

Aus der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Zentrum für Kinderheilkunde
Klinik für pädiatrische Hämatologie und Onkologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. U. Göbel

Mechanismus der Interleukin-10 vermittelten Suppression der TNF- α Produktion in gereinigten Monozyten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Dong-In Shin

2000

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung

der Medizinischen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. D. Häussinger, Dekan

Referent: Prof. Dr. med. D. Körholz

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. J. Krutmann

Für meine Eltern in Liebe und Dankbarkeit

Abkürzungen

CD	cluster of differentiation
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ELISA	enzym linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence activated cell scanner
FCS	fötales Kälberserum
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-Stimulierender Faktor
HLA	humanes Leukozyten Antigen
IL	Interleukin
KD	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MNC	mononukleäre Zellen
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PG	Prostaglandin
PS	Percoll Standardlösung
TNF	Tumor Nekrose Faktor

Inhalt

1. Einleitung und Fragestellung der Arbeit	
1.1. Produktion und funktionelle Bedeutung von Tumor Nekrose Faktor-alpha	5
2. Methoden	
2.1. Reagenzien	9
2.2. Monozytenisolierung	12
2.3. Reinheitsbestimmung durch Durchflußzytometrie	13
2.4. Quantitative Zytokinmessung mittels ELISA	15
2.5. Statistische Auswertung	15
3. Ergebnisse	
3.1. Monozytenisolierung aus Buffy Coats	16
3.2. In vitro Untersuchung zur Interleukin 10 gesteuerten Regulation von Tumor Nekrose Faktor-alpha in Monozyten	25
4. Diskussion	
4.1. Isolation hochreiner Monozyten	36
4.2. Regulation der LPS induzierten TNF-alpha Produktion in gereinigten Monozyten	39
5. Literatur	43
6. Lebenslauf	51
7. Zusammenfassung	52

1. Einleitung

1.1. Produktion und funktionelle Bedeutung von Tumor Nekrose Faktor-alpha

TNF-alpha gehört zu den ersten pro-inflammatorischen Zytokinen, die von mononukleären Phagozyten nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) produziert werden (11). Es wird initial als 26-kD großes transmembranöses Protein synthetisiert, das nach Abspaltung eines Proteinteiles durch eine seitenspezifische Metalloprotease in die reife 17-kD große Form übergeht (12,13).

TNF-alpha besitzt zahlreiche biologische Wirkungen, die abhängig von der Art des Zielgewebes sind:

- In Endothelzellen supprimiert es die Expression von Thrombomodulin, setzt gerinnungsaktivierende Prozesse in Gang (14) und induziert die Freisetzung von IL-1 (15,16). Darüberhinaus wirkt es wachstumshemmend auf Endothelzellen (17,18) und verursacht morphologische Veränderungen des Endothels, wie zum Beispiel die Reorganisation von endothelialen Monolayern oder die Umlagerung von Aktinfilamenten (17,19).

- Bei Granulozyten führt TNF-alpha zu einer Aktivierung und Adhäsion. Es wird dadurch zu einem entscheidenden Mediator in der Entstehung des Endotoxinschocks, der in seiner Pathogenese wesentlich von der Aktivität der neutrophilen Granulozyten abhängig ist (20,21). Zusätzlich zu der vermehrten Adhäsion an endotheliale Zellen verstärkt TNF-alpha die Phagozytose von Latexpartikeln (22), die Produktion von Superoxid-Anionen (23), die

Freisetzung von Lysozym (24) und die Degranulation (25) in Granulozyten. Hierdurch kann TNF-alpha die Resistenz gegenüber Infektionserregern steigern.

- Monozyten und Makrophagen zählen zu den Hauptproduzenten von TNF-alpha (27,28,29). Ähnlich wie bei Granulozyten verstärkt TNF-alpha die chemotaktische Aktivität in Monozyten und Makrophagen (30). Darüberhinaus führt es zu einer vermehrten Produktion von GM-CSF (31), IL-1 und PGE₂ (32).

- In Lymphozyten induziert TNF-alpha eine verstärkte Expression von TNF-alpha und IL-2 Rezeptoren sowie HLA-DR Antigen (33,34), wodurch die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen vermittelt wird. Im Gegensatz zu T-Zellen wird die Proliferation und Differenzierung von B-Zell Lymphozyten dagegen gehemmt (35).

- In Knochen- und Knorpelgewebe scheint TNF-alpha eine Rolle bei der Entstehung von entzündlichen Gelenkerkrankungen zu spielen. Beschrieben wurde die Fähigkeit, die Resorption von Proteoglykanen in Knorpelgewebe (36) und die Resorption von Knochen (37) zu stimulieren.

Die wohl wichtigste klinische Bedeutung des TNF-alpha besteht in seiner Rolle als Mediator der Entstehung des Endotoxinschocks. Im Tierversuch an Ratten und Hunden zeigten sich nach einer Applikation von TNF-alpha allgemeine endotoxininduzierte Schocksymptome wie Hypotension, Tachypnoe, metabolische Azidose, anfängliche Hyperglykämie gefolgt von einer Hypoglykämie und multiplen Organschädigungen (38,39). Verabreicht in einer letalen Dosis führte TNF-alpha vornehmlich durch einen respiratorischen Arrest bedingt durch eine

akute interstitielle Pneumonie zum Tode, während subletale Dosen hauptsächlich zu Darmnekrosen mit sich anschließenden akuten intraabdominalen Infektionen führten (39). Darüberhinaus wurde nach kontinuierlicher TNF-alpha Applikation eine Hepatotoxizität (40) und eine Anämie (41) bei den Versuchstieren beobachtet.

In Ratten konnte nach Verabreichung einer letalen Dosis von Endotoxin die Überlebensrate durch eine Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen TNF-alpha (57) oder durch die zytokingesteuerte Suppression der TNF-alpha Produktion (58) verbessert werden. Affen, die 2 Stunden vor einer tödlichen Dosis von E.coli (10^{12} Keime) monoklonale Antikörper gegen TNF-alpha erhalten hatten, entwickelten keinen letalen Endotoxinschock (56). Beim Menschen findet man erhöhte TNF-alpha Serumspiegel außer beim Endotoxinschock (42) in Patienten mit parasitären Erkrankungen (44), AIDS (45), bakteriellen Infektionen (46,47) und verschiedenen Tumorerkrankungen (48).

Außer bei Infektionen scheint TNF-alpha auch bei der Induktion von Tumorkachexien eine Rolle zu spielen. So wurde in Mäusen, die mit einem TNF-alpha produzierenden Tumor infiziert wurden, eine schnellere und schwerere Gewichtsabnahme und Kachexie als in der TNF-alpha negativen Kontrollgruppe beobachtet (43). In der anti-Tumor Therapie jedoch stellt TNF-alpha noch eine untergeordnete Rolle dar. Benannt nach seiner Fähigkeit in experimentell erzeugten Tumoren hämorrhagische Nekrosen zu erzeugen, waren kurz nach seiner Entdeckung viele Hoffnungen bezüglich einer möglichen klinischen Anwendung in der Tumor-Therapie mit dem TNF-alpha verbunden. Die bisher durchgeführten Studien bei Menschen waren jedoch eher enttäuschend: bei systemischer Gabe von TNF-alpha und auch bei intratumoraler Injektion konnten nur vereinzelt Tumorregressionen induziert werden.

Eine Indikation scheint sich bei Peritonealkarzinose mit Aszites abzuzeichnen, wo die lokale Gabe von TNF-alpha zur Rückbildung des Aszites führt, ohne jedoch die Gesamtprognose zu beeinflussen (56).

Die Regulationsmechanismen von TNF-alpha in Wechselwirkung mit anderen Zytokinen sind vielfältig. Körholz et al. beschreiben, daß IL-2 in T-Zellen zu einer Aktivierung und Induktion der IL-12 Produktion führt, wobei IL-12 die TNF-alpha Produktion induziert. Ein Zugabe von IL-10 führt zu einer Suppression der TNF-alpha Produktion, wobei dies nicht durch eine direkte Hemmung der TNF-alpha Produktion geschieht, sondern durch eine Unterdrückung der IL-12 Produktion erreicht wird (49).

Der supprimierende Effekt von IL-10 auf die TNF-alpha Produktion wurde auch bei Monozyten beschrieben (50,51,52,53), jedoch ist unklar, ob diesem Hemmungsprozeß ein vergleichbarer Mechanismus wie in T-Zellen zugrunde liegt. Darüberhinaus beschreiben Panzer et al. (54), daß IL-1 beta in mit murinen Antigenen stimulierten T-Zellen die TNF-alpha Produktion induziert und gleichermaßen TNF-alpha die Bildung von IL-1 beta mRNA induziert und verstärkt. Über die Bedeutung von IL-12 und IL-1 beta für die Produktion von TNF-alpha in Monozyten ist jedoch nichts bekannt.

In dieser Arbeit sollte zunächst eine Methode zur Monozytenisolation erprobt, und anschließend die Regulation der TNF-alpha Produktion in Monozyten untersucht werden.

2. Methoden

2.1. Reagenzien

2.1.1. Zellkulturreagenzien

R10 Medium: 50 ml hitze-inaktiviertes und steril fötales Kälberserum + 5 ml Penicillin / Streptomycin, 10.000 IE/ml + 6 g L-Glutamin, RPMI 1640 ad 500 ml (alle Reagenzien Gibco, Berlin, außer RPMI 1640: Biochrom, Berlin)

serumfreies Medium: 5 ml Penicillin / Streptomycin, 10.000 IE/ml + 6 g L-Glutamin, RPMI 1640 ad 500 ml (alle Reagenzien Gibco, Berlin, außer RPMI 1640: Biochrom, Berlin)

2.1.2. Stimulatoren / Inhibitoren

Lipopolysaccharid (LPS; *Escherichia coli*) (Sigma Chemical, St. Louis, MO) in einer Konzentration von $1 \mu\text{g}/10^6$ Zellen.

Monoklonaler anti-IL-10 Rezeptor Antikörper (R&D Systems, Minneapolis, MN) in einer Konzentration von $1 \mu\text{g}/10^6$ Zellen. Klon 37607.11, Maus IgG1.

Monoklonaler anti-IL-12 Antikörper (R&D Systems, Minneapolis, MN) in einer Konzentration von $1 \mu\text{g}/10^6$ Zellen. Klon 24910.1, Maus IgG1.

Monoklonaler anti-IL-1 beta Antikörper (R&D Systems, Minneapolis, MN) in einer Konzentration von $1 \mu\text{g}/10^6$ Zellen. Klon 2805.31, Maus IgG1.

Monoklonaler Maus IgG1 Antikörper (R&D Systems, Minneapolis, MN) in einer Konzentration von $1 \mu\text{g}/10^6$ Zellen; alle Experimente mit neutralisierenden oder blockierenden Antikörpern wurden kontrolliert durch die identische Durchführung aller Experimente mit nicht-reaktiven Maus IgG1 Antikörpern.

Reagenzien zur quantitativen Zytokinbestimmung mit enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA-Kits für TNF-alpha, IL-10, IL-12 (p70) (alle Diaclone, Besacon, Frankreich) und IL-1 beta (R&D Sytem, Minneapolis, MN).

2.1.3. Reagenzien zur Monozytenisolation

Buffycoats gesunder Blutspender (Blutbank der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)

Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung, pH 7,4 (PBS) (Apotheke der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)

Ficoll-Paque (5,7 % w/v Ficoll 400, spezifische Dichte 1,077 g/ml, 9 % w/v Natriumdiatrizoat in Aqua ad injectabile) (Pharmacia, Freiburg)

Petriperm Teflon-beschichtete Kulturschalen (Haereus, Hamburg, 50 mm Durchmesser)

Percoll (spezifische Dichte 1.13 g/ml, pH 9.0 bei 20 °C, Osmolalität < 25 mOs/kg H₂O) (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)

Flat-bottom full area 96-well Kulturplatten (Falcon, Lincoln Park, NJ)

50 ml Falcon-Röhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg)

10 ml Greiner-Röhrchen (Greiner, Berlin)

CD14-FITC, CD56-FITC, CD3-PE, CD20-PERCP: FITC-gekoppelter CD14-IgG1-Antikörper aus der Maus, FITC-gekoppelter CD56-IgG1-Antikörper aus der Maus, PE-gekoppelter CD3-IgG2-Antikörper aus der Maus, PERCP-gekoppelter CD20-IgG2-Antikörper aus der Maus (alle Becton Dickinson, Heidelberg)

Rat-anti-mouse Microbeads: Ratte-anti-Maus IgG1, an ein paramagnetisches Partikel (mircobeads[®]) gekoppelt (Miltenyi, Bergisch-Gladbach)

MiniMacs Separationseinheit und Mikrosäulen (Miltenyi, Bergisch-Gladbach)

2.2. Monozytenisolierung

Die Anreicherung humaner Monozyten aus Buffycoat Blut gesunder Blutspender erfolgte durch Adhärenz der Monozyten an teflonbeschichtete Kulturschalen.

Buffycoat-Blut wurde im ersten Schritt mit PBS in einem Verhältnis von 1:1 in einem 50 ml Falcon-Röhrchen verdünnt. Ebenfalls in einem 50 ml Falcon-Röhrchen wurden 30ml verdünntes Blut auf 20 ml Ficoll überschichtet, um die mononukleäre Zellfraktion durch eine Ficoll Dichte-gradientenzentrifugation bei 800 x g anzureichern und von den Erythrozyten zu trennen. Die sich in der Interphase befindenden mononukleären Zellen wurden mit einer Pipette abgesaugt, in 30 ml eiskaltem PBS aufgenommen und dann 5 mal bei 300 x g mit jeweils 30 ml gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in eiskaltem serumfreien Medium aufgenommen, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und auf eine Zellkonzentration von 10^7 Zellen / ml eingestellt. Währenddessen wurde das durch die Dichtegradientenzentrifugation gewonnene autologe Serum jeweils 10 Minuten bei 720 x g und danach 1600 x g zentrifugiert. Mit dem nun thrombozytenfreien Serum wurden die teflonbeschichteten Schalen 15 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einmaligem Spülen der Schalen mit jeweils 5 ml PBS wurde zu den eingestellten mononukleären Zellen FCS zugegeben, so daß sich eine 3 %ige FCS Konzentration im Medium ergab. Jede Schale wurde mit 5 ml der Zellsuspension gefüllt und 45 Minuten lang unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂, 21 % O₂, 98 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert.

Danach konnten die nicht-adhärenenten Zellen mit warmem PBS von den Schalen gespült werden. Die Schalen mit den verbleibenden adhärenenten Zellen wurden mit jeweils 5 ml

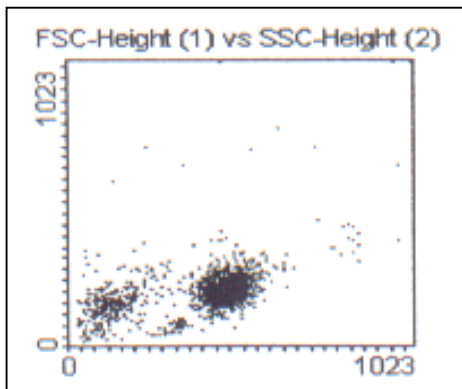
eiskaltem serumfreien Medium überschichtet und 1 Stunde lang auf Eis inkubiert. Nach dieser Zeit konnte im Durchlichtmikroskop eine durch den Kältereiz verursachte Abkuglung der zuvor noch adhären und damit der Schale flach aufliegenden Monozyten beobachtet werden, wodurch es möglich war, sie mit einer 1000 µl Pipette und eiskaltem PBS von der Schale zu spülen. Die Monozyten wurden anschließend in einem 10 ml Greiner-Röhrchen gesammelt und in eiskaltem PBS bei 600 x g gewaschen. Das Pellet wurde danach in eiskaltem R10 Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und die Zellkonzentration auf 10^6 Zellen/ml eingestellt sowie die Viabilität durch Suspension in Trypan-Blau (Gibco, Berlin) überprüft. Diese lag regelmäßig über 95 %. Auf diese Art und Weise konnten aus 30 ml Buffycoat Blut zwischen 4 und 20×10^6 reine Monozyten gewonnen werden. Die Monozyten wurden mittels Durchflußzytometrie auf ihre Reinheit überprüft (s.u.). Anschließend wurden die Monozyten mit LPS und Zytokinen je nach Versuchsbedingungen zwischen 6 und 24 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert.

2.3. Reinheitsbestimmung durch Durchflußzytometrie

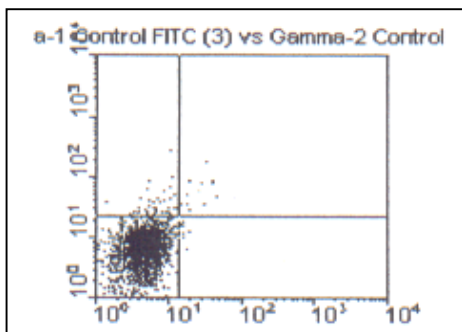
Mit der Durchflußzytometrie können einzelne Zellen bezüglich ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenzverhalten analysiert werden. Das Fluoreszenzverhalten kann durch eine vorherige Kopplung an fluoreszierende Antikörper bestimmt werden (55).

Zur Reinheitsbestimmung wurden die CD14-FITC-gekoppelten Monozyten in einem Durchflußzytometer (FACScan, Becton-Dickinson) analysiert. Die Reinheit, ausgedrückt als Anteil der FITC-positiven Zellen, betrug zwischen 85-96 % mit einem Mittelwert + Standardabweichung von $90 \% \pm 2,68 \%$. Abbildung 1 zeigt ein repräsentatives Experiment.

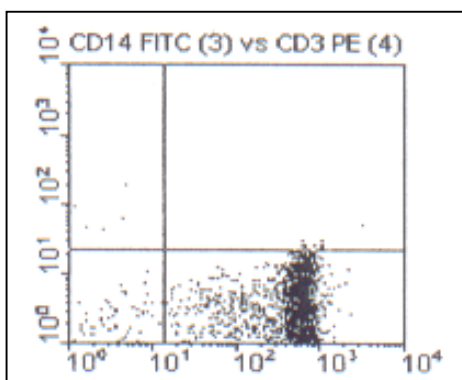
A.



B.



C.



D.

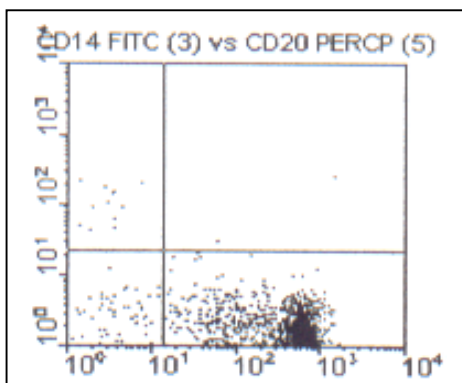


Abbildung 1

Monozytenreinheit

Monozyten wurden wie im Text beschrieben isoliert. Die CD14 positiven Monozyten stellen sich als FITC-positiv dar. In diesem repräsentativen Experiment beträgt die Monozytenreinheit ca. 95%.

A. Im oberen Plot sind der Vorwärtsscatter (x-Achse) und der Seitwärtsscatter (y-Achse) dargestellt.

B. Das untere Bild zeigt die Isotypenkontrolle mit dem Fluoreszenzkanal I (FITC) auf der x-Achse und den Fluoreszenzkanal II (PE) auf der y-Achse.

C. Das obere Diagramm zeigt > 95 % CD14 positive Monozyten auf der x-Achse und die < 1 % CD3 positive T-Zellen auf der y-Achse.

D. Im unteren Diagramm sind > 95 % CD14 positive Monozyten auf der x-Achse < 1 % CD20 positiven B-Zellen auf der y-Achse gegenübergestellt.

2.4. Quantitative Zytokinmessung mittels ELISA

Bei diesem immunologischen Nachweisverfahren wird eine Unterlage mit Antikörpern (capture antibody) beschichtet, welche das zu bestimmende Antigen zu binden vermögen. An diesen Antikörper-Antigen Komplex bindet sich nun an eine zweiter, enzymgekoppelter Antikörper (detection antibody) an das Antigen. Das Enzym ist nun in der Lage, ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt oder ein nichtfluoreszierendes Substrat in ein intensiv fluoreszierendes Substrat umzuwandeln. Die Bindung des zweiten Antikörpers ist proportional zur Menge des Antigens in der Probe, sodaß man durch die Messung des Farb- bzw. Fluoreszenzumsatzes die Menge des zu analysierenden Antigens bestimmen kann.

Für die Zytokinmessungen von TNF-alpha, IL-10, IL-12 und IL-1 beta wurden kommerziell erhältliche ELISA Kits verwendet. Zur Zytokinbestimmung wurden Zellkultur-Überstände nach 6, 12 oder 24 Stunden abgenommen. Dazu wurden die Zellsuspensionen aus den einzelnen wells der Kulturplatten in Eppendorf Behälter pipettiert und danach bei 800 x g 10 Minuten lang zentrifugiert. Die nun zellfreien Überstände wurden bis zur Messung bei -70 °C gelagert.

2.5. Statistische Auswertung

Mit Rücksicht auf den durch die Anwendung dieser Untersuchungsmethoden bedingten erheblichen finanziellen Aufwand wurde bei gleichbleibender Aussagekraft eine geringe Zahl an Untersuchungen durchgeführt, so daß auf eine statistische Auswertung verzichtet werden mußte. Jedoch sind alle Daten als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

3 Ergebnisse

3.1. Monozytenisolierung aus Buffy Coats

Kombination aus Ficoll Dichtegradientenzentrifugation, T-Zellrosettierung und Negativ-Selektionierung mittels MACS-Säule (Methode 1)

Da nicht aktivierte Monozyten isoliert werden sollten, wurde auf eine Plastikadhärenz verzichtet, da es hierbei regelmäßig auch zur Kontaktaktivierung kommt. In einem ersten Schritt wurden aus Buffy Coats mononukleäre Zellen (MNC) durch eine Ficoll Dichtegradientenzentrifugation angereichert. Die so gewonnenen Zellen wurden einer T-Zellrosettierung unterzogen, um alle T-Zellen aus der MNC Population zu entfernen. Hierbei binden Erythrozyten an die CD2-Rezeptoren reifer T-Zellen.

20-40 x 10⁶ MNC wurden in 15 ml R10 Medium aufgenommen, mit 3 ml der Neuraminidase behandelten Schafserythrozyten gemischt und 5 Minuten bei 120 x g zentrifugiert. Nach 1-stündiger Inkubation auf Eis wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert und in 10 ml R10 Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf 15 ml Ficoll überschichtet und 15 Minuten bei 800 x g zentrifugiert. Danach befanden sich die rosettierten T-Zellen im Pellet, die nicht-T-Zellen in der Interphase. Die sich in der Interphase befindlichen Zellen wurden isoliert, in PBS gewaschen und mit 30 µl CD20 Antikörper aus der Maus 15 Minuten lang auf Eis inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang folgte eine Zugabe von 30 µl eines an ein paramagnetisches Partikel (Microbeads) gekoppelten Ratte-anti-Maus

IgG, mit welchem die Zellen für weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert wurden. Nach Waschen in PBS und Resuspension in 1 ml PBS wurde die Zellsuspension über eine Mini-MACS Säule gegeben, die sich in einem Magnetfeld befand. Die nicht markierten Zellen wurden durch Zugabe von PBS aus der Säule herausgewaschen und die markierten CD20 positiven B-Zellen in der Säule festgehalten.

Durch die Kombination dieser 3 Verfahren sollten der Granulozyten-, T-Zell- und B-Zellanteil aus der MNC Population soweit wie möglich entfernt werden, um die verbleibenden Monozyten in einem hohen Reinheitsgrad in Suspension zu erhalten.

Die gewonnenen Zellen wurden mit fluoreszenzgekoppelten CD20, CD3 und CD14 Antikörpern markiert, und die Anteile von Monozyten, B-Zellen und T-Zellen durch eine FACS Analyse bestimmt.

Die Monozytenreinheit betrug 30 %. Der T-Zell Anteil betrug 2 %, der B-Zell Anteil 28 %. Insgesamt zeigte sich in der FACS Analyse ein sehr verstreutes Zellbild im Vorwärts- und Seitwärtsscatter mit einem großen Anteil an toten Zellen (s. Abbildung 2).

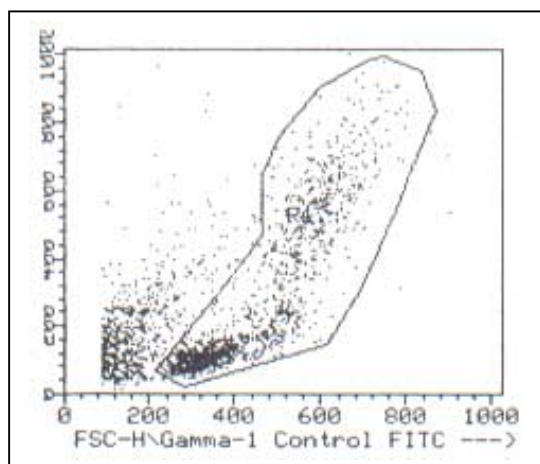


Abbildung 2

Monozytenreinheit

Monozyten wurden wie im Text beschrieben isoliert. Die anschließende FACS Analyse zeigt Im Vorwärts- und Seitwärtsscatter viele tote Zellen und insgesamt eine zerstreute Zellverteilung.

Aufgrund dieser Ergebnisse war ersichtlich, daß die T-Zellrosettierung zwar zu einer

zufriedenstellenden Reduktion des T-Zell Anteils geführt hat, jedoch der Anteil der B-Zellen noch wesentlich verkleinert werden mußte, um eine höhere Monozytenreinheit zu erzielen. Daher wurde in einem neuen Versuchsansatz Monozyten-Ficoll der Firma Biochrom zur Dichtegradientenzentrifugation verwendet.

Monozyten-Ficoll von Biochrom (Methode 2)

Zunächst wurde eine Ficoll Dichtegradientenzentrifugation, wie oben beschrieben, durchgeführt. Die Zellen der Interphase wurden in PBS gewaschen, in 15 ml PBS aufgenommen und schließlich auf 15 ml Monozyten-Ficoll überschichtet. Bei Monozyten-Ficoll handelt es sich um ein Trennmedium für die Dichtegradientenzentrifugation, das als besondere Substanz Iopromid[®] enthält, welches nach Firmenangaben die Viskosität der Trennlösung senken würde, wodurch eine verbesserte Zellseparation erzielt werden könnte.

Die so preparierten Zellen wurden bei 1000, 1200 oder 1400 x g 20 Minuten zentrifugiert. Die Interphase wurde abgesaugt, mit PBS gewaschen und für eine FACS Analyse mit CD14, CD20 und CD3 Antikörpern markiert.

Der größte Monozyten Anteil wurde durch die Zentrifugation bei 1200 x g erreicht und betrug 13 %. Der B-Zell Anteil konnte auf 3 % reduziert werden, wohingegen der T-Zell Anteil 58 % betrug (s. Abbildung 3).

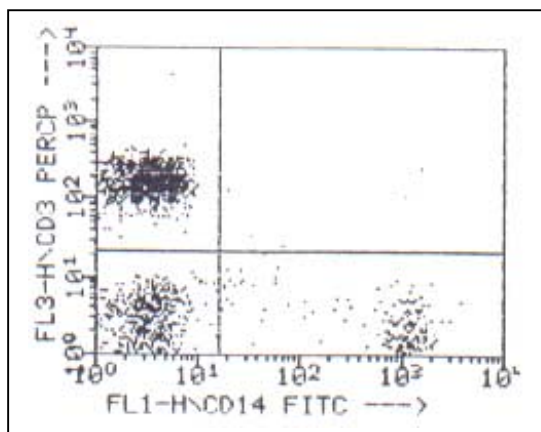
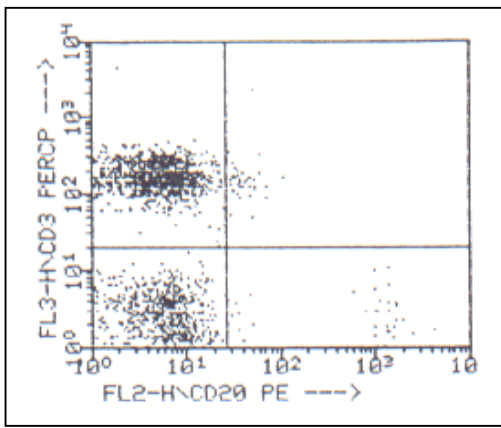


Abbildung 3

Monozytenreinheit

Nach der Isolation mit Monozyten Ficoll von Biochrom zeigt sich folgendes Bild: Im oberen Plot sind im rechten, unteren Quadranten die CD14 FITC markierten Monozyten abgebildet. Im linken, oberen Quadranten ist die große Population CD3 PERCP markierter T-Zellen zu sehen.



Im unteren Bild sind CD3 PERCP markierte T-Zellen CD20 PE markierten B Zellen gegenübergestellt.

Da durch die Anwendung der Monozyten-Ficolls eine weitgehende Reduktion des B-Zell Anteils erreicht werden konnte, erschien es naheliegend, dieses Verfahren mit der Ficoll Dichtegradi-entenzentrifugation und anschließender T-Zellrosettierung zu kombinieren.

Kombination von Methode 1 und Methode 2 (s. Tabelle 1)

Wie bereits beschrieben wurde eine Ficoll Dichtegradientenzentrifugation, und anschließend eine Monozyten-Ficoll Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Die in der Interphase befind-lichen Zellen wurden mit Hammelerythrozyten inkubiert (s.o.) und nach einer 1-stündigen Inkubationszeit auf Eis erneut auf Ficoll überschichtet zentrifugiert. Nach Waschen der Inter-phase wurde eine FACS Analyse durchgeführt. (s. Abbildung 4)

Der Monozyten Anteil betrug 59%, der B-Zell Anteil 10 % und der T-Zell Anteil 1,5 %.

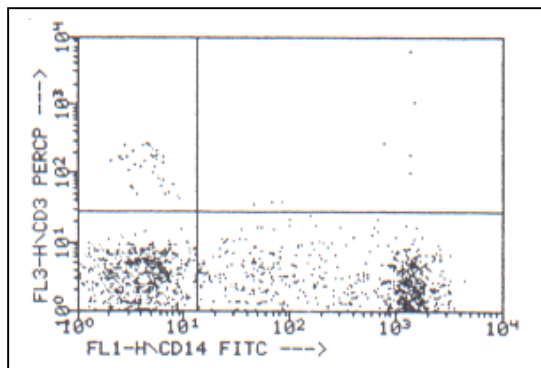
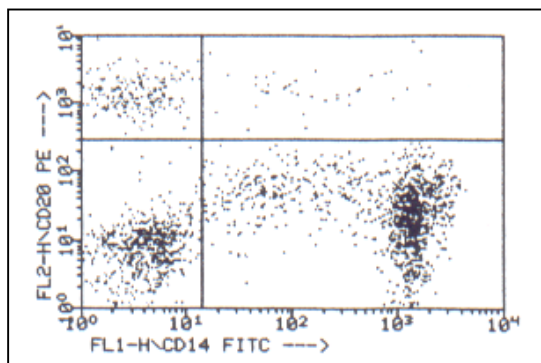


Abbildung 4

Monozytenreinheit nach Kombination von Methode 1 und 2

Monozyten wurden wie im Text beschrieben isoliert. Im oberen Bild sind die CD3 PERCP markierten T-Zellen im linken, oberen Quadranten und die CD14 FITC markierten Monozyten im rechten, unteren Quadranten abgebildet.



Im unteren Bild sind CD20 PERCP markierte B-Zellen den CD14 FITC markierten Monozyten gegenübergestellt.

Tabelle 1

	Monozyten Anteil	B-Zell Anteil	T-Zell Anteil
Methode I	30 %	28 %	2 %
Methode II	13 %	3 %	58 %
Methode I + II	59 %	10 %	1,5 %

Trotz ausreichender Entfernung von B- und T-Zellen war die Reinheit der gewonnenen Monozyten noch nicht befriedigend. Vor allem stellte sich die Frage, welcher Zellpopulation die verbleibenden 30 % der Zellen angehörten.

Der Versuch wurde in einem zweiten Experiment wiederholt und die gewonnenen Zellen wurden mit CD14 (Monozyten), CD3 (T-Zellen), CD20 (B-Zellen), CD15 (Granulozyten), Glyko-phoren-A (Erythrozyten) und CD56 (NK-Zellen) für eine FACS Analyse markiert, um herauszufinden, welche anderen Zellen zu einer Verunreinigung der Monozytenpopulation führten. Diese Untersuchungen erbrachten folgendes Ergebnis:

Anteil der

- CD14 positiven Zellen 58 %
- CD20 positiven Zellen 24 %
- CD3 positiven Zellen 2 %
- CD56 positiven Zellen 12 %
- CD15 positiven Zellen 22 %

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde nun versucht, zusätzlich die Zahl der NK-Zellen und Granulozyten durch Negativselektionierung zu verringern.

Kombination von Methode I, Methode II und Mini-MACS Säule gegen B-Zellen und NK-Zellen

(Methode III)

Wie oben beschrieben wurde Buffy Coat Blut mit Ficoll und danach 2 mal mit Monozyten-Ficoll zentrifugiert. Darauf folgte eine 2-malige T-Zellrosettierung. Vor und nach Durchlauf durch die MACS-Säule, die die CD20 und CD56 markierten Zellen zurückhalten sollte, wurde eine FACS-Analyse durchgeführt (Tabelle 2 / Abbildung 5).

Dieser Versuch wurde insgesamt 3mal durchgeführt, wobei der 2. Versuch nach der 1. T-Zellrosettierung aufgrund zu geringer Zellzahl abgebrochen werden mußte. Der 3. Versuch erbrachte eine Monozyten-Reinheit von 70 %. Da keine höheren Reinheiten zu erzielen waren, wurde die Versuchsreihe mit Monozyten-Ficoll abgebrochen.

Tabelle 2

	Anteil der Zellen vor Mini-MACS Säule	Anteil der Zellen nach Mini-MACS Säule
Monozyten	63 %	70 %
B-Zellen	3 %	1 %
T-Zellen	1 %	0,5 %
NK-Zellen	17 %	4 %
Granulozyten	1 %	1 %

(Bei den verbleibenden Zellen handelte es sich um tote Zellen.)

Isolierungsversuch durch Percoll (Methode IV)

Bei Percoll handelt es sich ähnlich wie bei Ficoll um ein flüssiges Medium zur Dichtegradienten-zentrifugation. Nach einem Protokoll von Pertoft et al. (1) sollten in einem 2-Schritt Verfahren Monozyten in einer Reinheit von > 90 % gewonnen werden können. Zunächst wurde kommerziell erhältliches Percoll mit einer spezifischen Dichte von 1,13 g/ml in einem Verhältnis von 1 : 9 mit 1,5 molarem NaCl verdünnt. Die so entstandene Standardlösung hatte eine Dichte von 1,124 g/ml. Die Standardlösung wurde erneut in einem Verhältnis von 1 : 6 oder 1 : 5 mit 0,9 % NaCl verdünnt, um eine 60 % (Dichte 1,076 g/ml) bzw. 50 % ige (Dichte 1,064 g/ml) Percoll-Standardlösung (PS) zu erhalten. Nach dem Originalprotokoll wurde 7 ml Buffycoat-Blut auf 4 ml PS 60 % überschichtet und bei 800 x g 30 Minuten lang bei 20 °C zentrifugiert. Die Interphase wurde abgesaugt, gewaschen und in 7 ml 0,9 %igem NaCl resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde danach auf 3 ml PS 50 %, PS 53 % oder PS 57 % überschichtet und erneut bei 800 x g 1 Stunde lang bei 4 °C zentrifugiert. Die Zellen der Interphase wurden nach einem Waschvorgang einer FACS Analyse unterzogen (Tabelle 3).

Tabelle 3

	PS 50 %	PS 53 %	PS 57%
Monozyten	40 %	25 %	38 %
T-Zellen	38 %	55 %	45 %
B-Zellen	6 %	7 %	5 %
NK-Zellen	7 %	10 %	9 %

Da mit 50 % Percollstandardlösung die größte Monozytenreinheit erreicht wurde, wurde der gleiche Versuch mit PS 50 % wiederholt, wobei jedoch das Buffycoat Blut in verschiedenen Verhältnissen mit PBS verdünnt wurde (Tabelle 4).

Tabelle 4

	Buffycoat Blut 1:1 verdünnt mit PBS	Buffycoat Blut 1:3 verdünnt mit PBS	Buffycoat Blut 1:5 verdünnt mit PBS
Monozyten	52 %	31 %	22 %
T-Zellen	31 %	39 %	47 %
B-Zellen	9 %	18 %	18 %
Granulozyten	1 %	1 %	1 %

Aufgrund dieser Ergebnisse war es erforderlich den T-Zell, B-Zell und NK-Zell Anteil weiter zu reduzieren. Dazu wurden Percoll Dichtegradientenzentrifugation, T-Zellrosettierung und MACS Säule gegen B-Zellen und NK-Zellen miteinander kombiniert.

Im Verhältnis 1 : 1 mit PBS verdünntes Buffycoat-Blut wurde, wie oben beschrieben, zunächst mit 60 % iger, dann mit 50 % iger Percollstandardlösung zentrifugiert. Die so gewonnenen Zellen wurden einer T-Zellrosettierung unterzogen, woran sich ein Durchfluß mit CD20 und CD56 markierten Zellen durch die MACS Säule anschloß. Vor und nach der MACS Säule wurde eine FACS Analyse durchgeführt (Tabelle 5).

Tabelle 5

	Anteil der Zellen vor Mini-MACS Säule	Anteil der Zellen nach Mini-MACS Säule
Monozyten	85 %	94 %
B-Zellen	6 %	0,5 %
T-Zellen	2 %	0,5 %
NK-Zellen	3 %	1,5 %
Granulozyten	1 %	1 %

In unabhängigen Wiederholungen dieses Versuches wurden Monozyten-Reinheiten von 73, 79, 84, 90 und 95 % erreicht. Trotz der befriedigenden Reinheitsgrade wurde, aufgrund des zu hohen Zeitaufwandes von mehr als 6 Stunden und der zu kleinen Monozytenausbeute von $2-4 \times 10^6$ Zellen aus 80 ml Buffycoat Blut ($20-40 \times 10^7$ Zellen), diese Isolationsmethode nicht weitergeführt.

Isolierungsversuch mit teflonbeschichteten Petriperm-Schalen

Monozyten wurden, wie bereits im Methodenteil beschrieben, aufgrund ihrer Adhärenzfähigkeit von den übrigen mononukleären Zellen separiert. Nach einer Ficoll-Dichtegradienten-zentrifugation wurden die MNC in FCS freies Medium aufgenommen und auf Petriperm-Schalen verteilt. Nach einer 45 minütigen Inkubation unter Standardbedingungen wurden alle nicht-adhären Zellen mit warmen PBS von der Schale gespült. Die adhären Monozyten wurden 1 Stunde lang auf Eis inkubiert und konnten

dann mit eiskaltem PBS von der Platte herunterge-spült werden. Die so gewonnenen Monozyten besaßen eine Reinheit von bis zu 96 % und eine Viabilität von > 95 %. Mit dieser Methode konnten aus 30 ml Buffycoat-Blut 10×10^6 Zellen gewonnen werden. Die Monozyten-Reinheit lag bei insgesamt 23 Isolationen zwischen 85 und 96 % mit einem Mittelwert \pm Standardabweichung von $90 \% \pm 2,68 \%$.

Mit diesem wenig zeitaufwendigen Verfahren, welches die Isolation von *nicht aktivierten* Monozyten ermöglichte, wurden die besten und reproduzierbarsten Ergebnisse erzielt. Dieses Verfahren wurde daher für die in vitro Analysen weiterhin verwendet.

3.2. In vitro Untersuchung zur Interleukin 10 gesteuerten Regulation von Tumor Nekrose Faktor-alpha in Monozyten

3.2.1. Zytokinkinetik in LPS stimulierten Monozyten

Monozyten wurden wie beschrieben separiert und mit LPS stimuliert. Nach 6, 12 und 24 Stunden wurde die Produktion von TNF-alpha, IL-10, IL-12 und IL-1 beta mittels ELISA gemessen. Dabei erreicht die Produktion von TNF-alpha das Maximum nach 6-12 Stunden und ist nach 24 Stunden signifikant geringer (Abbildung 1a). Die IL-10 Produktion ist nach 6 Stunden am niedrigsten und erreicht das Maximum nach 24 Stunden (Abbildung 1b). Die Produktion von IL-12 erreicht das Maximum nach 6-12 Stunden und ist nach 24 Stunden vermindert (Abbildung 1c), wohingegen IL-1 beta vermehrt nach 12-24 Stunden produziert wird (Abbildung 1d).

3.2.2. Wirkung des endogenen IL-10 auf die TNF-alpha, IL-12 und IL-1 beta Produktion in Monozyten

Monozyten wurden stimuliert mit Medium, LPS, LPS+anti-IL-10R oder LPS+Isotyp Kontrolle. Nach 24 und 72 Stunden wurde die Produktion von TNF-alpha, IL-12 und IL-1 beta mittels ELISA gemessen. Nach 24 stündiger Stimulation mit LPS ist die TNF-alpha Produktion 7-fach im Vergleich zur Stimulation mit Medium erhöht. Die Inhibition von endogenem IL-10 durch den blockierenden anti-IL10 Rezeptor Antikörper führt in drei durchgeführten Experimenten zu einer Steigerung der TNF-alpha Produktion um $108 \pm 63,5$ % im Vergleich zu der alleinigen Stimulation mit LPS (Abbildung 2a). Ähnlich wird die

Freisetzung von IL-12 in drei durchgeführten Experimenten durch die Inhibition von endogenem IL-10 um 287 ± 153 % (Abbildung 2b), die Produktion von IL-1 beta um 94 ± 70 % gesteigert (Abbildung 2c). Ähnliche Werte wie nach 24 stündiger Stimulation werden für alle drei Zytokine auch nach 72 Stunden ermittelt.

3.2.3. Wirkungsweise des endogenen IL-10

Die Inhibition der Bindung von endogenem IL-10 an seinen Rezeptor führt zu einer gesteigerten Produktion von TNF-alpha, IL-12 und IL-1 beta. Da sowohl IL-12 als auch IL-1 beta in der Lage sind, die TNF-alpha Sekretion in T-Zellen hochzuregulieren (50,55), wird untersucht, ob IL-12 oder IL-1 beta für die beobachtete Steigerung der TNF-alpha Produktion verantwortlich sind. Kostimulation von LPS-behandelten Monozyten mit anti-IL-12 oder anti-IL-1 beta Antikörpern hat keinen Effekt auf die TNF-alpha Produktion im Vergleich zur Stimulation mit LPS allein (Abbildung 3a). Gleichermäßen zeigt die Inkubation von LPS behandelten Monozyten mit anti-IL-10R in Kombination mit anti-IL-12 oder anti-IL-1 beta keinen Effekt auf die TNF-alpha Produktion verglichen mit der Inkubation mit LPS und anti-IL-10R alleine hat (Abbildung 3b). Dies läßt vermuten, daß die Suppression von endogenem IL-12 und IL-1 beta nicht für die durch IL-10 verminderte TNF-alpha Produktion verantwortlich ist.

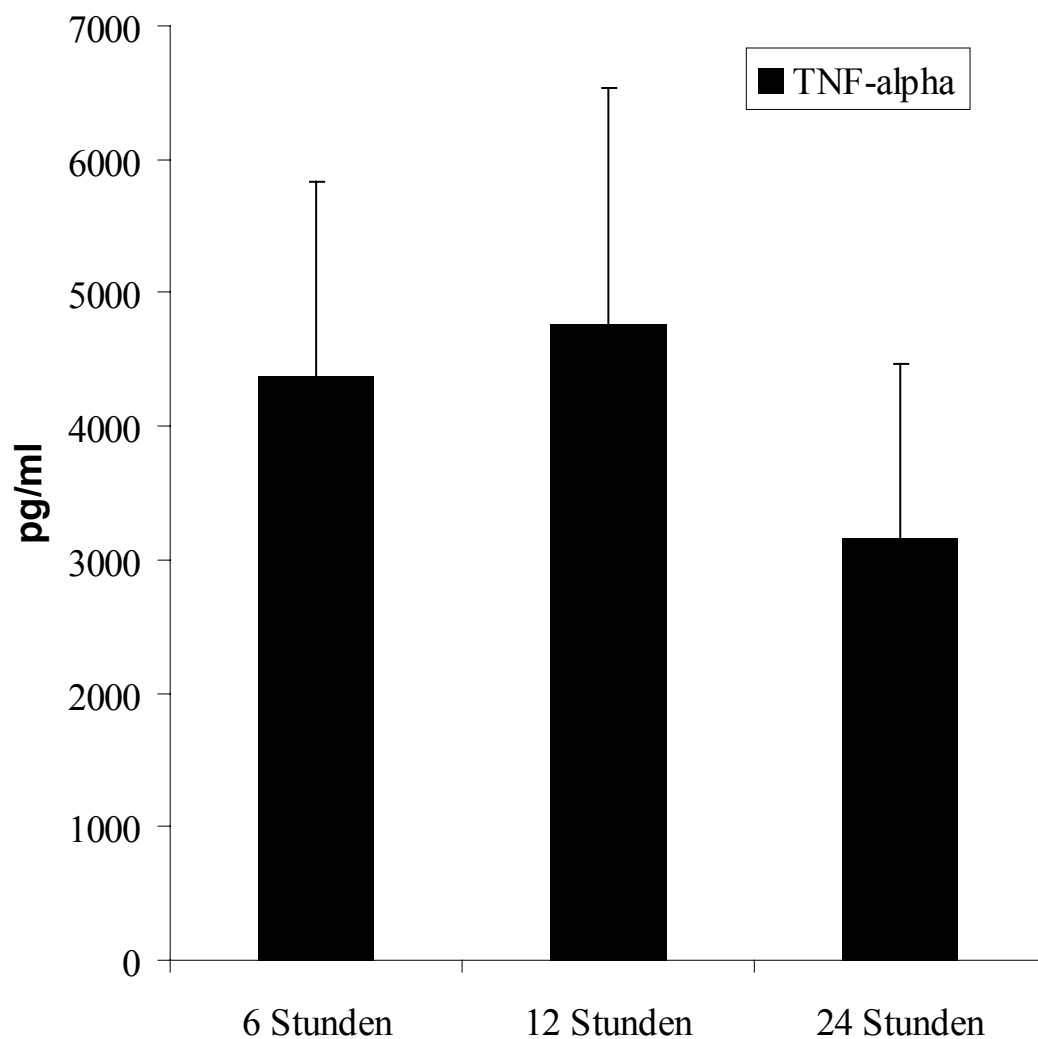


Abbildung 1a:

Kinetik der TNF-alpha Produktion in LPS stimulierten Monozyten

Monozyten wurden 6, 12 und 24 Stunden mit LPS stimuliert, und die Produktion von TNF-alpha wurde in den Überständen mittels ELISA gemessen. (Abgebildet sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten.)

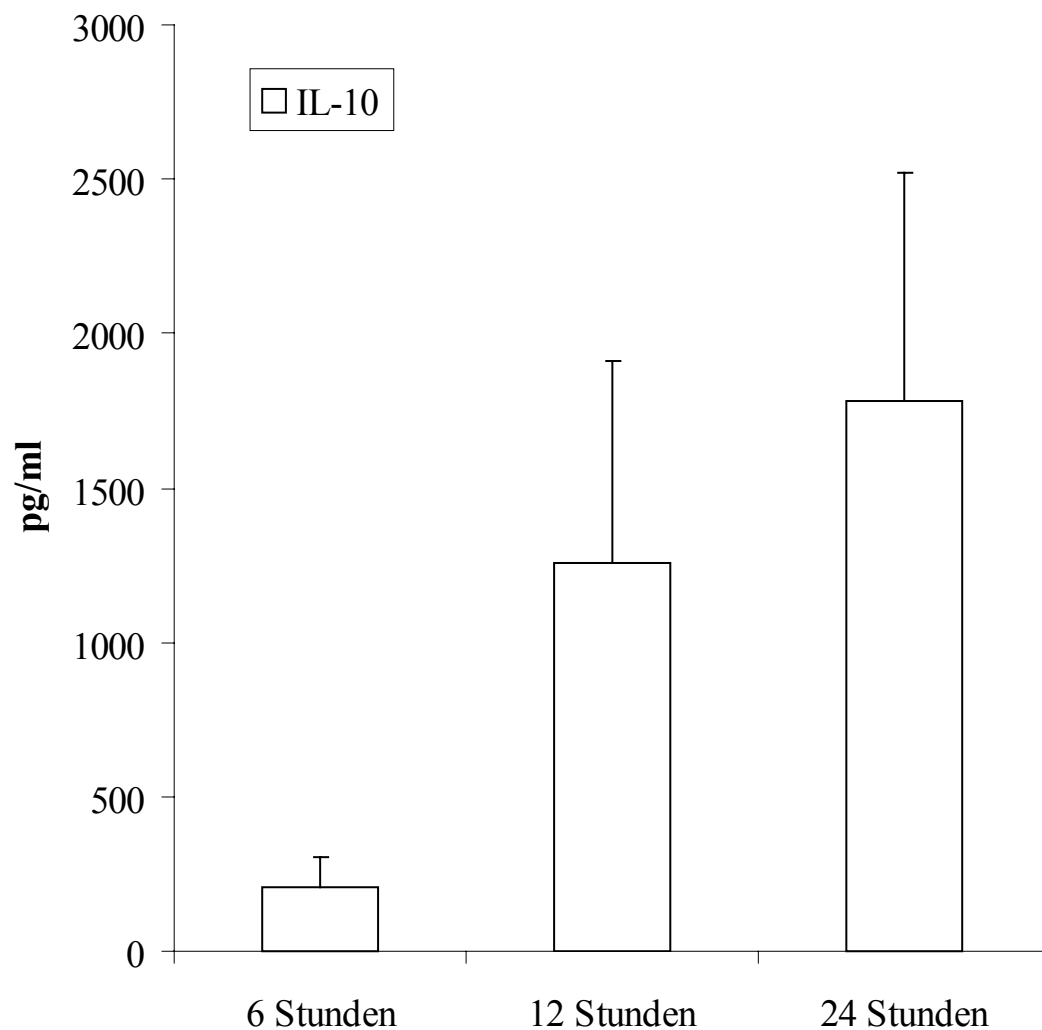


Abbildung 1b:

Kinetik der IL-10 Produktion in LPS stimulierten Monozyten

Monozyten wurden 6, 12 und 24 Stunden mit LPS stimuliert, und die Produktion von IL-10 wurde in den Überständen mittels ELISA gemessen. (Abgebildet sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten.)

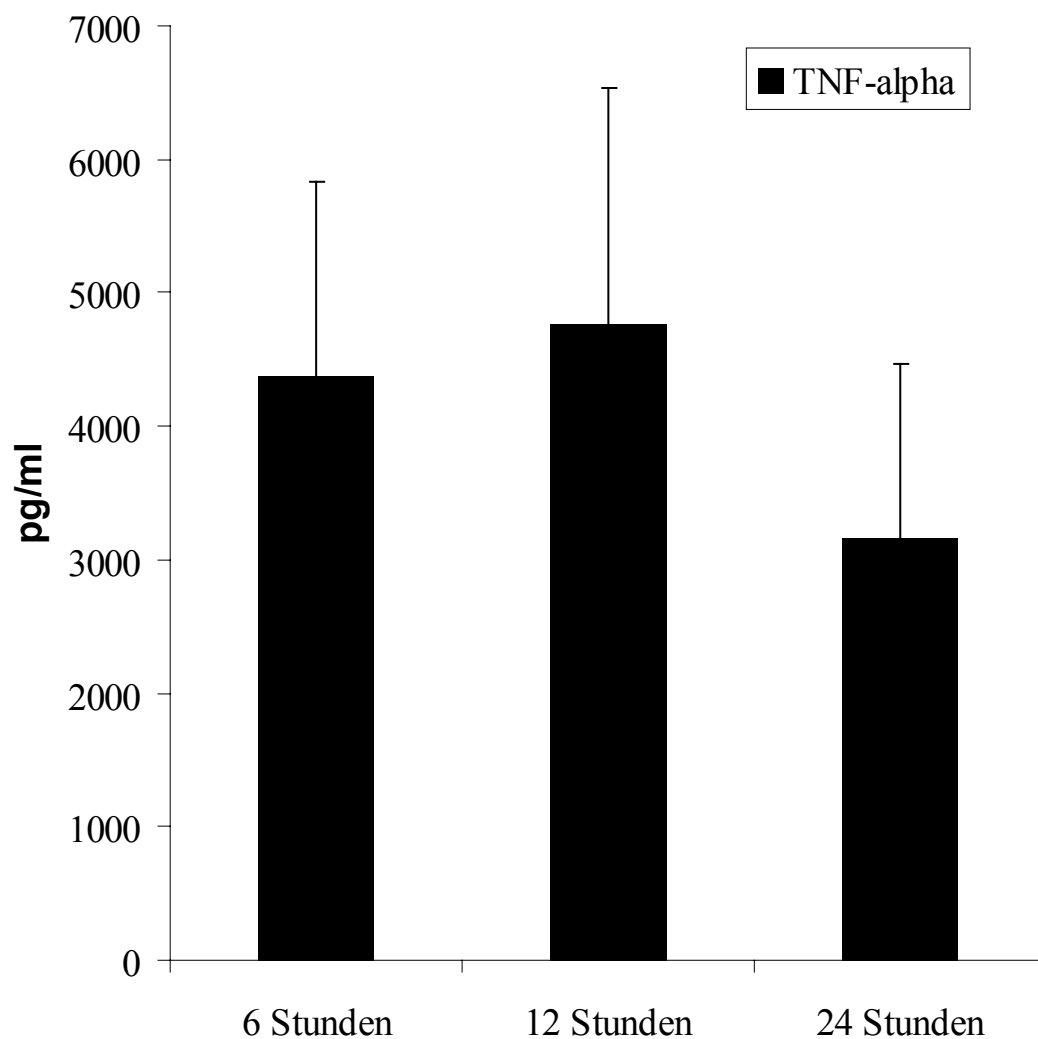


Abbildung 1a:

Kinetik der TNF-alpha Produktion in LPS stimulierten Monozyten

Monozyten wurden 6, 12 und 24 Stunden mit LPS stimuliert, und die Produktion von TNF-alpha wurde in den Überständen mittels ELISA gemessen. (Abgebildet sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten.)

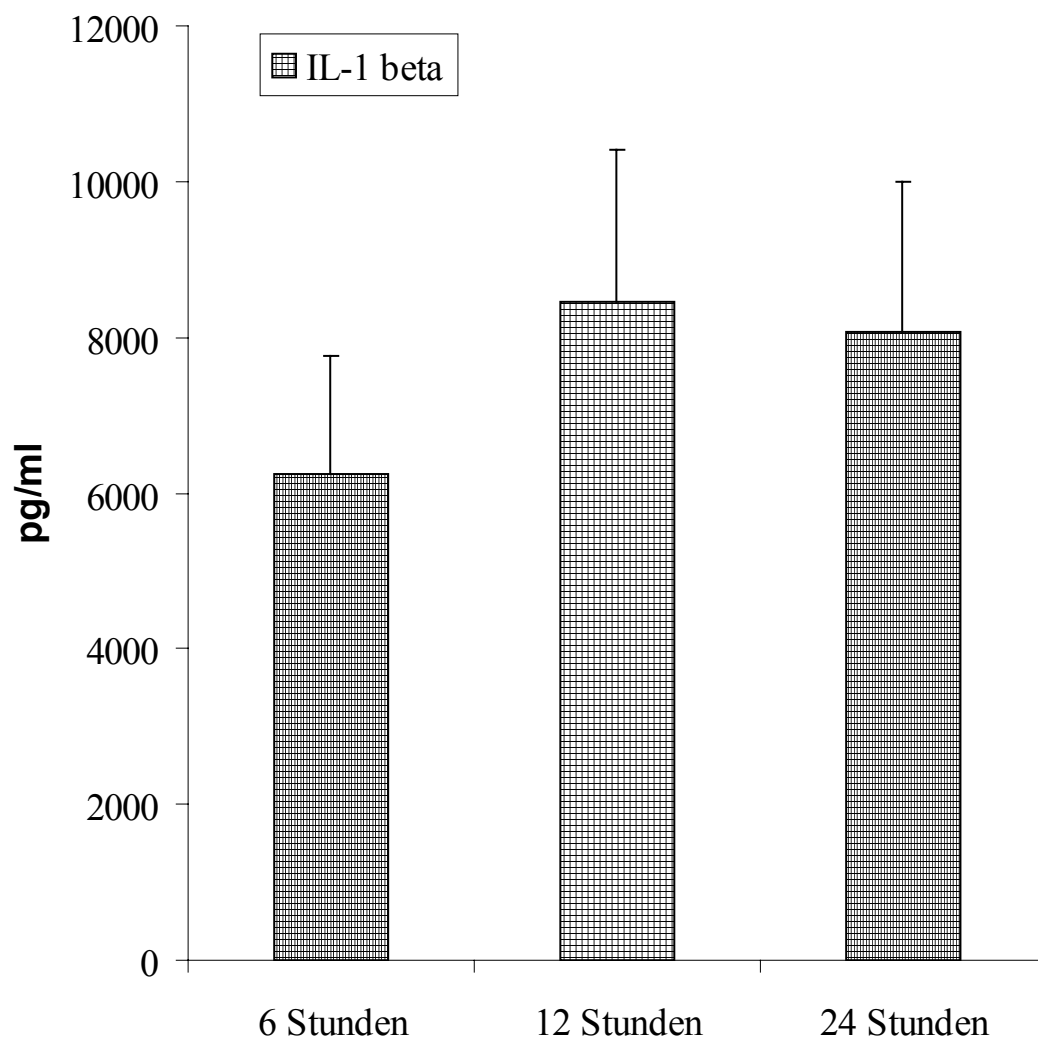


Abbildung 1d:

Kinetik der IL-1 beta Produktion in LPS stimulierten Monozyten

Monozyten wurden 6, 12 und 24 Stunden mit LPS stimuliert, und die Produktion von IL-1 beta wurde in den Überständen mittels ELISA gemessen. (Abgebildet sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten.)

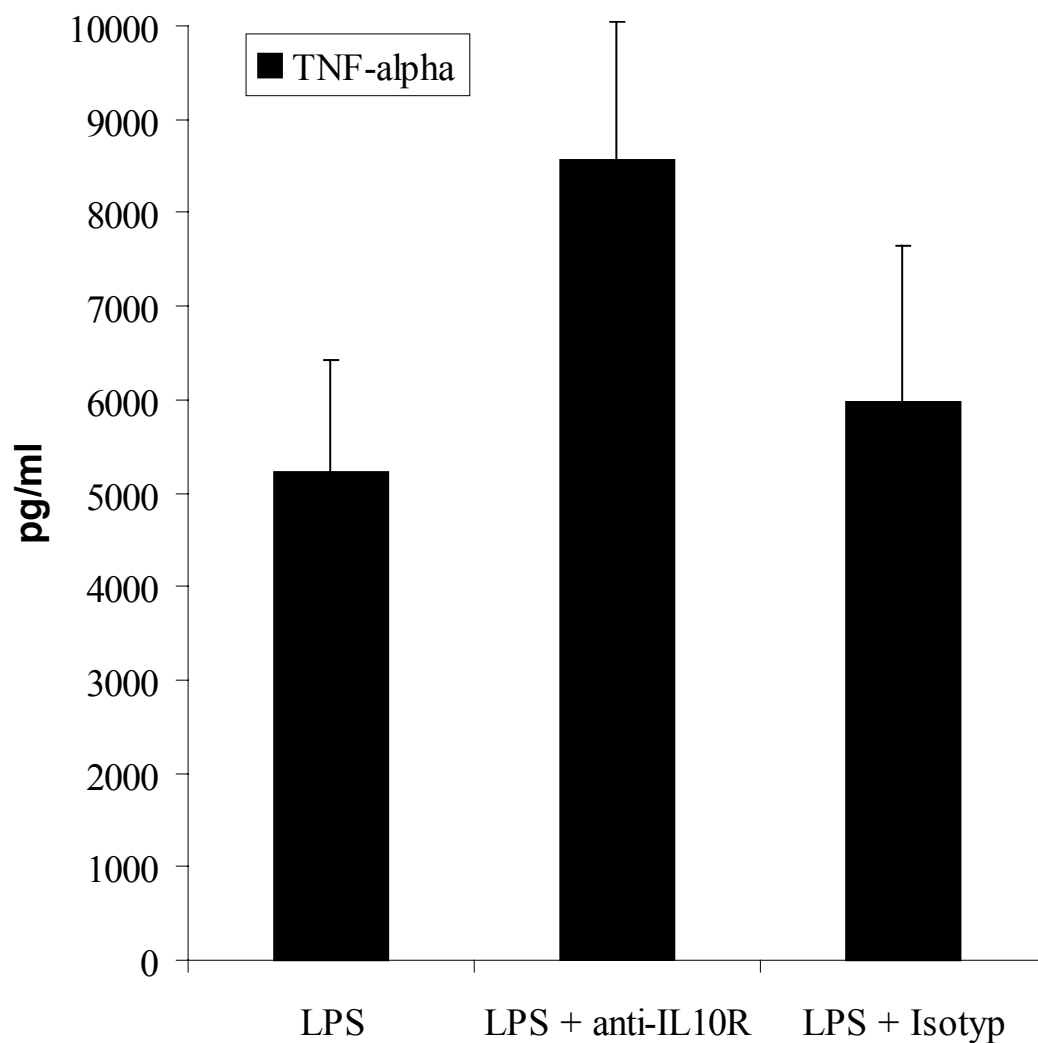


Abbildung 2a:

Effekt von endogenem IL-10 auf die TNF-alpha Sekretion in gereinigten, LPS stimulierten Monozyten. Monozyten wurden isoliert wie im Methodenteil beschrieben und dann 24 Stunden mit Medium, LPS, LPS+anti-IL-10R oder LPS+Isotyp Kontrolle stimuliert. Die TNF-alpha Konzentration wurde in zellfreien Überständen mittels ELISA gemessen. (Abgebildet sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten.)

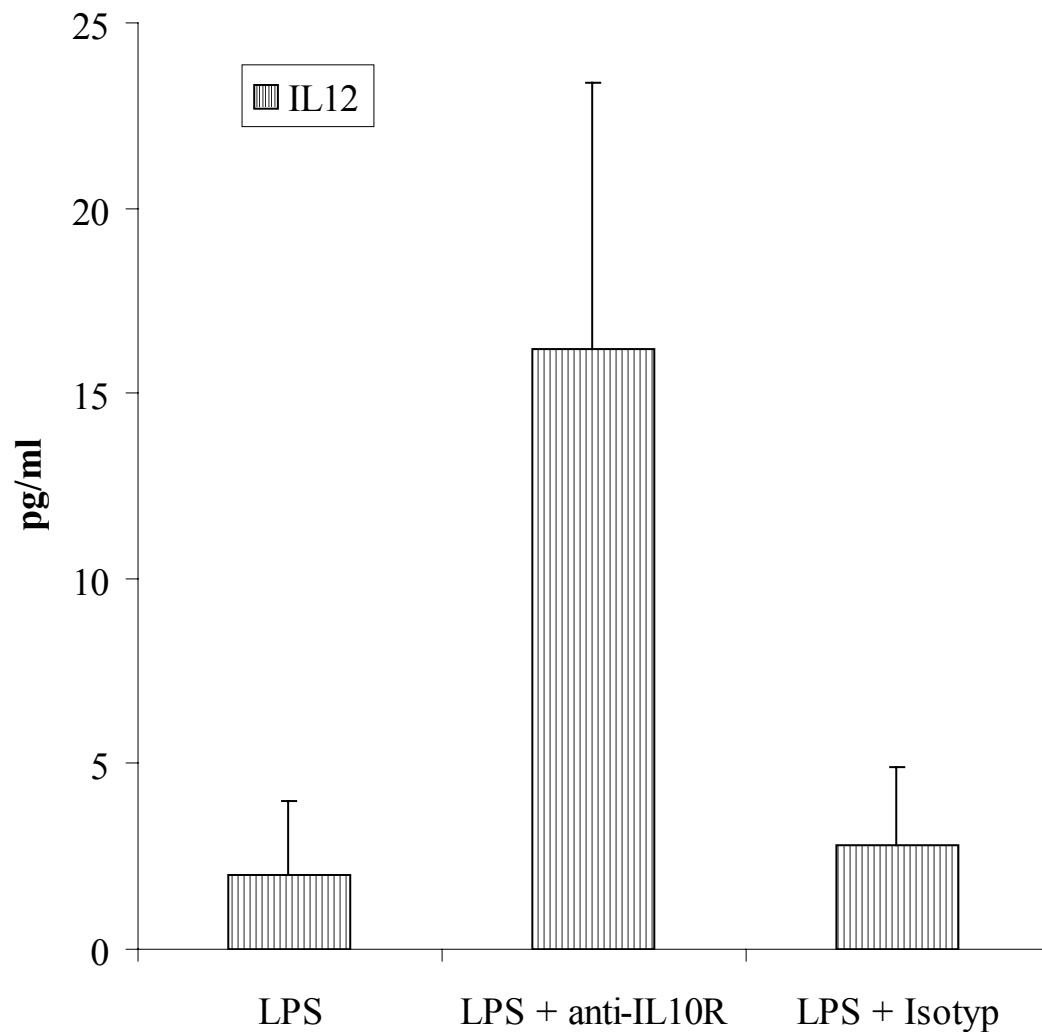


Abbildung 2b:

Effekt von endogenem IL-10 auf die IL-12 Sekretion in gereinigten, LPS stimulierten Monozyten. Monozyten wurden isoliert wie im Methodenteil beschrieben und dann 24 Stunden mit Medium, LPS, LPS+anti-IL-10R oder LPS+Isotyp Kontrolle stimuliert. Die IL-12 Konzentration wurde in zellfreien Überständen mittels ELISA gemessen. (Abgebildet sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten.)

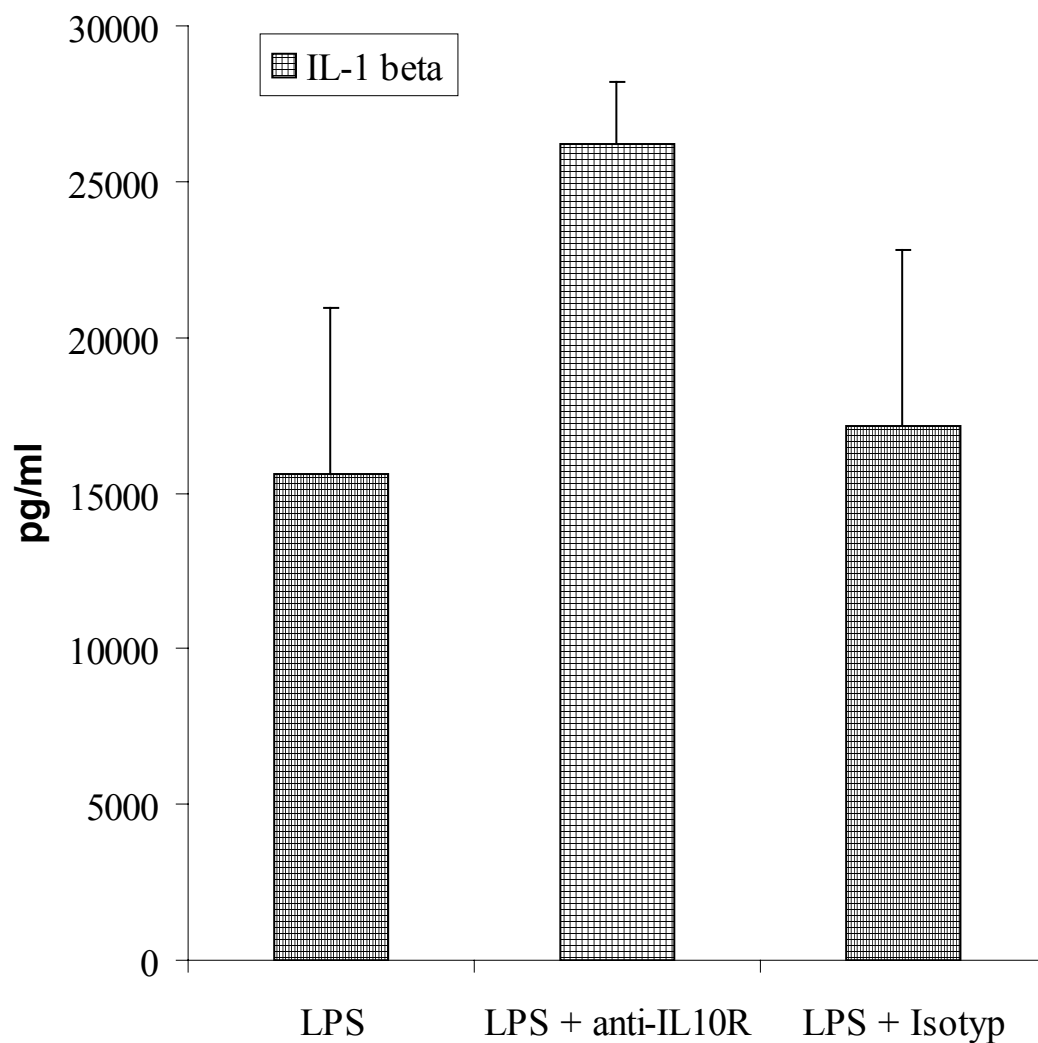


Abbildung 2c:

Effekt von endogenem IL-10 auf die IL-1 beta Sekretion in gereinigten, LPS stimulierten Monozyten. Monozyten wurden isoliert wie im Methodenteil beschrieben und dann 24 Stunden mit Medium, LPS, LPS+anti-IL-10R oder LPS+Isotyp Kontrolle stimuliert. Die IL-1 beta Konzentration wurde in zellfreien Überständen mittels ELISA gemessen. (Abgebildet sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten.)

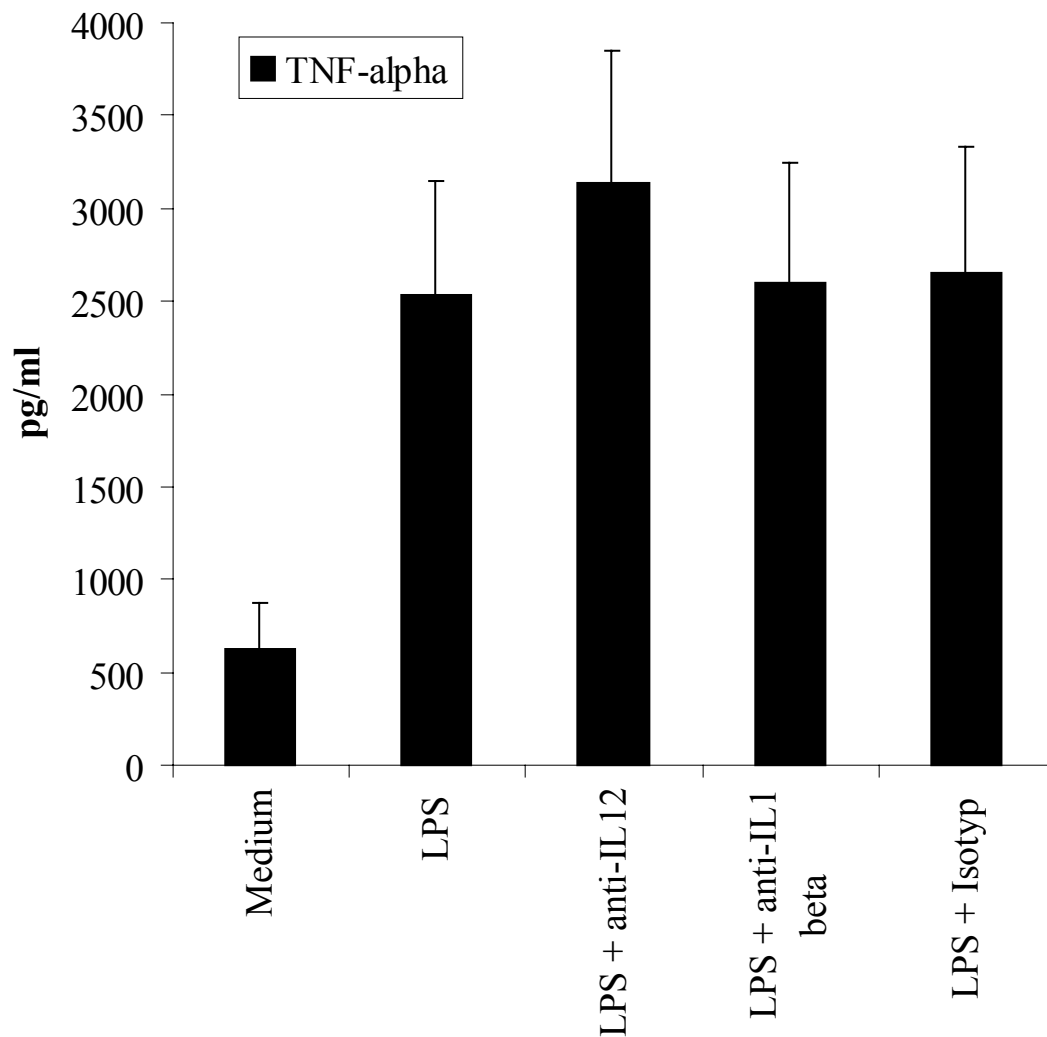


Abbildung 3a:

Bedeutung von IL-1 beta und IL-12 für die LPS induzierte TNF-alpha Produktion.

Monozyten wurden wie beschrieben isoliert und mit Medium, LPS, LPS+anti-IL-12, LPS+anti-IL-1 beta oder LPS+Isotyp Kontrolle 24 Stunden stimuliert. Die TNF-alpha Konzentration wurde aus den zellfreien Überständen mittels ELISA gemessen. (Abgebildet sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von 4 unabhängigen Experimenten.)

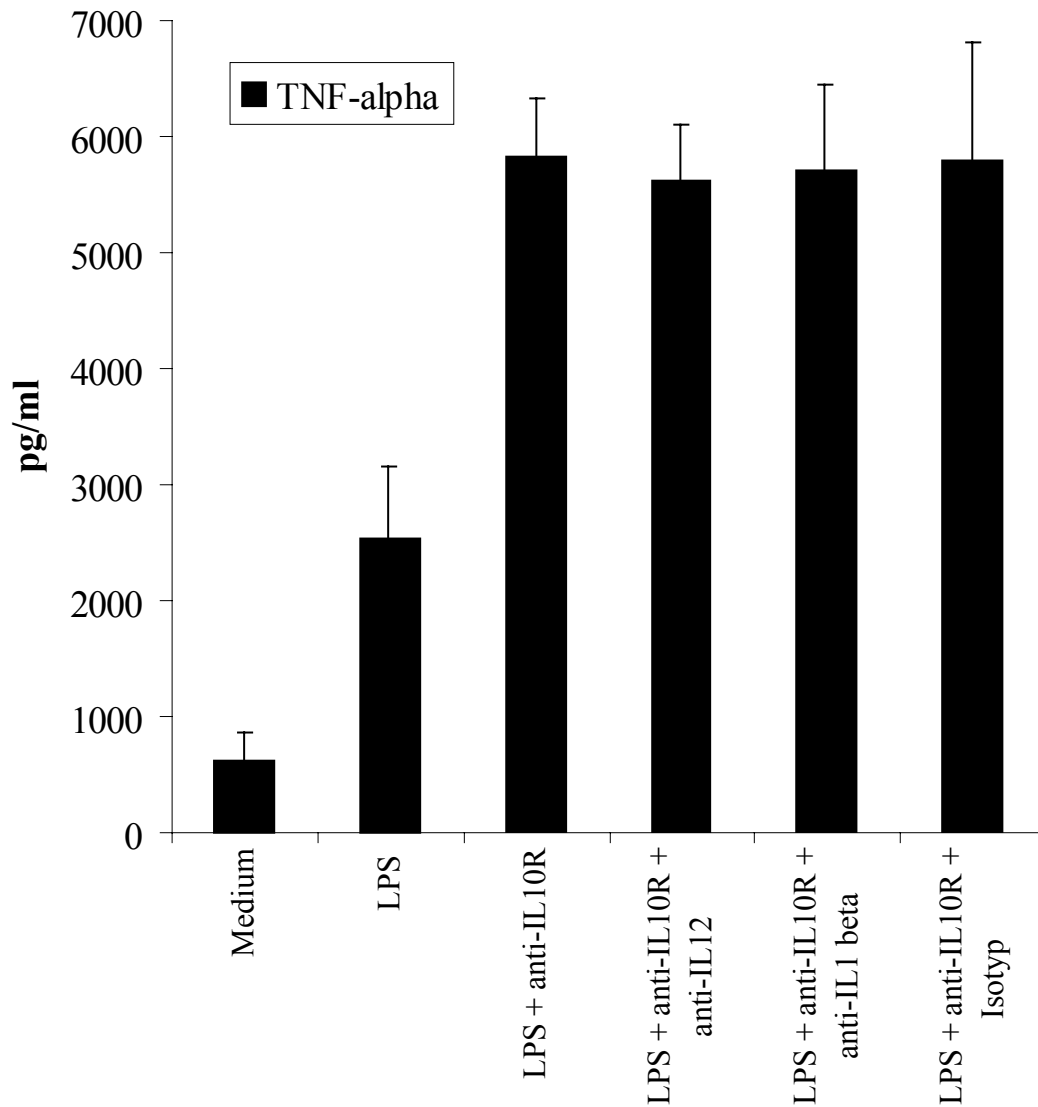


Abbildung 3b:

Mechanismus der durch endogenes IL-10 vermittelten Inhibition der LPS induzierten TNF-alpha Produktion.

Monozyten wurden wie beschrieben isoliert und mit Medium, LPS, LPS+anti-IL-10R allein oder in Kombination mit anti-IL-12, anti-IL-1 beta oder Isotyp Kontrolle 24 Stunden stimuliert. Die TNF-alpha Konzentration wurde aus den zellfreien Überständen mittels ELISA gemessen. (Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 4 unabhängigen Experimenten.)

4. Diskussion

4.1. Isolation hochreiner Monozyten

Wie im Methodenteil ausführlich beschrieben, wurde zur Isolation von Monozyten deren Adhärenzfähigkeit an glatte Oberflächen genutzt. Nach Inkubation mononukleärer Zellen in teflonbeschichteten Schalen wurden die nicht adhärennten Zellen mit PBS von der Schalenoberfläche heruntergespült und auf diese Weise von den adhärennten Monozyten separiert. Die adhärennten Monozyten wurden daraufhin 1 Stunde auf Eis inkubiert und anschließend mit eiskaltem PBS von ihrer Oberfläche abgelöst. Mittels dieser Methode konnten regelmäßig Monozyten mit einer Viabilität von $\geq 95\%$ und einer Reinheit von $90\% \pm 2,68$ gewonnen werden. Darüberhinaus befanden sich die Monozyten in einem nicht-aktivierten Zustand und waren in ausreichender Zahl in Suspension verfügbar.

In der Literatur sind verschiedene Techniken zur Isolation von gereinigten Monozyten beschrieben. Durch die Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll[®] werden die Monozyten aufgrund ihrer spezifischen Dichte durch eine Trennflüssigkeit in einem Zentrifugationsvorgang von den anderen Leukozyten separiert und können je nach Protokoll in einer Reinheit zwischen 80 und 90% gewonnen werden (1,2).

An Antikörper gebundene magnetische Microbeads ermöglichen eine sowohl positive als auch negative Selektionierung von Monozyten. Dabei werden zur positiven Selektionierung anti-CD14 Antikörper verwendet, die bei Durchfluß durch ein magnetisches System, die

CD14-positiven Monozyten zurückhalten und so deren Gewinnung ermöglichen. Bei der negativen Selektionierung werden Antikörper mit spezifischer Bindung an alle nicht-monozytären Zellen verwendet und gereinigte Monozyten nach Durchfluß durch das magnetische System gewonnen. Ein Nachteil der positiven Selektionierung ist die Aktivierung der Monozyten durch Antikörperbindung an den LPS-Rezeptor, was sie ungeeignet für Zytokinstimulationen in Zellkulturen werden läßt. Mit Hilfe der Microbeads erreicht man Reinheiten des isolierten Monozyten-Anteils von > 95 % (3,4,5).

Ebenfalls beschrieben sind Monozyten-Isolationen mit zentrifugaler Elutriation (6) und Nutzung der Adhärenzfähigkeit von Monozyten an Plastik (7,8,9), wodurch Reinheitsgrade von > 90 % erreicht wurden. Schließlich besteht die Möglichkeit der Zellseparation mit durchfluß-zytometrischen Methoden an einem fluoreszenz-aktivierten Zellsorter (FACS), durch welchen Zellen nach ihren Oberflächen-Antigenen sortiert und separiert werden können (10). Die Methode erlaubt die Isolation von nahezu 100 % reinen Monozyten, die jedoch durch die an den LPS Rezeptor gebundene fluoreszierende Antikörper zu einer Aktivierung der Monozyten führt.

Aufgrund der Monozyten-Aktivierung kamen sowohl die magnetischen Microbeads also auch die FACS Methode zur Gewinnung von gereinigten Monozyten nicht in Betracht, da für die Stimulationsversuche mit Zytokinen nicht-aktivierte Monozyten benötigt wurden. Die Dichte-gradientenzentrifugation mit Percoll[®] erwies sich als zu zeitaufwendig und erbrachte keine befriedigenden Reinheitsgrade. Daher wurde die Adhärenzfähigkeit der Monozyten zur Isolation genutzt und die in der Literatur beschriebenen Methoden wie bereits beschrieben modifiziert.

Der Nachteil der angewendeten Adhärenz-Methode liegt in der aufwendigen Loslösung der adhärenzten Monozyten von ihrer Unterlage. In der Literatur sind verschiedene Möglichkeiten der Ablösung erläutert. So beschreibt Nielsen (61) die Verwendung von Lidocain, Trypsin, Kälte von 4 °C und EDTA zu Ablösung von Monozyten von Plastikoberflächen. Weder EDTA, Trypsin noch Kälte führten in mehreren Versuchen zu einer hinreichenden Ablösung der Monozyten von den teflonbeschichteten Unterlagen. Darüberhinaus führt Trypsin aufgrund seiner enzymatischen Aktivität zu einer Beseitigung aller Zelloberflächenmarker und macht dadurch die Zellen für eine FACS-Analyse unbrauchbar. Unter dem Durchlichtmikroskop stellten sich Monozyten im adhärenzten Zustand unregelmäßig abgeflacht und über die Adhärenzfläche ausgebreitet dar. Erst durch den Kältereiz nach Inkubation auf Eis kam es zu einer Umkehr der Adhärenz, die man mikroskopisch als Abkuglung der Monozyten beobachten konnte. Trotz der verringerten Kontaktfläche, die durch diesen Abkuglungsvorgang erreicht wurde, befanden sich die Monozyten immer noch auf ihrer Unterlage befestigt und mußten nun mit PBS und einer 1000 µl Pipette kräftig von der Kulturplatte heruntergespült werden. Die Kombination von Kälte und aktiver Loslösung der Monozyten ermöglichte die Gewinnung von Monozyten in Suspension. Die spezielle Wahl der teflonbeschichteten Petripermschalen als Adhärenzoberfläche lag in der erleichterten Zellpreparation begründet. An Plastik adhärenzte Monozyten sind deutlich schwerer und aufgrund ihrer stärkeren Adhärenz unter einem höheren Zellverlust von ihrer Unterlage abzulösen. Zudem befinden sie sich in einem aktivierten Zustand.

Von besonderer Bedeutung für die angewendete Methode ist die Beschichtung der Kulturschalen mit autologem Serum, um eine Adhärenz der Monozyten überhaupt erst zu ermöglichen. Weder an unbehandelten noch an mit fötalem Kälberserum (FCS) inkubierten

Kulturschalen konnte eine Monozyten-Adhärenz beobachtet werden. In der Literatur ist gegensätzlich dazu die Adhärenz von Monozyten an unpreparierte Plastikunterlagen beschrieben (7,8,9). Nielsen beschreibt eine vermehrte Monozytengewinnung durch Vorbehandlung von Plastikoberflächen mit FCS (61). Vermutlich liegt diese Differenz an der spezifischen Eigenheit der Teflonbeschichtung der verwendeten Petriperm Schalen.

4.2. Regulation der LPS induzierten TNF-alpha Produktion in gereinigten Monozyten

Körholz et al. beschreiben, daß in IL-2 stimulierten T-Zellen IL-10 eine Suppression der TNF-alpha Produktion verursacht. Dies geschieht nicht mittels einer direkten Hemmung, sondern wird durch die Herabsetzung der IL-12 Produktion erreicht (49).

Der supprimierende Effekt von IL-10 auf die TNF-alpha Produktion wurde auch bei Monozyten bereits beschrieben (50,51,52,53), jedoch ist unklar, ob diesem Hemmungsprozeß ein vergleichbarer Mechanismus wie in T-Zellen zugrunde liegt. Darüberhinaus beschrieben Panzer et al. (54), daß IL-1 beta in mit murinen Antigenen stimulierten T-Zellen die TNF-alpha Produktion induziert und gleichermaßen TNF-alpha die Bildung von IL-1 beta mRNA induziert und verstärkt. Daraus ergaben sich die Fragen, ob IL-12 oder IL-1 beta für die LPS induzierte TNF-alpha Produktion und damit möglicherweise auch für die IL-10 gesteuerte Suppression von TNF-alpha in Monozyten beteiligt sind.

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß weder IL-12 noch IL-1 beta Einfluß auf die LPS induzierte TNF-alpha Produktion besitzen. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß IL-12

und IL-1 beta auch keine Rolle für die IL-10 modulierte Suppression der TNF-alpha Produktion spielen. Da diese Fragestellungen noch nicht untersucht wurden, finden sich auch in der Literatur keine vergleichbaren oder gegensätzlichen Resultate.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß endogenes IL-10 die Produktion von TNF-alpha hemmt. Dieser supprimierende Effekt von IL-10 wird auch von der Kinetik der TNF-alpha und IL-10 Produktion nach Stimulation mit LPS reflektiert. Das Maximum der TNF-alpha Produktion zeigt sich nach 6-12 Stunden, wohingegen die IL-10 Produktion verzögert nach 24 Stunden ihr Maximum erreicht. In Gegenwart von IL-10 war die TNF-alpha Produktion deutlich vermindert. Andere Autoren beschreiben gleichermaßen eine zeitlich versetzte Produktion von TNF-alpha und IL-10 nach LPS Stimulation in ähnlichen Zeitabständen (62,63).

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Wanidworanum et al. (57), wonach TNF-alpha die Synthese von IL-10 in Monozyten induziert, lassen die Resultate darauf schließen, daß endogenes IL-10 die LPS aktivierte TNF-alpha Sekretion in Monozyten über einen direkten negativen Feed-back Mechanismus reguliert, an welchem weder IL-12 noch IL-1 beta beteiligt sind. Ein solcher Mechanismus ist von biologischer Bedeutung, da es ohne eine Suppression der TNF-alpha Produktion durch IL-10 schnell zu einer schädlichen Anreicherung des TNF-alpha käme. So beschrieben Gerad et al., daß es in Mäusen durch die Applikation von Antikörpern gegen IL-10 nach einer Stimulation mit LPS zu einer signifikant vermehrten Entwicklung eines letalen Endotoxinschocks gekommen ist (60).

Wie von Körholz et al. beschrieben (49), kann der suppressive Effekt von IL-10 auf die TNF-alpha Produktion in T-Zellen aufgrund der Beteiligung von IL-12 an der IL-10 modulierten

Suppression von TNF-alpha durch eine Zugabe von IL-12 aufgehoben werden. Hier konnte nun gezeigt werden, daß IL-10 in Monozyten über einen anderen, IL-12 unabhängigen Mechanismus wirkt. So erscheint es wichtig, nicht nur die Vernetzung und Wechselwirkungen der einzelnen Zytokine, sondern auch die unterschiedlichen Wirkungen der Zytokine auf die verschiedenen Zelltypen zu untersuchen und zu berücksichtigen. Von Bedeutung ist dies z.B. für der Entwicklung von Immuntherapien, da sich abhängig vom Zell- oder Gewebetyp unterschiedliche Effekte von Zytokintherapeutika ergeben können.

Gleichermaßen bedeutsam ist die unterschiedliche Modulation der TNF-alpha Produktion für die Therapie von septischen Patienten, die sich in einer sogenannten Immunparalyse befinden. Dieser Begriff wurde von Volk et al. (58,59) eingeführt und bezeichnet die hypoinflammatorische Phase einer Sepsis. Nach Volk ist die Sepsis durch einen biphasischen Verlauf charakterisiert. Initial besteht eine hyperinflammatorische Immunantwort, in der TNF-alpha synergistisch mit anderen proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6 u.a., produziert wird. Für die sich anschließende hypoinflammatorische Phase ist der global immunsuppressive Effekt von IL-10 verantwortlich. IL-10 wird über Rückkopplungsschleifen zeitlich verzögert produziert und erfüllt die Funktion eines Gegenregulators der proinflammatorischen Immunantwort. Allerdings führt bei einer Subpopulation septischer Patienten eine verlängerte oder gesteigerte IL-10 Wirkung zu einer "endogenen" Immundefizienz. Durch den supprimierenden Effekt von IL-10 kommt es zu einer verminderten bis fehlenden Produktion proinflammatorischer Zytokine. Hierdurch wird die Anfälligkeit des septischen Patienten für opportunistische Infektionen wesentlich erhöht, die in vielen Fällen sogar zum Tode führt.

Eine Erklärung für diese Abwehrschwäche könnte darin bestehen, daß TNF-alpha eine wesentliche Bedeutung für eine Infektabwehr durch seine Wirkungen auf verschiedenste Zielzellen besitzt. So steigern neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten und Monozyten unter TNF-alpha Einfluß ihre Phagozytosefähigkeit und ihre antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität, und bei Reduktion von TNF-alpha kommt es zu einer erheblichen Schwächung der Immunabwehr. Der therapeutische Ansatz besteht nun in dem Versuch, diese Immunparalyse durch Zytokinwirkung auf das IL-10 aufzuheben. Die Ergebnisse lassen vermuten, daß zwar die durch IL-10 supprimierte TNF-alpha Produktion in T-Zellen durch eine IL-12 Zugabe aufgehoben werden kann, jedoch in Monozyten, aufgrund der IL-12 unabhängigen Regulation von TNF-alpha, es zu keiner Steigerung der TNF-alpha Produktion kommen wird. Im Gegensatz dazu führt eine Zugabe von Interferon-gamma durch seine Hemmung der IL-10 Produktion in Monozyten und durch seinen induzierenden Effekt auf die IL-12 Produktion in T-Zellen in beiden Zellpopulationen zu einer Überwindung der IL-10 gesteuerten Suppression der TNF-alpha Produktion und damit auch zu einer möglichen Aufhebung des immunparalytischen Zustandes.

Somit tragen diese Ergebnisse zum Verständnis der Wirksamkeit einer Interferon-gamma Therapie zur Überwindung der Immunparalyse im septischen Schock bei, wie sie von Döcke et al. beschrieben wurde.

5. Literatur

1. H. Pertoft, A. Johnsson, B. Wärmegard, R. Seljelid: Separation of human monocytes on density gradients of Percoll. J. Immunol. Meth. 33:221-229 (1980)
2. A.J. Fluks: Three-step isolation of human blood monocytes using discontinuous density gradients of Percoll. J. Immunol. Meth. 41:225-233 (1981)
3. W. Pickl, O. Majdic, P. Kohl, J. Stöckl, E. Riedl, C. Scheinecker, C. Bello-Fernandez, W. Knapp: Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14⁺ peripheral blood monocytes. J. Immunol. 157:3850-3859 (1996)
4. F. Sallusto, A. Lanzavecchia: Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor-alpha. J. Exp. Med. 179:1109-1118 (1994)
5. H. Strobl, E. Riedl, C. Scheinecker, C. Bello-Fernandez, W.F. Pickl, K. Rappersberger, O. Majdic, W. Knapp: TGF-beta 1 promotes in vitro development of dendritic cells from CD34⁺ hemopoietic progenitors. J. Immunol. 157:1499-1507 (1996)
6. O. Bakouche, J.L. Moreau, L.B. Lachman: Secretion of IL-1: Role of protein kinase C. J. Immunol. 148:84-91 (1992)
7. E. Kleinermann, L.B. Lachman, R.D. Knowles, R. Snyderman, G.J. Cianciolo: A synthetic peptide homologous to the envelope proteins of retroviruses inhibits monocytes-mediated killing by activating Interleukin 1. J. Immunol. 139:239-2337 (1987)
8. F.H. Valone, L.B. Epstein: Biphasic platelet-activating factor synthesis by human monocytes stimulated with IL-1 beta, tumor necrosis factor, or INF-gamma. J. Immunol. 141:3945-3950 (1988)

9. L. Leeb, T. Crusberg, N. Fortier, L.M. Synder: Evaluation of methods using adherence to substrate and density gradient for the isolation of human monocytes. J. Immunol. Methods 58:309-321 (1983)
10. T.G. Pretlow, T.P. Pretlow: Cell separation: methods and selected applications. Academic Press, Cambridge, Mass. (1987)
11. M. Kriegler, C. Perez, K. DeFay, I. Albert, S.D. Lu: A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: Ramifications for the complex physiology of TNF. Cell, 53:45-53 (1988)
12. A.J.H. Gearing, P. Beckett, M. Christodoulou, M. Churchill, J. Clements, A.H. Davidson, A.H. Drummond, W.A. Galloway, R. Gilbert, J.L. Gordon, T.M. Leber, M. Mangan, K. Miller, P. Nayee, K. Owen, S. Patel, W. Thomas, G. Wells, L.M. Wood, K. Woolley: Processing of tumor necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. Nature, 370:555-557 (1994)
13. B. Beutler, V. Tkacenko, I. Milsark, N. Krochin, A. Cerami: Effect of gamma-interferon on cachectin expression by mononuclear phagocytes. J. Exp. Med. 164:1791-1796 (1986)
14. D.M. Stern, P.P. Nawroth: Modulation of endothelial hemostatic properties by tumor necrosis factor. J. Exp. Med. 163:1363-75 (1986)
15. P. Nawroth, I. Bank, D. Handley, J. Cassimeris, L. Chess, D. Stern: Tumor necrosis factor / cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin 1. J. Exp. Med. 163:1363-1375 (1986)
16. P. Libby, J.M. Ordovas, K. Auger, A.H. Robbins, L.K. Birinyi, C.A. Dinarello: Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin 1 gene expression in adult human vascular endothelial cells. Am. J. Pathol. 124:179-85 (1996)
17. N. Sato, T. Goto, K. Haranaka, N. Satomi, H. Nariuchi, Y. Mano-Hirano, Y. Sawasaki: Actions of tumor necrosis factor on cultured vascular endothelial cells: morphologic modulation, growth inhibition, and cytotoxicity. J. Natl. Cancer Inst. 76:1113-1121 (1986)

18. L. Schweigerer, B. Malerstein, D. Gospodarowicz: Tumor necrosis factor inhibits the proliferation of cultured capillary endothelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 143:997-1004 (1987)
19. A.H. Stolpen, E.C. Guinan, W. Fiers, J.S. Pober: Recombinant tumor necrosis factor and immune interferon act singly and in combination to reorganize human vascular endothelial cell monolayers. Am. J. Pathol. 123:16-24 (1986)
20. W.W. Pingleton, J.J. Coalson, C.A. Guenter: Significance of leukocytes in endotoxic shock. Exp. Mol. Pathol. 22:183-194 (1975)
21. K.L. Brigham, B. Meyrick: Interactions of granulocytes with the lungs. Circ. Res. 54:623-635 (1984)
22. M.R. Shalaby, B.B. Aggarwal, E. Rinderknecht, L.P. Svedersky, B.S. Finkle, M.A. Palladino: Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon gamma and tumor necrosis factors. J Immunol. 135:2069-2073 (1985)
23. M. Tsujimoto, S. Yokota, J. Vilcek, G. Weissmann: Tumor necrosis factor provokes superoxide anion generation from neutrophils. Biochem. Biophys. Res. Commun. 137:1094-1100 (1986)
24. S.J. Klebanoff, M.A. Vadas, J.M. Harlan, L.H. Sparks, J.R. Agosti, A.M. Waltersdorff: Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. J. Immunol. 136:4220-4225 (1986)
25. J.Y. Djeu, D.K. Blanchard, D. Halkias, H. Friedman: Growth inhibition of candida albicans by human polymorphonuclear neutrophils: activation by interferon gamma and tumor necrosis factor. J. Immunol. 137:2980-2984 (1986)
26. D.S. Silberstein, J.R. David: Tumor necrosis factor enhances eosinophil toxicity to Schistosoma mansoni larvae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 1055-1059 (1986)
27. D.N. Mannel, R.N. Moore, S.E. Merhagen: Macrophages as a source of tumoricidal activity. Infect. Immun. 30:523-30 (1980)

28. N. Satomi, K. Haranaka, O. Kunii: Research on the production site of tumor necrosis factor. Jpn. J. Exp. Med 51:317-322 (1981)
29. N. Matthews: Production of an anti-tumor cytotoxin by human monocytes. Immunology 44:135-142 (1981)
30. W.J. Ming, L. Bersani, A. Mantovani: Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. J. Immunol. 138:1469-1474 (1987)
31. R. Munker, J. Gassin, M. Ogawa, H.P. Koeffler: Recombinant human TNF induces production of granulocyte-monocytes colony stimulating factor. Nature 323: 79-82 (1986)
32. P.R. Bachwich, S.W. Chensue, J.W. Larrick, S.L. Kunkel: Tumor necrosis factor stimulates interleukin-1 and prostaglandin E2 production in resting macrophages. Biochem. Biophys. Res. Commun. 136:94-101 (1986)
33. P. Scheurich, B. Thoma, U. Ucer, K. Pfitzmaier: Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor alpha: induction of TNF-receptors on human T-cells and TNF-alpha-mediated enhancement of T-cell response. J. Immunol. 138:1786-1790 (1987)
34. T.H. Plela, J.H. Korn: Lymphocyte-fibroblast adhesion induced by interferon gamma and tumor necrosis factor. Arthritis Rheum. 30:S90 (1987)
35. H. Kashiwa, S.C. Wright, B. Bonavida: Regulation of B-cell maturation and differentiation. Suppression of pokeweed mitgen induced B-cell differentiation by tumor necrosis factor. J. Immunol. 138:1383-1390 (1987)
36. J. Saklatvala: Tumor necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits sythesis of proteoglykan in cartilage. Nature 319:547-549 (1986)
37. D.R. Bertolini, G. Nedwin, T. Bringman, D. Smith, G.R. Mundy: Stimulation of bone formation in vitro by human tumor necrosis factor. Nature 319:516-518 (1986)

38. K.J. Tracey, B. Beutler, S.F. Lowry, J. Merryweather, S. Wolpe, I.W. Milsark, R.J. Hariri, T.J. Fahey, A. Zentella, J.D. Albert, G.T. Shires, A. Cerami: Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. Science 234:470-474 (1986)
39. K.J. Tracey, S.F. Lowry, T.J. Fahey, J.D. Albert, Y. Fong, D. Hesse, B. Beutler, K.R. Manogue, S. Calvano, H. Wei, A. Cerami, G.T. Shires: Cachectin / Tumor necrosis factor induces lethal shock and stress hormone responses in the dog. Surg. Gynecol. Obstet. 164:415-422 (1987)
40. H.V. Gaskill: Continuous infusion of tumor necrosis factor: Mechanisms of toxicity in the rat. J. Surg. Res. 44:664-671 (1988)
41. K.J. Tracey, H. Wei, K.R. Manogue, Y. Fong, D.G. Hesse, H.T. N.T. Nguyen, G.C. Kuo, B. Beutler, R.S. Cotran, A. Cerami, S.F. Lowry: Cachectin / Tumor necrosis factor induces cachexia, anemia and inflammation. J. Exp. Med. 167: 1211-1227 (1988)
42. B. Beutler, I.W. Milsark, A. Cerami: Passive immunization against cachectin / tumor necrosis factor protects mice from the lethal effect of endotoxin. Science 229: 869-871 (1985)
43. A. Oliff, D. Defeo-Jones, M. Boyer, D. Martinez, D. Kiefer, G. Vuocolo, A. Wolfe, S.H. Socher: Tumors secreting human TNF / cachectin induce cachexia in mice. Cell 50: 555-563 (1987)
44. P. Scuderi, K.S. Lam, K.J. Ryan, E. Petersen, S.E. Salmon, K.E. Sterling, P.R. Finley, C.G. Ray, D.J. Slymen: Raised serum levels of tumor necrosis factor in parasitic infections. Lancet 2:1364-1365 (1986)
45. J. Lahdevirta, C.P.J. Maury, A-M. Teppo, H. Repo: Raised circulating cachectin / tumor necrosis factor in patients with acquired immuno deficiency syndrome. Am. J. Med. 86: 289-291 (1988)
46. A. Waage, A. Halstensen, T. Espevik: Association between tumor necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. Lancet 1(8529):355-357 (1987)

47. D.K. Blanchard, J.Y. Djeu, T.W. Klein, H. Friedman, W.E. Stewart: The induction of tumor necrosis factor in murine lung tissue during infection with Legionella pneumophila: A potential protective role of TNF. Lymphokine Res. 6: 1421 (Abstr.) (1987)
48. F. Balkwill, F. Burke, D. Talbot, J. Tavernier, R. Osborne, S. Naylor, H. Durbin, W. Fiers: Evidence for tumor necrosis factor / cachectin production in cancer. Lancet 2(8570): 1229-1232 (1987)
49. D. Körholz, U. Banning, H. Bönig, M. Grewe, M. Schneider, C. Mauz-Körholz, A. Klein-Vehne, J. Krutmann, S. Burdach: The role of interleukin 10 in interleukin 15 mediated T-cell response. Blood 90:4513 (1997)
50. I.P. Oswald, T.A. Wynn, A. Sher, S.L. James: Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of TNF-alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma induced activation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8676-8680 (1992)
51. E. Lubberts, L.A. Joosten, M.M. Helsen, W.B. van den Berg: Regulatory role of interleukin 10 in joint inflammation and cartilage destruction in murine streptococcal cell wall arthritis. Cytokine 10:361-369 (1998)
52. M.J. Thomassen, L.T. Divis, C.J. Fisher: Regulation of human alveolar macrophage inflammatory cytokine production by interleukin 10. Clin. Immunol. Immunopathol. 80:321-324 (1996)
53. D.A. Joyce, J.H. Steer: IL-4, IL-10 and IFN-gamma have distinct, but interacting, effects on differentiation-induced changes in TNF-alpha and TNF receptor release by cultured human monocytes. Cytokine 8:49-57 (1996)
54. S. Panzer, M. Madden, K. Matsuki: Interaction of IL-1 beta, IL-6 and tumor necrosis factor alpha in human T-cells activated by murine antigens. Clin. Exp. Immunol. 93:471-478 (1993)
55. H.M. Shapiro: Practical Flow Cytometry, Liss. Inc., New York (1988)

56. D. Gemsa, J. Kalden, K. Resch: Immunologie, Grundlagen-Klinik-Praxis Thieme, Stuttgart 1996
57. C. Wanidworanum, W. Strober: Predominant role of tumor necrosis factor-alpha in human monocyte IL-10 synthesis. J. Immunol. 151:6853-6561 (1997)
58. H.D. Volk, P. Reinke, D. Krausch, H. Zuckermann, A. Asadullah, J.M. Müller, W.D. Döcke, W.J. Kox: Monocyte deactivation-rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. Intensive Care Med. 22:474-481 (1996)
59. W.D. Döcke, F. Randow, U. Syrbe, D. Krausch, K. Asadullah, P. Reinke, H.D. Volk, W. Kox: Monocyte deactivation in septic patients: Restoration by IFN-gamma treatment. Nature Medicine 3:678-681 (1997)
60. C. Gerard, C. Bruyns, A. Marchant, D. Abramowicz, P. Vandenabeele, A. Delvaux, W. Fiers, M. Goldman, T. Velu: Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. J. Exp. Med. 117:547 -550 (1993)
61. H. Nielsen: Isolation and functional activity of human blood monocytes after adherence to plastic surfaces: comparison of different detachment methods. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 95:81-84 (1987)
62. A. Foca, M.C. Berlinghieri, G.S. Barreca, P.M. Placanica, R. Diana, M.C. Liberto, G. Matera: Kinetics of IL-8, MIP-1 alpha, TNF-alpha, IL-1 beta, IL-1ra and IL10 in human whole blood samples triggered by smooth and rough LPS. New Microbiol. 21:123-130 (1998)
63. M. Ho, T. Schollaardt, S. Snape, S. Looraeesuwan, P. Suntharasamai, N.J. White: Endogenous Interleukin 10 modulates proinflammatory responses in Plasmodium falciparum malaria. J. Infect. Dis. 178:520-525 (1998)

6. Lebenslauf

Geboren: 4. März 1974 in Hilden

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: ledig

Konfession: evangelisch

Schullaufbahn: Marien-Gymnasium, Opladen

Abitur im Mai 1993

Zivildienst: Juli 1993 - September 1994; Ausbildung zum Rettungssanitäter

Universitärer Bildungsgang: Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Oktober 1994

Ärztliche Vorpüfung August 1996

Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung August 1997

8-wöchige Famulatur in der orthopädischen Chirurgie im Saint Francis Hospital, San Francisco, CA, USA
August-Oktober 1998

Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung August 1999

Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung Oktober 2000

Berufstätigkeit: Beschäftigung als Arzt im Praktikum in der Medizinischen Klinik III des Klinikum Wuppertal seit November 2000

Düsseldorf, im November 2000

7. Zusammenfassung

Regulation der LPS induzierten TNF-alpha Produktion in gereinigten Monozyten

Dong-In Shin

In T-Zellen erfolgt die Interleukin (IL-) 10 modulierte Suppression der TNF-alpha Produktion durch eine Hemmung der Produktion von Interleukin 12. Auch in LPS stimulierten Monozyten wird die TNF-alpha Produktion durch Interleukin 10 supprimiert. Die vorliegende Arbeit untersucht, ob die Suppression der TNF-alpha Produktion durch Interleukin 10 in Monozyten ebenfalls in Abhängigkeit von sekundären Zytokinproduktion abläuft. Hierzu wurden mittels Nutzung der Adhärenzfähigkeit an teflonbeschichtete Schalen nicht-aktivierte Monozyten aus Buffycoat Blut in einer Reinheit von $90 \% \pm 2,68$ isoliert.

Die Untersuchungen an gereinigten Monozyten zeigen:

1. Nach Stimulation mit LPS erreicht die TNF-alpha Produktion nach 6-12 Stunden, die von IL-10 erst nach 24 Stunden ihr Maximum.
2. Eine Blockade des IL-10 Rezeptors durch einen monoklonalen Antikörper führt zu einer Steigerung der Produktion von TNF-alpha, IL-12 und IL-1 beta.
3. Die supprimierende Wirkung von endogenem IL-10 auf die TNF-alpha Produktion ist unabhängig von der endogenen IL-12 und IL-1 beta Produktion.

Diese Ergebnisse haben große Bedeutung sowohl für die Entwicklung neuer Immuntherapien zur Behandlung des septischen Schocks als auch für die Tumorthherapie, da sie belegen, daß neben den Wechselwirkungen der Zytokine untereinander auch die unterschiedlichen Wirkungen auf verschiedene Zelltypen und Gewebe berücksichtigt werden müssen.

Düsseldorf, im März 1999

Priv.-Doz. Dr. med. D. Körholz