-1031, 1996
227. Hazzalin CA, Cuenda A, Cano E, et al: Effects of the inhibition of p38/RK MAP kinase on induction of five fos and jun genes by diverse stimuli. *Oncogene* 15:2321-2331, 1997
228. Utsugi M, Dobashi K, Koga Y, et al: Glutathione redox regulates lipopolysaccharide-induced IL-12 production through p38 mitogen-activated protein kinase activation in human monocytes: role of glutathione redox in IFN-gamma priming of IL-12 production. *J Leukoc Biol* 71:339-347, 2002
229. Young PR, McLaughlin MM, Kumar S, et al: Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. *J Biol Chem* 272:12116-12121, 1997
230. Kumar S, McDonnell PC, Gum RJ, et al: Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem Biophys Res Commun* 235:533-538, 1997
231. Marriott JB, Clarke IA, Dalgleish AG: Inhibition of p38 MAP kinase during cellular activation results in IFN-gamma-dependent augmentation of IL-12 production by human monocytes/macrophages. *Clin Exp Immunol* 125:64-70, 2001
232. Lu HT, Yang DD, Wisk M, et al: Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. *EMBO J* 18:1845-1857, 1999
233. Avramovich Y, Amit T, Youdim MB: Non-steroidal anti-inflammatory drugs stimulate secretion of non-amyloidogenic precursor protein. *J Biol Chem* 277:31466-31473, 2002

-
234. Mahoney CW, Azzi A, Huang KP: Effects of suramin, an anti-human immunodeficiency virus reverse transcriptase agent, on protein kinase C. Differential activation and inhibition of protein kinase C isozymes. *J Biol Chem* 265:5424-5428, 1990
 235. Strassmann G, Kambayashi T: Inhibition of experimental cancer cachexia by anti-cytokine and anti-cytokine-receptor therapy. *Cytokines Mol Ther* 1:107-113, 1995
 236. Lindl TBJ. *Zell- und Gewebekultur*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 1987.
 237. De AK, Kodys KM, Yeh BS, et al: Exaggerated human monocyte IL-10 concomitant to minimal TNF-alpha induction by heat-shock protein 27 (Hsp27) suggests Hsp27 is primarily an antiinflammatory stimulus. *J Immunol* 165:3951-3958, 2000
 238. G.Schrimpf. *Gentechnische Methoden*. 1-4-2002. Spektrum Akademischer Verlag.
 239. Lambalez B, Rossier J: Quantitative RT-PCR. *Nat Biotechnol* 18:5, 2000
 240. Daftarian PM, Kumar A, Kryworuchko M, et al: IL-10 production is enhanced in human T cells by IL-12 and IL-6 and in monocytes by tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 157:12-20, 1996

7 ANHANG

Wertetabellen zu den Abbildungen

Wertetabelle zu Abb. 9:

mRNA- und Proteinbildung von IL-12p40 und IL-10 nach LPS-Stimulation in humanen Monozyten (CD-14+-Monozyten) und THP-1-Zellen

h [Zeit]	[pg/ml]	[pg/ml]	[counts/mm ²]	[counts/mm ²]
IL-12p40	hMonozyten Protein	THP-1 Protein	hMonozyten mRNA	THP-1 mRNA
0	3	29	19	46
5	57	100	511	770
18	981	686	101	298
IL-10	hMonozyten Protein	THP-1 Protein	hMonozyten mRNA	THP-1 mRNA
0	8	36	26	25
5	62	51	875	186
18	3716	51	1820	71

Wertetabelle zu Abb. 10, Abb. 25 und Abb. 39: Membranen des Proteinarrays

Angaben in Volume Count / mm² von 2 Membranen (Nr. 1 und Nr. 2 von zwei verschiedenen Spendern)

	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 1	Nr. 2
	LPS	LPS	LPS + Aminothalidomid [4µM]	LPS + Aminothalidomid [4µM]	LPS + Suramin [200 µM]	LPS + Suramin [200 µM]	unstimuliert	unstimuliert
MCP-1	68	82	9,97	12,05	87,83	64,68	2,65	2,88
TNFα	33	39	2,16	2,95	38,26	27,72	1,23	0,39
IL-6	241	222	119,04	113,27	181,17	162,19	0,36	0,99
IL-1b	44	42	6,99	7,76	88,08	53,38	-0,06	0,37
IL-8	138	132	103,58	67,95	94,68	76,07	36,05	33,26
IL-10	53	65	44,46	44,3	7,28	8,33	5,8	4,96

Wertetabelle zu Abb. 11: Einfluss von Aminothalidomid und Suramin auf die Erkennung von TNFα- (A) und IL-12p40-Protein (B)

A	Standard TNFα-Protein [pg/ml]	Suramin [200 µM] TNFα-Protein [pg/ml]	Aminothalidomid [4 µM] TNFα-Protein [pg/ml]
Standard			
0	0±0	27±9	38±11
7,8	8±0	10±9	25±10
15,6	16±0	9±9	27±9
31,3	31±0	46±34	63±6
62,5	63±0	62±8	82±4
125,0	125±0	103±10	153±24
250,0	250±0	288±24	351±40
500,0	500±0	426±54	543±29

Wertetabelle zu Abb. 11: Einfluss von Aminothalidomid und Suramin auf die Erkennung von TNF α -Protein (A) und IL-12p40-Protein (B)

B Standard	Standard IL-12p40-Protein [pg/ml]	Suramin [200 μ M] IL-12p40-Protein [pg/ml]	Aminothalidomid[4 μ M] IL-12p40-Protein [pg/ml]
0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
8	8 \pm 0	0 \pm 0	2 \pm 2
16	16 \pm 0	6 \pm 1	6 \pm 3
32	31 \pm 0	17 \pm 4	23 \pm 6
63	63 \pm 0	54 \pm 1	55 \pm 4
125	125 \pm 0	102 \pm 5	125 \pm 4
250	250 \pm 0	212 \pm 12	246 \pm 7
500	500 \pm 0	461 \pm 26	495 \pm 7

Wertetabelle zu Abb. 12: Einfluss von Aminothalidomid und Suramin auf die Erkennung von IL-10-Protein im Biosource-ELISA (A) und R&D-ELISA (B)

A Standard	Standard IL-10-Protein [pg/ml]	Suramin [200 μ M] IL-10-Protein [pg/ml]	Aminothalidomid [4 μ M] IL-10-Protein [pg/ml]
0	3 \pm 1	7 \pm 2	2 \pm 1
8	9 \pm 5	7 \pm 3	5 \pm 2
16	14 \pm 0	5 \pm 2	14 \pm 2
32	30 \pm 2	10 \pm 4	25 \pm 5
63	68 \pm 4	11 \pm 2	57 \pm 3
125	135 \pm 4	7 \pm 1	124 \pm 4
250	268 \pm 6	13 \pm 1	245 \pm 2
500	503 \pm 8	35 \pm 2	461 \pm 9
1000	945 \pm 36	60 \pm 3	871 \pm 7
B Standard	Standard IL-10-Protein [pg/ml]	Suramin [200 μ M] IL-10-Protein [pg/ml]	Aminothalidomid [4 μ M] IL-10-Protein [pg/ml]
0	0 \pm 0	32 \pm 8	1 \pm 1
31	9 \pm 5	34 \pm 17	25 \pm 5
63	7 \pm 4	71 \pm 15	57 \pm 3
125	59 \pm 6	66 \pm 9	124 \pm 4
250	185 \pm 14	186 \pm 38	245 \pm 2
500	373 \pm 14	431 \pm 55	461 \pm 9
1000	909 \pm 41	1077 \pm 51	904 \pm 26

Wertetabelle zu Abb. 13: Messung von rhIL-10-Protein nach chemischer (A und B) oder thermischer Denaturierung (C und D), Angaben \pm SEM

A, C = Biosource-ELISA

B, D = R&D-ELISA

Standard IL-10 [pg/ml]	A IL-10-Protein [pg/ml]	A 100 mM DTT + IL-10-Protein [pg/ml]	B IL-10-Protein [pg/ml]	B + 100 mM DTT IL-10-Protein [pg/ml]
0	5 \pm 1	41 \pm 3	5 \pm 5	120 \pm 23
16	16 \pm 2	29 \pm 4		
31	29 \pm 0	26 \pm 5	25 \pm 14	199 \pm 6
63	63 \pm 3	28 \pm 3	60 \pm 6	203 \pm 37
125	122 \pm 6	21 \pm 3	64 \pm 8	329 \pm 50
250	246 \pm 26	26 \pm 5	198 \pm 16	475 \pm 64
500	472 \pm 40	17 \pm 4	408 \pm 27	894 \pm 61
1000	984 \pm 80	13 \pm 5	918 \pm 83	1396 \pm 165
Standard IL-10 [pg/ml]	C IL-10-Protein [pg/ml]	C + 10 min 65°C IL-10-Protein [pg/ml]	D IL-10-Protein [pg/ml]	D + 10 min 65°C IL-10-Protein [pg/ml]
0	3 \pm 3	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
16	16 \pm 2	0 \pm 0		
31	26 \pm 1	3 \pm 3	7 \pm 6	3 \pm 3
63	59 \pm 2	4 \pm 4	37 \pm 10	0 \pm 05
125	108 \pm 3	0 \pm 0	89 \pm 18	129 \pm 19
250	198 \pm 7	0 \pm 0	252 \pm 10	244 \pm 122
500	378 \pm 3	0 \pm 0	491 \pm 42	820 \pm 53
1000	726 \pm 16	1 \pm 1	965 \pm 54	1558 \pm 65

Wertetabelle zu Abb. 14: Wirkung von Suramin [20 μ M und 200 μ M] auf rhIL-10 [40 pg/ml-1,25 pg/ml]

Angaben \pm SEM

rhIL-10 [pg/ml]	Medium	Suramin [200 μ M]	Suramin [20 μ M]
80	6314 \pm 187	1843 \pm 146	5921 \pm 265
40	5461 \pm 423	927 \pm 89	4462 \pm 122
20	3918 \pm 51 \pm	442 \pm 16	2669 \pm 131
10	1839 \pm 124	245 \pm 42	1462 \pm 19
5	925 \pm 40	116 \pm 14	646 \pm 32
3	534 \pm 30	56 \pm 4	363 \pm 5
1	331 \pm 22	31 \pm 10	266 \pm 13
0	0 \pm 0	2 \pm 2	3 \pm 3
rhIL-10 [pg/ml]	Medium + 100 mM DTT	Suramin [200 μ M] + 100 mM DTT	Suramin [20 μ M] + 100 mM DTT
80	1101 \pm 66	49 \pm 7	659 \pm 294
40	519 \pm 44	38 \pm 6	179 \pm 18
20	197 \pm 20	31 \pm 2	87 \pm 1
10	60 \pm 16	29 \pm 10	39 \pm 1
5	36 \pm 14	16 \pm 2	30 \pm 2
3	30 \pm 3	17 \pm 10	28 \pm 2
1	36 \pm 5	18 \pm 1	28 \pm 2
0	26 \pm 4	23 \pm 0	26 \pm 2

Wertetabelle zu Abb. 15: Kinetik der LPS-induzierten Sekretion von TNF α , IL-12p40 und IL-10

h [Zeit]	IL-10-Protein [%]	IL-12p40-Protein [%]	TNF α -Protein [%]
0	0	0	2
1			12
3			42
6	5	27	73
9			100
16	79	90	82
24	100	100	87
30	24	74	20
49	25	0	0

Wertetabelle zu Abb. 18: mRNA-Menge verschiedener Haushaltsgene in CD14⁺-Monozyten in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer

h [Zeit]	unstimuliert [pg gen. DNA per reaction]	LPS [pg gen. DNA per reaction]	LPS + Thalidomid [pg gen. DNA per reaction]	LPS + Aminothalidomid [pg gen. DNA per reaction]
GAPDH				
1	5,29	5,49	5,24	5,32
2	5,14	5,13	5,18	5,16
5	4,47	4,72	4,56	4,28
18	4,07	4,03	3,90	3,99
β -Aktin				
1	5,55	5,75	5,55	5,68
2	5,28	5,26	5,32	5,34
5	4,81	4,86	4,81	4,59
18	4,67	5,00	4,63	4,70
β 2-Mikroglob.				
1	5,89	6,15	5,97	6,01
2	5,75	5,73	5,82	5,84
5	5,42	5,58	5,43	5,19
18	5,39	5,55	4,95	5,28
HPRT				
1	1,33	1,75	1,61	1,46
2	1,21	1,01	1,21	1,25
5	0,54	0,93	0,76	0,39
18	0,13	0,40	-0,01	0,32

Wertetabelle zu Abb. 19: mRNA-Mengen an GAPDH und 18S rRNA in CD14⁺-Monozyten in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer

Angaben für GAPDH bzw. 18S rRNA [pool Mono's]

Suramin [200 μ M] und Aminothalidomid [4 μ M]

h [Zeit]	unstimuliert	LPS	LPS + Suramin	LPS + Aminothalidomid
GAPDH				
1,0	268,30	275,50	261,00	268,30
3,0	21,60	19,10	20,70	24,00
6,5	14,70	9,47	8,53	9,77
12,5	14,80	10,10	8,70	8,30
18,0	24,50	18,20	23,80	22,00
25,0	20,40	27,50	29,50	29,70

Wertetabelle zu Abb. 19: mRNA-Mengen an GAPDH und 18S rRNA in CD14+-Monozyten in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer

Angaben für GAPDH bzw. 18S rRNA [pool Mono's]
Suramin [200 µM] und Aminothalidomid [4 µM]

18S rRNA				
1,0	24,80	17,60	13,70	15,90
3,0	20,83	18,20	14,50	15,30
6,5	20,60	17,50	18,48	21,00
12,5	16,40	15,70	12,50	15,00
18,0	20,10	20,20	21,70	25,60
25,0	16,60	21,90	22,60	17,90

Wertetabelle zu Abb. 20: Mono- und oligonukleosome DNA-Fragmente im Zytoplasma von LPS-stimulierten CD-14+-Monozyten, Angaben ± SEM

A = unstimuliert

B = LPS

C = LPS + Z-VAD FMK [20 µM]

D = LPS+ Z-DEVD FMK [1 µM] E = LPS + inaktiver Caspase-Inhibitor [1 µM]

F = LPS + Aminothalidomid [4 µM]

G = LPS + Suramin [200 µM]

h [Zeit]	A [% der PK]	B [% der PK]	C [% der PK]	D [% der PK]	E [% der PK]
1	3± 1	11± 1	8± 1	8± 1	11± 2
3	8± 1	19± 1	11± 2	12± 1	19± 0
4	33± 2	33± 4	18± 1	15± 1	46± 9
5	70± 4	48± 3	18± 2	18± 1	46± 7
8	57± 9	62± 3	58± 6	60± 1	65± 4
18	45± 2	38± 4	131± 3	80± 7	64± 4
22	27± 4	32± 4	219± 10	156± 10	114± 3
h [Zeit]	F [% der PK]	G [% der PK]			
1	9± 1	6± 3			
3	18± 2	9± 3			
4	33± 3	16± 1			
5	46± 4	21± 4			
8	66± 8	38± 5			
18	35± 6	19± 1			
22	23± 6	14± 1			

Wertetabelle zu Abb. 21: Aktivität des Caspase-3/7 Enzyms in CD-14+-Monozyten, Angaben ± SEM

A = unstimuliert

B = LPS

C = LPS + Z-VAD FMK [20 µM]

D = LPS+ Z-DEVD FMK [1 µM] E = LPS + inaktiver Caspase-Inhibitor [1 µM]

h [Zeit]	A [rel. Flour.]	B [rel. Flour.]	C [rel. Flour.]	D [rel. Flour.]	E [rel. Flour.]
0	12789± 844	13359± 698	2565± 99	2796± 64	9639± 566
1,0	26539± 1890	26971± 3960	6384± 490	3319± 317	14798± 1184
2,5	28174± 1998	42444± 3433	24580± 1998	4396± 600	30281± 3757
4,0		127770± 10987	12310± 1096	5679± 502	91240± 9386
6,0	246489± 52366	315069± 47390	3837± 75	7882± 816	100437± 101109
8,0	284834± 21179	300236± 8973	2780± 61	9015± 381	52388± 5441
22,0	255254± 8358	301690± 2647	3185± 56	9055± 472	34658± 1407

Wertetabelle zu Abb. 22: Wirkung von Substanzen auf den Substratumsatz der Caspase-3/7 in LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten nach 4 h, Angaben \pm SEM

	Caspase-3/7 [rel. Flour.]
LPS-stimulierte Kontrolle	813405 \pm 103826
Z-DEVD-FMK [1 μ M]	5845 \pm 292
inakt. Caspase-Inhibitor [1 μ M]	794918 \pm 22932
Aminoth. [4 μ M]	715859 \pm 116472
Suramin [50 μ M]	463873 \pm 82184
Suramin [200 μ M]	279291 \pm 31693

Wertetabelle zu Abb. 23: Mono- und oligonukleosome DNA-Fragmente im Kulturüberstand von LPS-stimulierten CD-14⁺-Monozyten, Angaben \pm SEM

A = unstimuliert

B = LPS

C = LPS + Z-VAD FMK [20 μ M]D = LPS+ Z-DEVD FMK [1 μ M] E = LPS + inaktiver Caspase-Inhibitor [1 μ M]F = LPS + Aminothalidomid [4 μ M]G = LPS + Suramin [200 μ M]

h [Zeit]	A [% der PK]	B [% der PK]	C [% der PK]	D [% der PK]	E [% der PK]
1	0,44 \pm 0,01	0,87 \pm 0,06	1,16 \pm 0,52	0,89 \pm 0,25	1,40 \pm 0,28
3	1,19 \pm 0,04	1,29 \pm 0,01	3,03 \pm 0,18	3,78 \pm 0,10	2,44 \pm 0,12
4	1,36 \pm 0,10	1,69 \pm 0,53	3,90 \pm 1,17	4,18 \pm 1,14	2,76 \pm 0,80
5	1,95 \pm 0,16	1,89 \pm 0,56	3,43 \pm 0,27	2,77 \pm 0,10	1,63 \pm 0,10
8	4,45 \pm 0,85	1,69 \pm 0,53	3,90 \pm 1,17	4,18 \pm 1,14	2,76 \pm 0,81
18	7,15 \pm 1,13	1,89 \pm 0,56	3,43 \pm 0,27	2,77 \pm 0,10	1,63 \pm 0,10
22	5,75 \pm 0,18	2,64 \pm 0,01	2,72 \pm 0,08	3,47 \pm 0,20	2,94 \pm 0,10
h [Zeit]	F [% der PK]	G [% der PK]			
1	0,86 \pm 0,04	0,36 \pm 0,01			
3	1,27 \pm 0,03	0,48 \pm 0,01			
4	1,69 \pm 0,04	0,61 \pm 0,45			
5	2,00 \pm 0,21	0,88 \pm 0,33			
8	1,69 \pm 0,04	0,61 \pm 0,45			
18	2,00 \pm 0,21	0,88 \pm 0,33			
22	2,66 \pm 0,01	1,89 \pm 0,00			

Wertetabelle zu Abb. 24: Wirkung von Aminothalidomid und Suramin auf die Relative Fluoreszenz (Rel. Flour.), Angaben \pm SEM

	LPS [Rel. Flour.]	LPS + Aminoth. [4 μ M] [Rel. Flour.]	LPS + Suramin [200 μ M] [Rel. Flour.]
4	136184 \pm 3445	121805 \pm 5020	179684 \pm 3922
8	133416 \pm 4783	135539 \pm 2671	212944 \pm 2169
22	141479 \pm 1568	137835 \pm 2659	283855 \pm 4256

Wertetabelle zu Abb. 25: siehe Wertetabelle zu Abb. 9

Wertetabelle zu Abb. 26: TNF α -Konzentrations-Wirkungskurve für Thalidomid und Aminothalidomid (Angaben \pm SEM)

Dosierung [μ g/ml]	LPS + Thalidomid TNF α -Protein [%]	LPS + Aminothalidomid TNF α -Protein [%]
5,60000	57 \pm 4	14 \pm 2
1,90000	60 \pm 4	15 \pm 2
0,62000	64 \pm 4	16 \pm 2
0,21000	77 \pm 4	17 \pm 3
0,07000	87 \pm 6	23 \pm 3
0,02000	89 \pm 4	23 \pm 3
0,00800	88 \pm 3	25 \pm 3
0,00300	92 \pm 7	37 \pm 5
0,00090	89 \pm 5	50 \pm 5
0,00030	96 \pm 7	66 \pm 7
0,00010	90 \pm 4	85 \pm 9
0,00003	96 \pm 5	93 \pm 8

Wertetabelle zu Abb. 27: IL-12p40-Konzentrations-Wirkungskurve für Thalidomid und Aminothalidomid (Angaben \pm SEM)

Dosierung [μ g/ml]	LPS + Thalidomid IL-12p40-Protein [%]	LPS + Aminothalidomid IL-12p40-Protein [%]
5,60000	24 \pm 3	1 \pm 0
1,90000	27 \pm 3	1 \pm 0
0,62000	31 \pm 3	1 \pm 0
0,21000	42 \pm 3	2 \pm 1
0,07000	51 \pm 6	2 \pm 1
0,02000	65 \pm 5	3 \pm 1
0,00800	73 \pm 5	3 \pm 1
0,00300	75 \pm 5	8 \pm 2
0,00090	84 \pm 6	18 \pm 3
0,00030	85 \pm 5	53 \pm 5
0,00010	88 \pm 6	79 \pm 4
0,00003	98 \pm 6	98 \pm 5

Wertetabelle zu Abb. 28: IL-10-Konzentrations-Wirkungskurve für Thalidomid und Aminothalidomid (Angaben \pm SEM)

Dosierung [μ g/ml]	LPS + Thalidomid IL-10-Protein [%]	LPS + Aminothalidomid IL-10-Protein [%]
5,60000	194 \pm 18	331 \pm 44
1,90000	185 \pm 20	329 \pm 46
0,62000	179 \pm 20	341 \pm 55
0,21000	174 \pm 15	357 \pm 59
0,07000	128 \pm 14	396 \pm 65
0,02000	168 \pm 18	319 \pm 53
0,00800	101 \pm 4	302 \pm 41
0,00300	110 \pm 11	243 \pm 31
0,00090	102 \pm 11	186 \pm 17
0,00030	97 \pm 11	126 \pm 12
0,00010	99 \pm 12	99 \pm 7
0,00003	108 \pm 17	89 \pm 7

Wertetabelle zu Abb. 29: Kinetik der Sekretion von TNF α unter dem Einfluss von Aminothalidomid
Angaben \pm SEM

A = unstimuliert

B = LPS C = LPS + Aminothalidomid [4 μ M]

h [Zeit]	A TNF α -Protein [pg/ml]	B TNF α -Protein [pg/ml]	C TNF α -Protein [pg/ml]
0,0	254 \pm 3		
1,5	373 \pm 17	545 \pm 34	395 \pm 23
3,0	706 \pm 61	1517 \pm 73	779 \pm 42
5,0	1997 \pm 49	5254 \pm 241	2873 \pm 121
7,0	2601 \pm 204	10523 \pm 524	3334 \pm 207
18,0	1754 \pm 118	9536 \pm 308	1878 \pm 186

Wertetabelle zu Abb. 30 + Abb. 32 + Abb. 34: GAPDH-mRNA-Menge unter Einwirkung von Aminothalidomid [4 μ M] in LPS-stimulierten CD14+-Monozyten, Angaben \pm SEM

A = unstimuliert

B = LPS

C = LPS + Aminothalidomid [4 μ M]

h [Zeit]	A GAPDH mRNA log 10 [pool Mono's]	B GAPDH mRNA log 10 [pool Mono's]	C GAPDH mRNA log 10 [pool Mono's]
1,5	2,220	2,265	2,228
3,0	1,912	1,856	1,872
5,0	1,618	1,380	1,461
7,0	1,328	1,344	1,417
18,0	1,854	1,170	1,398

Wertetabelle zu Abb. 30: TNF α -mRNA-Menge unter Einwirkung von Aminothalidomid [4 μ M] in LPS-stimulierten CD14+-Monozyten, Angaben \pm SEM

A = unstimuliert

B = LPS

C = LPS + Aminothalidomid [4 μ M]

h [Zeit]	A TNF α mRNA log 10 [pool Mono's]	B TNF α mRNA log 10 [pool Mono's]	C TNF α mRNA log 10 [pool Mono's]
1,5	1,517	1,518	1,247
3,0	1,347	1,926	1,573
5,0	1,116	1,791	1,039
7,0	0,317	1,576	-0,025
18,0	0,402	0,777	0,273

Wertetabelle zu Abb. 31: Kinetik der Sekretion von IL-12p40 unter dem Einfluss von Aminothalidomid, Angaben \pm SEM

A = unstimuliert

B = LPS

C = LPS + Aminothalidomid [4 μ M]

h [Zeit]	A IL-12p40-Protein [pg/ml]	B IL-12p40-Protein [pg/ml]	C IL-12p40-Protein [pg/ml]
0,0	0 \pm 0		
1,5	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
3,0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
5,0	14 \pm 1	0 \pm 2	0 \pm 2
7,0	20 \pm 1	22 \pm 15	13 \pm 4
18,0	56 \pm 11	122 \pm 25	15 \pm 2

Wertetabelle zu Abb. 32: IL-12p40-mRNA-Menge unter Einwirkung von Aminothalidomid [4 µM] in LPS-stimulierten CD14+-Monozyten, Angaben ± SEM

A = unstimuliert

B = LPS

C = LPS + Aminothalidomid [4 µM]

h [Zeit]	A IL-12p40 mRNA log 10 [pool Mono's]	B IL-12p40 mRNA log 10 [pool Mono's]	C IL-12p40 mRNA log 10 [pool Mono's]
1,5	0,262	0,332	0,225
3,0	0,484	0,664	1,106
5,0	1,232	1,462	3,034
7,0	1,295	1,359	2,932
18,0	0,892	0,744	2,274

Wertetabelle zu Abb. 33: Vergleichende Kinetik der Sekretion von IL-10 unter dem Einfluss von Thalidomid und Aminothalidomid, Angaben ± SEM

A = unstimuliert

B = LPS C = LPS + Aminothalidomid [4 µM]

D = LPS + Thalidomid [4 µM]

h [Zeit]	A IL-10-Protein [pg/ml]	B IL-10-Protein [pg/ml]	C IL-10-Protein [pg/ml]	D IL-10-Protein [pg/ml]
0,0	0 ± 0			
1,5	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
3,0	0 ± 0	0 ± 0	514 ± 12	14 ± 7
5,0	121 ± 2	88 ± 24	2546 ± 278	850 ± 14
7,0	194 ± 3	619 ± 64	4201 ± 376	3132 ± 184
18,0	299 ± 10	2426 ± 161	6111 ± 256	4309 ± 209

Wertetabelle zu Abb. 34: IL-10-mRNA-Menge unter Einwirkung von Aminothalidomid [4 µM] in LPS-stimulierten CD14+-Monozyten, Angaben ± SEM

A = unstimuliert

B = LPS

C = LPS + Aminothalidomid [4 µM]

h [Zeit]	A IL-10 mRNA log 10 [pool Mono's]	B IL-10 mRNA log 10 [pool Mono's]	C IL-10 mRNA log 10 [pool Mono's]
1,5	0,477	0,477	0,602
3,0	1,079	1,380	2,373
5,0	1,996	3,037	3,528
7,0	2,185	3,428	3,653
18,0	2,021	2,907	3,148

Wertetabelle zu Abb. 36: Wirkung von neutralisierenden IL-10-Antikörper auf die Sekretion von LPS-induziertem IL-12p40-Protein in Gegenwart von Aminothalidomid [4 µM], Angaben ± SEM

A = Kontrolle

B = 15 µg anti- hIL-10

C = 15 µg Kontroll-Antikörper

	A IL-12p40-Protein [pg/ml]	B IL-12p40-Protein [pg/ml]	C IL-12p40-Protein [pg/ml]
LPS	598 ± 30	785 ± 74	551 ± 26
LPS + Aminot. [4 µM]	37 ± 4	73 ± 10	34 ± 1

Wertetabelle zu Abb. 37: Wirkung von Suramin auf die Sekretion von LPS-induziertem IL-12p40Angaben \pm SEM

A = LPS

B = LPS + Suramin [200 μ M]C = LPS + Suramin [100 μ M]D = LPS + Suramin [50 μ M]F = LPS + Suramin [25 μ M]

I = Kontrolle

II = Aminoth. [0,0004 μ M]III = Aminoth. [0,004 μ M]IV = Aminoth. [4 μ M]

	A IL-12p40-Protein [pg/ml]	B IL-12p40-Protein [pg/ml]	C IL-12p40- Protein [pg/ml]	D IL-12p40- Protein [pg/ml]	F IL-12p40-Protein [pg/ml]
I	1676 \pm 301	81941 \pm 9525	22416 \pm 2975	4088 \pm 167	1426 \pm 258
II	575 \pm 41	23926 \pm 2284	7351 \pm 1304	1227 \pm 55	625 \pm 57
III	82 \pm 50	4516 \pm 114	765 \pm 132	177 \pm 3	122 \pm 5
IV	21 \pm 6	2886 \pm 388	342 \pm 38	102 \pm 12	59 \pm 6

Wertetabelle zu Abb. 38: Einfluss von Aminothalidomid auf die LPS-stimulierte Sekretion von TNF α , IL-12p40 und IL-10 in den Kulturüberstand verschiedener Zellpopulationen (nach 18 h)

A = PBMCs

B = PBMCs + Aminothalidomid [4 μ M]C = CD-14⁺-Monozyten]D = CD-14⁺-Monozyten + Aminothalidomid [4 μ M]E = Gesamtblut + Aminothalidomid [4 μ M]F = Gesamtblut + Aminothalidomid [4 μ M]

TNF α -Protein [pg/ml]	A 8195 \pm 450	B 3888 \pm 54	C 26611 \pm 624
TNF α -Protein [pg/ml]	E 6617 \pm 512	F 9532 \pm 455	G 3090 \pm 119
IL-12p40-Protein [pg/ml]	A 700 \pm 39	B 216 \pm 19	C 8421 \pm 127
IL-12p40-Protein [pg/ml]	E 100 \pm 11	F 818 \pm 30	G 94 \pm 4
IL-10-Protein [pg/ml]	A 1830 \pm 80	B 1638 \pm 104	C 3393 \pm 165
IL-10-Protein [pg/ml]	E 6110 \pm 245	F 412 \pm 7	G 1271 \pm 79

Wertetabelle zu Abb. 39: siehe Wertetabelle zu Abb. 9**Wertetabelle zu Abb. 40:** Wirkung von Suramin auf die TNF α -Proteinmenge vor (A) und 24 h nach LPS-Stimulation (B) und die IL-12p40-Proteinmenge vor (C) und 24 h nach LPS-Stimulation (D)Angaben \pm SEM

Suramin [μ M]	A TNF α -Protein [pg/ml]	B TNF α -Protein [pg/ml]	C IL-12p40-Protein [pg/ml]	D IL-12p40-Protein [pg/ml]
200	63940 \pm 5224	32485 \pm 3164	37096 \pm 2880	8820 \pm 293
100	52782 \pm 9046	30769 \pm 3072	26928 \pm 4422	9000 \pm 966
50	20233 \pm 719	36922 \pm 2359	7981 \pm 170	7513 \pm 243
25	13676 \pm 1475	31103 \pm 3127	2450 \pm 305	6997 \pm 141
12,5	13903 \pm 515	30584 \pm 2276	1258 \pm 40	7847 \pm 433
6,25	13440 \pm 828	32870 \pm 6533	910 \pm 42	7193 \pm 364
3,125	13873 \pm 483	38524 \pm 8951	890 \pm 10	7943 \pm 96

Wertetabelle zu Abb. 41: Kinetik der Sezernierung von TNF α -Protein unter dem Einfluss von 200 μ M Suramin, Angaben \pm SEM

A = unstimuliert

B = LPS C = LPS + Suramin [200 μ M]

h [Zeit]	A TNF α -Protein [pg/ml]	B TNF α -Protein [pg/ml]	C TNF α -Protein [pg/ml]
0	184 \pm 22		
1,25	245 \pm 17	703 \pm 59	342 \pm 47
4,50	464 \pm 44	7479 \pm 1493	6277 \pm 231
7,50	617 \pm 62	12177 \pm 499	12750 \pm 1024
14,75	469 \pm 20	16470 \pm 3116	29456 \pm 4068
24,00	433 \pm 35	14069 \pm 1408	23303 \pm 2450

Wertetabelle zu Abb. 42 + Abb. 44 + Abb. 46: GAPDH-mRNA-Menge unter dem Einfluss von 200 μ M Suramin, Angaben \pm SEM

A = unstimuliert

B = LPS C = LPS + Suramin [200 μ M]

h [Zeit]	A GAPDH mRNA log 10 [pool Mono's]	B GAPDH mRNA log 10 [pool Mono's]	C GAPDH mRNA log 10 [pool Mono's]
1,25	2,436	2,346	2,305
4,50	2,041	1,990	2,130
7,50	1,783	1,405	1,700
14,75	1,639	1,777	1,848
24,0	1,684	2,090	2,033

Wertetabelle zu Abb. 42: TNF α -mRNA-Menge unter dem Einfluss von 200 μ M Suramin

Angaben \pm SEM

A = unstimuliert

B = LPS C = LPS + Suramin [200 μ M]

h [Zeit]	A TNF α mRNA log 10 [pool Mono's]	B TNF α mRNA log 10 [pool Mono's]	C TNF α mRNA log 10 [pool Mono's]
1,25	5,406	7,021	6,960
4,50	3,859	7,414	7,079
7,50	3,330	6,626	6,767
14,75	2,359	2,156	4,505
24,0	1,619	1,297	2,488

Wertetabelle zu Abb. 43: Kinetik der Sezernierung von IL-12p40-Protein unter dem Einfluss von Suramin, Angaben \pm SEM

A = unstimuliert

B = LPS

C = LPS + Suramin [200 μ M]

h [Zeit]	A IL-12p40-Protein [pg/ml]	B IL-12p40-Protein [pg/ml]	C IL-12p40-Protein [pg/ml]
0	12 \pm 3		
1,25	23 \pm 2	29 \pm 2	46 \pm 8
4,50	22 \pm 3	29 \pm 2	46 \pm 8
7,50	13 \pm 9	222 \pm 14	289 \pm 19
14,75	18 \pm 0	950 \pm 47	7346 \pm 411
24,00	9 \pm 4	1017 \pm 38	13095 \pm 1220

Wertetabelle zu Abb. 44: Kinetik der IL-12p40-mRNA-Bildung unter dem Einfluss von 200 μ M Suramin

Angaben \pm SEM

A = unstimuliert

B = LPS C = LPS + Suramin [200 μ M]

h [Zeit]	A IL-12p40 mRNA log 10 [pool Mono's]	B IL-12p40 mRNA log 10 [pool Mono's]	C IL-12p40 mRNA log 10 [pool Mono's]
1,25	0,083	0,408	0,253
4,50	0,512	2,027	2,000
7,50	0,553	2,799	2,972
14,75	0,373	1,882	3,400
24,0	0,167	0,627	2,184

Wertetabelle zu Abb. 45: Kinetik der Sezernierung von IL-10-Protein in den Kulturüberstand unter dem Einfluss von Suramin, Angaben \pm SEM

A = unstimuliert

B = LPS

C = LPS + Suramin [200 μ M]

h [Zeit]	A IL-10-Protein [pg/ml]	B IL-10-Protein [pg/ml]	C IL-10-Protein [pg/ml]
0	0 \pm 0		
1,25	15 \pm 1	19 \pm 1	14 \pm 2
4,50	16 \pm 0	21 \pm 2	26 \pm 1
7,50	28 \pm 3	162 \pm 6	20 \pm 7
14,75	50 \pm 5	2071 \pm 143	19 \pm 4
24,00	48 \pm 3	4147 \pm 303	20 \pm 3

Wertetabelle zu Abb. 46: Kinetik der Bildung der IL-10-mRNA unter dem Einfluss von Suramin

A = unstimuliert

B = LPS

C = LPS + Suramin [200 μ M]

h [Zeit]	A IL-10 mRNA log 10 [pool Mono's]	B IL-10 mRNA log 10 [pool Mono's]	C IL-10 mRNA log 10 [pool Mono's]
1,25	0,593	0,281	0,677
4,50	1,344	2,039	2,153
7,50	1,897	3,275	3,133
14,75	2,144	3,264	3,245
24,0	2,026	3,177	2,875

Wertetabelle zu Abb. 47: Der Nachweis von LPS-induziertem IL-10-Protein in Gegenwart von Suramin

Angaben \pm SEM

A = Biosource-ELISA: LPS + Suramin [200 μ M] – Zugabe vor LPS-Stimulation

B = Biosource-ELISA: LPS + Suramin [200 μ M] – Zugabe bei Zellernte

C = R&D-ELISA: LPS + Suramin [200 μ M] – Zugabe vor LPS-Stimulation

D = R&D-ELISA: LPS + Suramin [200 μ M] – Zugabe bei Zellernte

Suramin [μ M]	A IL-10-Protein [pg/ml]	B IL-10-Protein [pg/ml]	C IL-10-Protein [pg/ml]	D IL-10-Protein [pg/ml]
200	28 \pm 10	2996 \pm 409	7433 \pm 557	5212 \pm 341
100	69 \pm 12	4383 \pm 66	7682 \pm 60	5442 \pm 207
50	159 \pm 19	5174 \pm 152	7336 \pm 316	5697 \pm 248
25	344 \pm 15	5937 \pm 315	6978 \pm 160	6454 \pm 106
12,5	2347 \pm 253	6417 \pm 250	7756 \pm 263	6105 \pm 70
6,25	6206 \pm 92	6729 \pm 248	6331 \pm 215	5896 \pm 254
3,125	6748 \pm 229	7387 \pm 223	6655 \pm 422	6234 \pm 226

Wertetabelle zu Abb. 48: Nachweis von TNF α - (A) und IL-12p40-Protein (B) im Kulturüberstand in Gegenwart von neutralisierendem IL-10-Antikörper (IL-10 Ak), Angaben \pm SEM

Zugabe IL-10-Antikörper [μ g/ml]	A TNF α -Protein [pg/ml]	B IL-12p40-Protein [pg/ml]
unstimuliert	5522 \pm 1116	520 \pm 27
LPS	26929 \pm 2979	2010 \pm 39
IL-10 Ak 5 μ g/ml	102648 \pm 7553	7531 \pm 15
IL-10 Ak 2,5 μ g/ml	93636 \pm 8189	7508 \pm 225
IL-10 Ak 1,25 μ g/ml	75312 \pm 2458	5726 \pm 268
IL-10 Ak 0,625 μ g/ml	76866 \pm 6158	4682 \pm 335

Wertetabelle zu Abb. 50: Wirkung von Aminothalidomid und Suramin auf die TNF α -induzierte IL-12p40- und IL-10-Proteinmenge im Kulturüberstand von CD-14+-Monozyten, Angaben \pm SEM

Zugabe rhTNF α -Protein	IL-12p40-Protein [pg/ml]	IL-10-Protein [pg/ml]
unstimuliert	200 \pm 13	102 \pm 2
TNF α	182 \pm 5	644 \pm 11
TNF α + Aminot. [4 μ M]	30 \pm 1	1856 \pm 60
TNF α + Suramin [200 μ M]	1278 \pm 84	33 \pm 2

Wertetabelle zu Abb. 51: Wirkung von SP600125 (Hemmung von JNK1/2/3) auf die TNF α -, IL-12p40- und IL-10-Protein-Bildung, Angaben \pm SEM

SP600125 [μ M]	TNF α -Produktion [%]	IL-12p40-Produktion [%]	IL-10-Produktion [%]
227,0000	-98 \pm 1	149 \pm 43	-93 \pm 2
76,0000	-97 \pm 2	201 \pm 59	-92 \pm 2
25,0000	-95 \pm 2	204 \pm 59	-89 \pm 4
8,4000	-85 \pm 9	227 \pm 49	-58 \pm 33
2,8000	-58 \pm 22	139 \pm 92	-38 \pm 42
0,9300	-38 \pm 18	65 \pm 73	-22 \pm 38
0,3100	-16 \pm 11	66 \pm 50	-17 \pm 15
0,1000	-18 \pm 7	23 \pm 43	-28 \pm 10
0,0300	1 \pm 16	37 \pm 42	-19 \pm 14
0,0100	-2 \pm 16	40 \pm 41	-17 \pm 13
0,0040	-14 \pm 15	63 \pm 22	-17 \pm 10
0,0010	-10 \pm 16	40 \pm 28	-8 \pm 13
0,0004	-11 \pm 9	34 \pm 25	-7 \pm 12
0,0001	-4 \pm 5	38 \pm 22	9 \pm 13

Wertetabelle zu Abb. 52: Wirkung von PD98059 (Hemmung von MEK1/2) auf die TNF α -, IL-12p40- und IL-10-Protein-Bildung, Angaben \pm SEM

PD98059 [μ M]	TNF α -Produktion [%]	IL-12p40-Produktion [%]	IL-10-Produktion [%]
10,00000	3 \pm 34	113 \pm 33	79 \pm 6
3,33300	18 \pm 39	104 \pm 33	100 \pm 35
1,11100	19 \pm 32	119 \pm 35	115 \pm 35
0,37000	49 \pm 37	82 \pm 33	90 \pm 34
0,12300	53 \pm 35	65 \pm 34	76 \pm 33
0,04100	55 \pm 34	65 \pm 33	69 \pm 32
0,01400	80 \pm 31	64 \pm 32	69 \pm 33
0,00460	73 \pm 33	78 \pm 33	57 \pm 14
0,00150	26 \pm 34	70 \pm 32	57 \pm 13
0,00051	26 \pm 34	71 \pm 32	58 \pm 15
0,00017	26 \pm 35	62 \pm 32	54 \pm 12
0,00006	27 \pm 32	64 \pm 32	54 \pm 12
0,00002	33 \pm 34	56 \pm 32	57 \pm 16
0,00001	30 \pm 32	60 \pm 33	54 \pm 13

Wertetabelle zu Abb. 53: Wirkung von SB203580 (Hemmung von p38-MAPK) auf die TNF α -, IL-12p40- und IL-10-Protein-Bildung, Angaben \pm SEM

SB203580 [μ M]	TNF α -Produktion [%]	IL-12p40-Produktion [%]	IL-10-Produktion [%]
4,0000	-88 \pm 1	145 \pm 14	-79 \pm 7
2,0000	-80 \pm 2	53 \pm 3	-62 \pm 18
1,0000	-71 \pm 4	34 \pm 10	-44 \pm 29
0,5000	-59 \pm 12	10 \pm 17	-34 \pm 31
0,2500	-42 \pm 15	22 \pm 13	-14 \pm 43
0,1250	-26 \pm 13	29 \pm 10	-4 \pm 29
0,0625	-5 \pm 16	22 \pm 9	-7 \pm 4
0,0313	-23 \pm 5	12 \pm 7	-10 \pm 7
0,0156	-5 \pm 2	4 \pm 6	-17 \pm 10
0,0078	-2 \pm 4	9 \pm 12	-24 \pm 13
0,0039	-4 \pm 2	-10 \pm 12	-26 \pm 12
0,0020	-8 \pm 7	7 \pm 13	-27 \pm 8
0,0010	-1 \pm 10	0 \pm 7	-27 \pm 7
0,0005	11 \pm 10	1 \pm 9	-20 \pm 10

Wertetabelle zu Abb. 54: Wirkung verschiedener MAPK-Inhibitoren auf die TNF α - (A), IL-12p40- (B) und die IL-10-Proteinmenge (C) in LPS-stimulierten CD-14+-Monozyten, Angaben \pm SEM
A = TNF α -Protein [pg/ml]

Zeit [h]	LPS	LPS + Aminoth. [4 μ M]	LPS + Surramin [200 μ M]	
4	3213 \pm 94	1406 \pm 40	2372 \pm 255	
8	69615 \pm 2340	10506 \pm 856	82596 \pm 5923	
17	64616 \pm 5860	6621 \pm 416	137373 \pm 5649	
Zeit [h]	LPS + PD98059 [4 μ M]	LPS + UO126 [0,4 μ M]	LPS + SB203580 [4 μ M]	LPS + SB202474 [4 μ M]
4	2267 \pm 200	2472 \pm 342	342 \pm 56	2536 \pm 253
8	37268 \pm 15815	39314 \pm 17184	17184 \pm 435	46618 \pm 2179
17	41935 \pm 2312	31377 \pm 11467	11467 \pm 461	38469 \pm 2989

B = IL-12p40-Protein [pg/ml]

Zeit [h]	LPS	LPS + Aminoth. [4 µM]	LPS + Suramin [200 µM]	
4	40±9	9±1	209±17	
8	3426±457	39±3	7880±410	
17	9574±434	22±16	56125±1537	
Zeit [h]	LPS + PD98059 [4 µM]	LPS + UO126 [0,4 µM]	LPS + SB203580 [4 µM]	LPS + SB202474 [4 µM]
4	67±14	28±8	119±3	30±5
8	2778±234	1894±267	6335±3	2106±343
17	3868±273	3511±198	14514±2	5253±171

C = IL-10-Protein [pg/ml]

Zeit [h]	LPS	LPS + Aminoth. [4 µM]	LPS + Suramin [200 µM]	
4	10±1	250±13	1±0	
8	497±31	3608±118	2±1	
17	2312±118	4585±178	6±1	
Zeit [h]	LPS + PD98059 [4 µM]	LPS + UO126 [0,4 µM]	LPS + SB203580 [4 µM]	LPS + SB202474 [4 µM]
4	7±1	11±2	1±1	8±1
8	505±19	572±55	74±8	465±22
17	2058±70	2079±51	400±21	2045±61

Wertetabelle zu Abb. 55: Einfluss von PD98059 auf die TNFα- (A), die IL-12p40- (B) und die IL-10-Proteinbildung (C) in Gegenwart des p38-MAPK-Inhibitors SB203580,

Angaben ± SEM

A = TNFα-Protein [%]

PD98059	ohne SB 203580	+ SB 203580 [0,4 µM]
LPS	100±7	100±9
[1,25 µM]	122±8	84±17
[2,5 µM]	96±16	58±4
[5 µM]	74±10	38±3
[10 µM]	60±9	27±4

B = IL-12p40-Protein [%]

PD98059	ohne SB 203580	+ SB 203580 [0,4 µM]
LPS	100±8	100±8
[1,25 µM]	150±13	129±8
[2,5 µM]	141±21	136±3
[5 µM]	134±12	156±20
[10 µM]	122±10	148±9

C = IL-10-Protein [%]

PD98059	ohne SB 203580	+ SB 203580 [0,4 µM]
LPS	100±15	100±26
[1,25 µM]	87±16	42±2
[2,5 µM]	95±17	33±3
[5 µM]	96±18	25±2
[10 µM]	109±20	30±3

Wertetabelle zu Abb. 56: Einfluss von Aminothalidomid auf die TNF α -Proteinmenge im Kulturüberstand in Gegenwart des MEK1/2-MAPK-Inhibitors PD98059 nach 4 h LPS-Stimulation

Angaben \pm SEM

TNF α -Protein [%]

Aminothalidomid	ohne PD98059	+ PD98059 [5 μ M]
LPS	100 \pm 11	100 \pm 7
[0,0004 μ M]	107 \pm 5	97 \pm 1
[0,004 μ M]	100 \pm 15	66 \pm 2
[0,04 μ M]	65 \pm 13	54 \pm 5
[0,4 μ M]	50 \pm 5	38 \pm 5
[4 μ M]	43 \pm 7	34 \pm 1

Wertetabelle zu Abb. 57: Einfluss von Aminothalidomid auf die TNF α - (A), die IL-12p40- (B) und die IL-10-Proteinmenge (C) im Kulturüberstand in Gegenwart des p38-MAPK-Inhibitors SB203580, Angaben \pm SEM

A = TNF α -Protein [%]

Aminothalidomid	ohne SB 203580	+ SB 203580 [0,4 μ M]
LPS	100 \pm 19	100 \pm 4
[0,0004 μ M]	108 \pm 8	76 \pm 2
[0,004 μ M]	85 \pm 11	57 \pm 5
[0,04 μ M]	58 \pm 6	51 \pm 2
[0,4 μ M]	53 \pm 7	21 \pm 1
[4 μ M]	46 \pm 5	21 \pm 0

B = IL-12p40-Protein [%]

Aminothalidomid	ohne SB 203580	+ SB 203580 [0,4 μ M]
LPS	100 \pm 13	100 \pm 8
[0,0004 μ M]	72 \pm 8	93 \pm 4
[0,004 μ M]	16 \pm 2	29 \pm 8
[0,04 μ M]	4 \pm 1	9 \pm 1
[0,4 μ M]	3 \pm 1	6 \pm 0
[4 μ M]	4 \pm 1	6 \pm 0

C = IL-10-Protein [%]

Aminothalidomid	ohne SB 203580	+ SB 203580 [0,4 μ M]
LPS	100 \pm 16	100 \pm 12
[0,0004 μ M]	77 \pm 4	58 \pm 6
[0,004 μ M]	100 \pm 6	78 \pm 10
[0,04 μ M]	155 \pm 11	115 \pm 20
[0,4 μ M]	175 \pm 14	148 \pm 14
[4 μ M]	257 \pm 18	238 \pm 15

Wertetabelle zu Abb. 58: Einfluss von Aminothalidomid auf die Proteinmenge bzw. mRNA-Menge von TNF α -(A bzw. B), IL-12p40 (C bzw. D) und IL-10 (E bzw. F) in Gegenwart des p38-MAPK-Inhibitors SB203580

A = TNF α -Protein [pg/ml]

Zeit [h]	LPS	LPS + Aminothalidomid [4 μ M]	LPS + SB203580 [4 μ M]	LPS + SB203580 + Aminothalidomid
1,75	15952 \pm 102	10622 \pm 247	1420 \pm 71	1147 \pm 41
6,75	43326 \pm 520	16655 \pm 702	22702 \pm 1991	3395 \pm 266
12,50	47083 \pm 3000	16867 \pm 366	24614 \pm 1913	2804 \pm 116
17,25	30116 \pm 614	14128 \pm 1200	15156 \pm 1569	2081 \pm 147

B = TNF α -mRNA [pool Mono's]

Zeit [h]	LPS	LPS + Aminothalidomid [4 μ M]	LPS + SB203580 [4 μ M]	LPS + SB203580 + Aminothalidomid
1,75	310,24	110,39	33,95	24,16
6,75	44,62	3,23	39,49	5,28
12,50	2,40	1,41	3,82	0,36
17,25	0,70	0,20	0,24	0,10

C = IL-12p40-Protein [pg/ml]

Zeit [h]	LPS	LPS + Aminothalidomid [4 μ M]	LPS + SB203580 [4 μ M]	LPS + SB203580 + Aminothalidomid
1,75	1 \pm 0	1 \pm 0	1 \pm 0	1 \pm 0
6,75	716 \pm 29	245 \pm 27	3732 \pm 250	779 \pm 59
12,50	1979 \pm 154	243 \pm 18	12141 \pm 387	1134 \pm 33
17,25	3392 \pm 186	395 \pm 13	8532 \pm 514	1121 \pm 43

D = IL-12p40-mRNA [pool Mono's]

Zeit [h]	LPS	LPS + Aminothalidomid [4 μ M]	LPS + SB203580 [4 μ M]	LPS + SB203580 + Aminothalidomid
1,75	5,42	1,51	4,41	2,84
6,75	204,86	2,23	710,78	37,61
12,50	11,32	0,21	125,70	0,33
17,25	0,18	0,02	0,14	0,01

E = IL-10-Protein [pg/ml]

Zeit [h]	LPS	LPS + Aminothalidomid [4 μ M]	LPS + SB203580 [4 μ M]	LPS + SB203580 + Aminothalidomid
1,75	4 \pm 1	3 \pm 0	1 \pm 0	0 \pm 0
6,75	443 \pm 5	2680 \pm 182	45 \pm 4	776 \pm 35
12,50	6173 \pm 170	14131 \pm 573	1109 \pm 6	3561 \pm 42
17,25	12944 \pm 101	21425 \pm 542	2061 \pm 132	4541 \pm 263

F = IL-10-mRNA [pool Mono's]

Zeit [h]	LPS	LPS + Aminothalidomid [4 μ M]	LPS + SB203580 [4 μ M]	LPS + SB203580 + Aminothalidomid
1,75	0,53	1,64	0,16	0,43
6,75	588,26	1363,85	19,01	363,16
12,50	1826,89	4905,25	283,24	521,50
17,25	1452,49	1990,85	91,36	189,02

Wertetabelle zu Abb. 59: Einfluss von Suramin auf die IL-12p40- bzw. IL-10-Proteinbildung in Gegenwart des p38-MAPK-Inhibitors SB203580 [0,4 μ M] nach 4 h und 22 h LPS-Stimulation, Angaben \pm SEM

IL-12p40-Protein [%]

Suramin	ohne SB203580 4 h	+ SB 203580 4 h	ohne SB203580 22 h	+ SB 203580 22 h
LPS	100 \pm 9	100 \pm 7	100 \pm 13	100 \pm 17
[12,5 μ M]	104 \pm 7	211 \pm 8	127 \pm 31	227 \pm 11
[25 μ M]	105 \pm 15	214 \pm 7	137 \pm 13	299 \pm 8
[50 μ M]	136 \pm 8	231 \pm 4	279 \pm 44	558 \pm 55
[100 μ M]	196 \pm 8	231 \pm 24	945 \pm 104	1337 \pm 9
[200 μ M]	180 \pm 8	197 \pm 30	1628 \pm 204	1902 \pm 142

IL-10-Protein [%]

Suramin	ohne SB203580 4 h	+ SB 203580 4 h	ohne SB203580 22 h	+ SB 203580 22 h
LPS [12,5 µM]	kein IL-10- Protein messbar	kein IL-10- Protein messbar	100±31	100±6
[25 µM]			92±27	52±5
[50 µM]			33±3	14±3
[100 µM]			6±2	2±0
[200 µM]			2±0	1±0
			1±0	1±1

Wertetabelle zu Abb. 60: LPS-Stimulation von CD14⁺-Monozyten: p38 MAPK Phosphorylierung und TNFα-Proteinmenge im Kulturüberstand

Anteil phosphorylierter p38α MAPK [%]

Zeit [h]	unstimuliert	LPS	LPS + Aminothalidomid [4 µM]	LPS + Suramin [200 µM]	LPS + SB203580 [4 µM]
5	0	1	1	0	1
10	0	2	2	0	1
20	0	3	4	2	3
30	1	5	4	5	5
90	1	3	4	4	6

TNFα-Proteinmenge [pg/ml]

Zeit [h]	unstimuliert	LPS	LPS + Aminoth. [4 µM]	LPS + Suramin [200 µM]	LPS + SB203580 [4 µM]
5	198±24	199±22	157±9	108±19	0±0
10	245±42	187±16	211±13	170±8	6±3
20	292±23	429±17	405±19	250±22	28±5
30	325±17	643±25	551±38	305±40	41±5
90	420±21	6038±135	5040±139	8288±275	406±12

Wertetabelle zu Abb. 61: Anisomycin-induzierte p38 MAPK Phosphorylierung in CD14⁺-Monozyten (A) und TNFα-Proteinmenge im Kulturüberstand (B)

A = Anteil phosphorylierter p38α MAPK [%]

	unstimuliert	Anisomycin	Anisomycin + Aminoth. [4 µM]	Anisomycin + Suramin [200 µM]	Anisomycin + SB203580 [4 µM]	Anisomycin + SB202474 [4 µM]
5		3	4	2	1	3
10		5	5	4	1	7
20		8	6	7	3	9
30	3	11	13	11	4	10
90		18	16	15	7	17

B = TNFα-Proteinmenge [pg/ml]

	unstimuliert	Anisomycin	Anisomycin + Aminoth. [4 µM]	Anisomycin + Suramin [200 µM]	Anisomycin + SB203580 [4 µM]	Anisomycin + SB202474 [4 µM]
5		379±28	340±28	130±15	17±2	198±25
10		368±30	387±42	182±16	29±3	249±16
20		354±10	316±10	137±1	21±3	255±4
30	416±10	361±18	325±11	163±5	25±3	261±11
90		330±9	343±36	163±4	4±3	314±18

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Professor Dr. rer. nat. H.-W. Klein betreut worden.

Köln, den

Felicitas Thom

Teilpublikationen:

F. Thom, H. Stockhausen, T. Germann, E.J. Wade, POSTER bei dem „7th joint Meeting – Signal Transduction: Receptors, Mediators and Genes“ November 2003:“The effect of Suramin on the Phosphorylation of p38-MAPK and Cytokine Release in LPS-Stimulated Human Monocytes” .

F. Thom, H. Stockhausen, T. Germann, S. Frosch, E.J. Wade
Biological inactivation and impaired detection of IL-10 by Suramin
Journal of Immunological Methods – accepted 31st January 2005

F. Thom, E.J. Wade, H. Stockhausen, S. Frosch, T. Germann
Modulation of IL-12(p40) and IL-10 production by 4-amino-thalidomide in LPS-activated CD14⁺ monocytes
Journal of Immunological Letters – in preparation (submission planned May 2005)

Lebenslauf

Name	Felicitas Thom (geb. Priboth) geboren am 16.06.1971 in Leipzig
Ausbildung	
09/1978 – 08/1988	Polytechnische Oberschule, Leipzig (Mittlere Reife)
09/1988 – 08/1991	Facharbeiter für Textiltechnik mit Abitur, Flöha
09/1991 – 08/1993	Grundstudium Biologie an der Universität zu Köln, Köln
09/1993 – 08/1994	Studium an der Manchester University, Manchester School of Biological Sciences
09/1994 – 01/1998	Hauptstudium Biologie an der Universität zu Köln, Köln Abschluss: Diplom
Berufliche Tätigkeit	
01/1998 – 07/1999	Tätigkeit als „Clinical Research Associate“, Overath Institut für Klinische Forschung
09/1999 – 03/2001	Tätigkeit als „Clinical Study Manager“, Aachen Klinische Entwicklung der Grünenthal GmbH
04/2001 – dato	Dissertation unter der Leitung von Herrn Prof. H. W. Klein im Institut für Biochemie der Universität zu Köln, Köln Praktische Arbeiten in den Laboratorien der Molekularen Pharmakologie der Grünenthal GmbH, Aachen