

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
Institut für Physiologie, Biochemie und Hygiene der Tiere
Abteilung Anatomie und Physiologie
&
Arbeitsgruppe Immunbiologie und Angewandte Immunologie

**Durchflußzytometrische Detektion von Adrenocorticotropem
Hormon in humanen Leukozytenpopulationen unter
leistungsphysiologischen Kulturbedingungen**

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Grades

Doktor der Ernährungs- und Haushaltswissenschaft
(Dr.oec.troph.)

der
Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt am 17. September 2002

von
Karl Peter Linscheid
aus Bonn

Referent: Priv.-Doz. Dr. Roland Goerlich

Koreferent: Prof. Dr. Heinrich Enbergs

Vorsitzende des
Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Heide Schnabl

Tag der mündlichen Prüfung: 15. November 2002

Gedruckt bei: Druckerei Eberwein, Bonn-Bad Godesberg

Kurzfassung

In Analogie zur systemischen Streßreaktion beschreibt die zelluläre Leistungsphysiologie Anpassungsmechanismen gegenüber belastenden Umweltfaktoren im mikroskopischen Maßstab. Neuropeptide aus Proopiomelanocortin, die in lokalen Leukozyten-Netzwerken synthetisiert werden und Signale übermitteln, bilden die Achse Hypothalamus-Hypophyse-Nebenniere innerhalb dieser zellulären Mikromilieus ab. In den hier beschriebenen Untersuchungen wurden kommerziell erhältliche monoklonale Antikörper und sekundäre Immunfluoreszenz für die spezifische durchflußzytometrische Detektion von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) in stimulierten humanen Leukozyten eingesetzt. Die Einflüsse einschlägiger Induktoren auf die Höhe der ACTH-Expression konnten mit Hilfe der mittleren relativen Fluoreszenzintensität bewertet werden. Durchflußzytometrische Charakteristika der zellulären Mikromorphologie bestätigten in Kombination mit einer Immunphänotypisierung, daß humane Lymphozyten und Monozyten des peripheren Blutes in Anpassungsreaktionen innerhalb leistungsphysiologischer Zellkulturmodelle eingebunden sind.

Aus den Untersuchungen ergaben sich Hinweise auf Optimierungsstrategien für die Probengewinnung, die Zellkultur und die leistungsphysiologische Leukozytenstimulation. Die Methodik kann in Richtung auf quantitative Studien mit direkter Immunfluoreszenz fortentwickelt werden und grundlegende Beiträge zum Verständnis des Zusammenspiels von Hormonen, Cytokinen und anderen Signalmolekülen in der Regulation funktioneller zellbiologischer Prozesse, wie Proliferation, Apoptose, zellulärer und humoraler Abwehr, leisten. Anwendungsmöglichkeiten sind *in-vitro*- und *ex-vivo*-Studien zu protektiven Wirkungen bzw. dem gesundheitsbezogenen Risikopotential von bioaktiven Lebensmittelinhaltsstoffen und Supplementen sowie immuntoxikologische Untersuchungen von Kontaminanten und Rückständen.

Abstract

Modelling main aspects of the systemic stress reaction, cellular performance physiology describes coping with environmental challenge in microscale. Pro-opiomelanocortin-derived neuropeptides, synthesized and recognized in local leukocyte networks, project the hypothalamo-pituitary-adrenal axis into cellular micro-environments. In the present study, commercially available monoclonal antibodies and secondary immunofluorescence were used to flow cytometrically detect adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in stimulated human leukocytes. The effects of inducers, previously described in scientific literature, on the amount of ACTH synthesized was assessed by calculating the mean fluorescence intensity. Flow cytometric characteristics of cellular micromorphology in combination with immunophenotyping proved that human lymphocytes and monocytes from peripheral blood are involved in adaptive physiological reactions.

The results also helped to propose how to optimize blood sampling, cell culture and leukocyte stimulation. Direct fluorochrome labelling of antibodies may broaden this approach towards quantification. Thus, flow cytometry may further contribute substantially to understanding the interplay mediated by hormones, cytokines and other signal molecules in functional aspects, such as proliferation, apoptosis, cellular and humoral defense. *In vitro* and *ex vivo* studies on the health effects of food constituents, the beneficial and adverse potentials of bioactive compounds in food and supplements, or immunotoxicological investigations on contaminations and toxic residues are perspectives of application of the method.

Verzeichnis der Abkürzungen

® = Registered Trademark,
eingetragenes Warenzeichen

% = Prozent

+1 = N-terminale Aminosäure der
Primärstruktur bzw. erstes für
eine Peptidsequenz codieren-
des Basentriplett

°C = Grad Celsius

µL = Mikroliter

2D = zweidimensional

-3' = Terminationsrichtung der
codogenen DNA in bezug auf
die Transkription

5' = Initiationsrichtung der codogenen
DNA in bezug auf die
Transkription

-90 - +120 = DNA-Codon- bzw.
Aminosäure-Position in einer
Gen- bzw. Peptid-Sequenz

A = Adenin(base der DNA)

AAPH = 2,2'-Azobis-
(2-amidinopropan)-
dihydrochlorid

Ab = Antikörper

ACTH = Adrenocorticotropes Hormon,
Corticotropin

Ala = Alanin

alpha α = anti, Ligandenspezifität
gegen ...; α-... bzw. ...-α zur
Differenzierung bei Cytokinen,
Hormonen etc.

Arg = Arginin

ASCII = American Standard Code for
Information Interchange,
Computer-Standardzeichensatz

Asn = Asparagin

Asp = Asparaginsäure

Asx = Asparagin oder Asparaginsäure

AVP = Arginin-Vasopressin

B- in B-Lymphozyten = im
Knochenmark (Bone Marrow)
reifende Lymphozyten

BfA = Brefeldin A

BSA = bovines Serumalbumin,
Rinderserumalbumin

C = Cytosin(base der DNA),
Kohlenstoff

Ca = Calcium

CA = Kalifornien

cAMP = zyklisches
Adenosinmonophosphat

CD = Cluster of Differentiation =
systematisierte, mit
monoklonalen Antikörpern
bestimmbare
Zelldifferenzierungs-Antigene

CD...⁺ = positiv für CD...

cDNA = revers transkribierte, zur
mRNA komplementäre DNA

cGMP = zyklisches
Guanosinmonophosphat

Cl = Chlor, NaCl = Natriumchlorid

CLIP = Corticotropin-Like Intermediate
lobe Peptide = ACTH₁₈₋₃₉

cm = Zentimeter

ConA = Concanavalin A, Lektin aus
Canavalia ensiformis

-COOH = Carboxy-Terminus eines
Peptids

CPU = Central Processing Unit,
Computer-Zentraleinheit

Cr = Chrom, ⁵¹Cr = radioaktives Isotop,
Radiochrom

CRH = Corticotropin-Releasing-
Hormon, Corticoliberin = CRF
(Corticotropin Releasing Factor)

D.5B = DPBS mit 0,5 % FBS

DNA = Desoxyribonucleic Acid,
Desoxyribonucleinsäure

DNP = Dinitrophenol

DPBS = Dulbecco's Phosphate
Buffered Saline, Dulbeccos
phosphatgepufferte Salzlösung

EBV = Epstein-Barr-Virus

EDTA Ethylendiamintetraacetat

et al. = et alii, und Mitarbeiter

F(ab)₂ = Dimer zweier
antigenbindender Anteile eines
Immunglobulins, variable
Domänen

FACS = Fluorescence Activated Cell
Sorter, Markenname der
Becton-Dickinson-
Durchflußzytometer

FBS = fetales bovines Serum

FI = relative Fluoreszenzintensität

FITC = Fluorescein-isothiocyanat

FL-(1, 2 ... n) = Fluoreszenz (1, 2 ... n)

FSC = Foreward Scatter,
Vorwärtsstreulicht

G = Guanin(base der DNA)

Gln = Glutamin

Glu = Glutaminsäure

Glx = Glutamin oder Glutaminsäure

Gly = Glycin

h = Stunde(n), ...h= ...stündig

H = Wasserstoff, HCl = Hydrochlorid,
in wässriger Lösung: Salzsäure

His = Histidin

HIV = Human Immunodeficiency Virus,
humanes Immundefekt-Virus

HPA = (Achse) Hypothalamus-
Hypophyse-Nebenniere

HSP = Hitzeschockprotein(e)

html = Hypertext Markup Language,
Internet-Formularsprache

http = Hypertext Transmission
Protocol, Internet-
Übertragungsprotokoll

I = Iod, ¹²⁵I = Radioisotop, Radioiod

IFN = Interferon

Ig = Immunglobulin: IgA, IgD usw.

IL- = Interleukin: IL-1, IL-2 usw.

Ile = Isoleucin

iniect. = (Aqua ad) iniectabilia,
(Wasser für) Injektionszwecke

iNOS = induzierbare NO-Synthase

K = Kanal, Intensitätsklasse der
Strahlungsstärke; Kalium, KI =
Kaliumiodid

kappa κ = Kappa-Kette des
Immunglobulin-Moleküls

L = Liter

lambda λ = Wellenlänge
elektromagnetischer Strahlung

Leu = Leucin

LPH = lipotropes Hormon, Lipotropin

LPS = Lipopolysaccharid

Lys = Lysin

m = Meter

M = Mol pro Liter, mol/L

mAb = monoklonale(r) Antikörper

MB = Megabyte

Met = Methionin

MFI = mittlere relative
Fluoreszenzintensität

mg = Milligramm

min = Minute(n), ...min = minütig,
min⁻¹ = pro Minute

mL = Milliliter

mm = Millimeter

mM = Millimol pro Liter, mmol/L

Mon. = Monensin

MSH = Melanozytenstimulierendes
Hormon

MTP Mikroiterplatte

MTT = 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-
2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid

mu = murin, von der Maus

my μ... = mikro... = 10⁻⁶ (μg, μL, μM)

N = Stickstoff

Na = Natrium, NaI = Natriumiodid

NaN₃ = Natriumazid

NDV = Newcastle Disease Virus

NH₂- = Aminoterminus eines Peptids

nm = Nanometer

NO = Stickstoffoxid

O = Sauerstoff

OD = optische Dichte
OS = Operating System, Computer-Betriebssystem
p.a. = pro alysi, zur Analyse
PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cells = mononukleäre Leukozyten des peripheren Blutes
PBS = Phosphate Buffered Saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PC = Personal Computer
PE = Phycoerythrin
PFC = plaque forming cell (Test)
pH = pondus Hydrogenii, pH-Wert = negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Phe = Phenylalanin
PMT = Photomultiplier Tubes, Detektoren für die schwachen Signale aus dem Seitwärtsstreulicht
POMC = Proopimelanocortin
Pro = Prolin
Prod.-Nr. = Produktnummer
R = Rezeptor
R20B = RPMI-1640-Medium mit 20 % FBS
RAM = Random Access Memory, Computer-Arbeitsspeicher

rho ρ = spezifische Dichte
RPMI = Roswell Park Memorial Institute (-1640 Zellkulturmedium)
RT = Raumtemperatur
s = Sekunde, s^{-1} = pro Sekunde
S = Schwefel, ^{35}S = radioaktives Isotop, Radioschwefel
Ser = Serin
SRBC = sheep red blood cells, Schafserythrozyten
SSC = Side Scatter, Seitwärtsstreulicht
T = Thymin(base der DNA)
T- = T-Lymphozyten = im Thymus reifende Lymphozyten
T_{H1} = T-Helferzelle(n) vom Typ 1: Leitcytokine IL-2, IFN- γ
T_{H2} = T-Helferzelle(n) vom Typ 2: Leitcytokine IL-4, -5, -6, -10
Thr = Threonin
™ = Trade Mark, Warenzeichen
TNF = Tumornekrosefaktor
Trp = Tryptophan
Tyr = Tyrosin
UK = Vereinigtes Königreich
USA = Vereinigte Staaten von Amerika
Val = Valin
w/v = weight per volume, Masse pro Volumen
ZNS = Zentrales Nervensystem

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1: Leistungsphysiologische Indikatoren.....	14
Tab. 2: Aminosäuresequenz von POMC und seine Peptid-Produkte.....	16
Tab. 3: Opiomelanocortine.....	18
Tab. 4: Materialien für die Zellkultur mit mononukleären Leukozyten.....	32
Tab. 5: Herstellung von 1-mL-Proben aus Kulturmedien mit doppeltem Gehalt an Stimulatoren und aus Zellsuspension mit doppeltem Serumgehalt und doppelter Zelldichte.....	37
Tab. 6: Materialien für die Zellkultur mit komplettem Blutspendematernal.....	40
Tab. 7: Herstellung von 1-mL-Proben aus Kulturmedien ohne bzw. mit Stimulatoren und Vollblut.....	41
Tab. 8: Materialien für die Markierung und Detektion von ACTH und Immunphänotypen.....	42
Tab. 9: ACTH-Expression in unstimulierten sowie mit CRH, LPS und NaCl stimulierten Leukozyten, durchschnittliche [n = 6] mittlere relative Fluoreszenzintensität aus der Durchflußzytometrie.....	53
Tab. 10: Monensin- und Brefeldin-A-Konzentrationen und Inkubationszeiten zur Sekretionsinhibition vor der durchflußzytometrischen Analyse.....	59
Tab. 11: Aminosäuresequenzen von ACTH aus verschiedenen Spezies und einige korrespondierende DNA-Teilsequenzen aus dem POMC-Gen.....	66

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Schema ausgewählter Hauptkomponenten eines Durchflußzytometers	26
Abb. 2: Möglichkeiten der graphischen Darstellung durchflußzytometrischer Daten.....	30
Abb. 3: Regionen und Gates in der Durchflußzytometrie	31
Abb. 4: Dexamethason - Inhibitor der ACTH-Synthese	37
Abb. 5: Strukturen von MTT und seinem Metaboliten Formazan	38
Abb. 6: Silikonisierte Glasröhrchen aufgestellt in Plastikstopfen in einer 24-Well-Zellkulturplatte	39
Abb. 7: Inhibitoren des Golgi-Apparates, eingesetzt zur Hemmung der Sekretion von zellulären Exportpeptiden.....	39
Abb. 8: Erfassung und Zuordnung der Ereignishäufigkeiten je Fluoreszenzkanal	47
Abb. 9: In Fluoreszenzintensitäten transformierte Häufigkeitswerte aus Histogrammen.....	48
Abb. 10: Zellstoffwechsel von PBMC im MTT-Test nach Kultur in hyperosmolarem Medium bzw. LPS	50
Abb. 11: Durchflußzytometrische Detektion von Adrenocorticotropem Hormon in sezernierenden peripheren mononukleären Leukozyten mit Induktion durch Corticoliberin und Suppression durch Dexamethason	51
Abb. 12: ACTH-Expression in 18 h mit CRH, LPS, und NaCl stimulierten, sezernierenden peripheren mononukleären Leukozyten	54
Abb. 13: ACTH-Expression in 5 h mit CRH, LPS, und NaCl stimulierten mononukleären Leukozyten aus Vollblut	55

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	3
Abstract	4
Verzeichnis der Abkürzungen	5
Verzeichnis der Tabellen.....	8
Verzeichnis der Abbildungen	9
Inhaltsverzeichnis.....	10
1 Einleitung	12
1.1 Problemstellung und wissenschaftliche Zielsetzung	12
1.2 Zelluläre Leistungsphysiologie	13
1.3 Adrenocorticotropes Hormon in der Achse Hypothalamus-Hypophyse- Nebenniere (HPA-Achse).....	14
1.3.1 Proopiomelanocortin (POMC)	15
1.3.2 Stimulation, Inhibition und Wirkung von ACTH in der HPA- Achse.....	18
1.4 Adrenocorticotropes Hormon und seine immunologischen Wirkungen in leukozytären Mikromilieus	20
1.5 Stimulation und Inhibition von ACTH in Leukozyten	22
1.6 Durchflußzytometrie und ACTH-Detektion	24
2 Material und Methoden	32
2.1 Leistungsphysiologische Zellkultursysteme	32
2.1.1 Zellkultur mit mononukleären Leukozyten	32
2.1.2 Zellkultur mit Vollblut	40

2.2	Markierung und Detektion von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) und Zelldifferenzierungsmarkern (CD)	42
2.2.1	Markierung von ACTH und CD	42
2.2.2	Durchflußzytometrische Analyse	45
2.3	Aufbereitung der durchflußzytometrischen Daten	45
2.3.1	Spezifische Auswahl und Transfer	45
2.3.2	Datentransformation und Bestimmung der mittleren relativen Fluoreszenzintensität	47
2.4	Statistische Auswertung	48
2.5	Bewertung der Daten als leistungsphysiologische Parameter	48
3	Ergebnisse	49
3.1	Ergebnisse der Vorversuche	49
3.2	Ergebnisse der Hauptversuche	52
4	Diskussion	56
4.1	Aussagefähigkeit von in-vitro-Modellen der zellulären Leistungsphysiologie	56
4.2	Vorversuche und Methodik	57
4.3	Ergebnisdiskussion	60
4.4	Methodisches Entwicklungspotential	64
4.4.1	Entwicklungsperspektiven für die Zellkultur	64
4.4.2	Entwicklungsperspektiven für die Durchflußzytometrie	66
5	Zusammenfassung	71
6	Literaturverzeichnis	74
	Dank	86

1 Einleitung

Die Kommunikation zwischen den Zellen des Abwehrsystems verläuft über direkte Interaktionen und durch Signalübermittlung mit Hilfe von Mediatoren. Sie dient der Anpassung an Umwelteinflüsse auf den Organismus bzw. der Auseinandersetzung mit diesen zur Wahrung der körperlichen Integrität.

Erhöhte Anforderungen im Rahmen deutlich veränderter Umweltbedingungen, besonderer Stoffwechsellagen und immunologischer Herausforderungen, insbesondere Infektionen, induzieren leistungsphysiologische Anpassungsreaktionen. Die Erkenntnis, daß das Abwehrsystem eng mit dem endokrinen und dem Nervensystem verwoben ist, wird durch Forschungsergebnisse erweitert, die zeigen, daß akzessorische und immunkompetente Zellen nicht nur von Neuropeptiden beeinflußt werden, sondern diese selbst synthetisieren und sezernieren.

In der zellulären Leistungsphysiologie nimmt, wie auch in der systemischen Reaktion auf physikalische, chemische und biotische Noxen, das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) eine Schlüsselstellung ein. Zusammen mit anderen, als Streßhormone bezeichneten Mediatoren bildet es die Achse Hypothalamus-Hypophyse-Nebenniere (HPA) im Kontext leukozytärer Mikromilieus ab.

1.1 Problemstellung und wissenschaftliche Zielsetzung

Zu den Interaktionen zwischen Abwehrsystem, Endokrinum und Nervensystem liegen aus Untersuchungen in den vergangenen 25 Jahren umfangreiche Erkenntnisse vor. In der Hauptsache sind grundlegende Zusammenhänge erforscht worden. Zeitlich parallel verlaufene Entwicklungen im Bereich der zellbiologischen Analytik wurden hierfür nur zum Teil ausgeschöpft, und eine Nutzung dieser Technologien zur funktionellen Bewertung von Umwelteinflüssen und Ernährungsfaktoren steht erst an ihrem Anfang.

In der ernährungsphysiologischen und ernährungsimmunologischen Forschung ist während dieses Zeitraums deutlich geworden, daß wesentliche gesundheitsbeeinflussende Wirkungen von nicht-nutritiven Lebensmittelinhaltsstoffen ausgehen, beispielsweise vom antioxidativen Potential und den immunologischen Wirkungen bestimmter Polyphenole und ihrer Metaboliten (BÖHM *et al.*, 1998, KOGA & MEYDANI, 2001). Für entsprechend zusammengesetzte, verarbeitete Lebensmittel

und Supplemente sind Nachweise der Wirksamkeit und gesundheitlichen Unbedenklichkeit gefordert (GROßKLAUS, 2000). Auch in diesem Zusammenhang soll die Immuntoxikologie Methoden entwickeln, mit deren Hilfe die subletale und gegebenenfalls die subklinische Toxizität von Stoffen und Stoffgemischen, auch solchen, die als Rückstände und Kontaminanten in Lebensmitteln vorkommen können, untersucht werden kann.

Zur Bewertung ernährungsbezogener Schutz- und Schadwirkungen wurde in den vergangenen Jahren in zunehmendem Maße die Durchflußzytometrie eingesetzt. Dabei wurden entsprechend den methodischen Fortschritten zunächst Einflüsse auf die Verteilung von Immunphänotypen untersucht, also Art, immunologische Prägung und Aktivierungszustand von Zellen des Abwehrsystems, sowie die funktionelle Kapazität, beispielsweise Phagozytoseleistung, Respiratorischer Burst und Proliferation. Später kamen mit der intrazellulären Antigendetektion Fragestellungen über die zelluläre Signalübermittlung und die Kommunikation zwischen Zellen hinzu.

Die Expression von Adrenocorticotropem Hormon in Leukozyten kann die Relevanz eines Stimulus dokumentieren und gleichzeitig Aufschluß über die leistungsphysiologische Kapazität der Zellen bzw. des lokalen Milieus im Umgang mit diesem Einfluß geben. Durchflußzytometrisch ist ACTH bisher im Rahmen der entwicklungsbiologischen Forschung in Hämozyten niederer Vertebraten detektiert worden (Kapitel 1.6, S. 24). Für humane Leukozyten waren zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit keine Veröffentlichungen verzeichnet.

Das primäre Ziel der nachfolgend dargestellten Forschungsarbeiten war daher, mit Hilfe von kommerziell verfügbaren monoklonalen Antikörpern, Immunfluoreszenz und Durchflußzytometrie ACTH in humanen Leukozyten des peripheren Blutes zu detektieren. Parallel dazu sollte untersucht werden, ob die einschlägigen Wirkungen ausgewählter Stimulatoren mit diesem System dokumentiert und bewertet werden können.

1.2 Zelluläre Leistungsphysiologie

Mediatoren und Metaboliten, deren Konzentrationen sich im Rahmen der leistungsphysiologischen Reaktion spezifisch verändern, eignen sich als Indikatoren für die Stoffwechsellanpassung (Tab. 1, S. 14). Signalsubstanzen der systemischen

Streßreaktion werden von Leukozyten synthetisiert und sind in die Regulation zellulärer Anpassungsmechanismen eingebunden. Systemische und lokale Effekte und Reaktionskinetiken sind zum großen Teil ähnlich (vergl. GABRIEL *et al.*, 1992; HOFFMAN-GOETZ & PEDERSEN, 1994; BRINES *et al.*, 1996; PEDERSEN & NIEMAN, 1998).

Tab. 1: Leistungsphysiologische Indikatoren.

Substanzklasse	Vertreter	Wirkungsweise	Wirkungsradius
1. Mediatoren			
Hormone	CRH/AVP ACTH Endorphine Glucocorticoide	para- und endokrin	systemisch
Cytokine	Interleukine Interferone TNF	auto- und parakrin	lokal und systemisch
andere	Stickstoffmonoxid	auto- und parakrin	lokal (und systemisch?)
2. Intrazelluläre Produkte			
Hitzeschockproteine	HSP60 HSP70 HSP90	intrazellulär	intrazellulär

Abkürzungen: ACTH = Adrenocorticotropes Hormon, AVP = Arginin-Vasopressin; CRH = Corticotropin-Releasing-Hormon; HSP = Hitzeschockprotein; TNF = Tumornekrosefaktor

Regulatorische Neuropeptide sind im gesamten Tierreich verbreitet, und die Struktur ihrer Gene ist hochkonserviert. Dies weist auf die große Bedeutung der leistungsphysiologischen Anpassungsreaktion hin, die als stammesgeschichtlich wichtigster Mechanismus zur Erhaltung der Körperintegrität angesehen werden kann (OTTAVIANI *et al.*, 1997).

1.3 Adrenocorticotropes Hormon in der Achse Hypothalamus-Hypophyse-Nebenniere (HPA-Achse)

Zusammen mit anderen strukturell verwandten Neuropeptiden wird ACTH der Familie der endogenen Opiate oder opioiden Peptide zugeordnet (MAINS *et al.*, 1977). Die Produkte aller Peptidfamilien werden durch Prozessierung großer Vorläufermoleküle gebildet. Das Signalpeptid wird gekappt und das Prohormon über

einen universellen Mechanismus gespalten (DIXON *et al.*, 1987; LOH & PARISH, 1987). Die vielfältigen Spaltprodukte der Prohormone können unterschiedliche biologische Funktionen erfüllen. Defekte in der Prozessierung führen zu schwerwiegenden hormonellen Störungen (FURUTA *et al.*, 1997; ZHU *et al.*, 2002).

Die Gene der Präkursoren sind im Genom in einer oder wenigen Kopien repräsentiert. Daher liegt die Information für die gewebsspezifische differentielle Expression der Neuropeptide wahrscheinlich innerhalb der Gene.

Opioide Peptide sind zuerst als körpereigene Liganden der Opiatrezeptoren in Erscheinung getreten, deren Konsensussequenz Tyr-Gly-Gly-Phe ist. Beispiele sind die (immunologisch aktiven) Pentapeptide [Met]-Enkephalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) und [Leu]-Enkephalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) (PLOTNIKOFF *et al.*, 1985; DIXON *et al.*, 1987).

Mit molekularbiologischen Methoden konnten drei Vorläufermoleküle für Mediatoren der Opioidfamilie unterschieden werden:

- Präpro-opiomelanocortin (NAKANISHI *et al.*, 1978; NAKANISHI *et al.*, 1979),
- Präpro-enkephalin A (NODA *et al.*, 1982a; NODA *et al.*, 1982b; GUBLER *et al.*, 1982; COMB *et al.*, 1982)
- Präpro-dynorphin (KAKIDANI *et al.*, 1982)

1.3.1 Proopiomelanocortin (POMC)

Das Proopiomelanocortin(POMC)-Gen wird in der Hypophyse und in peripheren Geweben exprimiert (LACAZE-MASMONTEIL *et al.*, 1987). Seine Peptidprodukte werden aus der Hypophyse in den Blutstrom abgegeben. Die Freisetzung unterliegt der übergeordneten Kontrolle durch den Hypothalamus und wird hauptsächlich über die entsprechenden Liberine bzw. über Rückkoppelungs-Hemmung durch die Hormon-Endprodukte der Signalketten reguliert. Das Präkursorprotein wird gewebsspezifisch differentiell prozessiert: im Hypophysenvorderlappen zu ACTH und β -LPH, im Mittelteil - z.B. bei Ratte und Schaf - wird ACTH in α -MSH und CLIP umgewandelt, β -LPH weiter zu γ -LPH und β -Endorphin. Die kleineren aus ACTH und β -LPH gebildeten, biologisch aktiven Peptide werden von Paaren basischer Aminosäurereste flankiert (ROBERTS & HERBERT, 1977; DIXON *et al.*, 1987) (Tab. 2, S. 16).

Tab. 2: Aminosäuresequenz von POMC und seine Peptid-Produkte.

Position bezogen auf ACTH									
-90	NH ₂ -		Gly		Leu		Lys		
	Cys		His		Pro		Lys		
	Ile		Phe		Glu	-20	Arg		
	Gly	γ-MSH	Arg		Gly		Arg		
	Ala		Trp		Gly		Pro		
	Cys		Asp		Pro		Val	+20	
	Lys		Arg		Glu		Lys		
	Pro		Phe		Pro		Val		
	Asp		Gly	-50	Arg		Tyr		
	Leu		Arg		Ser		Pro		
Ser		Asn		Asp		Asn			
-80	Ala	Ser		Gly	-10	Ala			
	Glu	Ser		Ser		Lys			
	Thr	Ser		Ser		Pro			
	Pro	Ser		Gly		Gly	+30		
	Met	Gly		Pro		Pro			
	Phe	Ser		Arg		Arg			
	Pro	Ser	-40	Glu		Glu			
	Gly	Gly		Gly		Gly			
	Asn	Ala		Lys		Arg			
	Gly	Gly		Arg		Ser			
-70	Asp	Gln		Ser	+1	Ser			
	Glu	Lys		Tyr		Tyr			
	Gln	Arg		Ser		Ser			
	Pro	Glu		Met		Met			
	Leu	Asp		Glu		Glu	+40		
	Thr	Val		His		His			
	Glu	Ser	-30	Phe		Phe			
	Asn	Ala		Arg		Arg			
	Pro	Gly		Trp		Trp			
	Arg	Glu		Gly	+10	Gly			
-60	Lys	Asp		Lys		Lys			
	Tyr	Cys		Pro		Pro			
	Val	Gly		Val		Val			
	Met	Pro		Gly		Gly	+50		
...									

Additional labels and boxes in the diagram:

- γ-MSH (boxed) covers positions -90 to -40.
- α-MSH (boxed) covers positions +1 to +10.
- Acetyl- (boxed) covers positions +1 to +10.
- ACTH (boxed) covers positions -60 to +10.
- β-LPH (boxed) covers positions +30 to +50.
- γ-LPH (boxed) covers positions +40 to +50.
- CLIP (boxed) covers positions +20 to +30.

Tab. 2: Aminosäuresequenz von POMC und seine Peptid-Produkte.

Position bezogen auf ACTH									
+60	Gly	+80	Leu	+100	Gly	+120	Pro		
	Asp		Leu		Ser		Leu		
	Gly		Val		Pro		Val		
	Pro		Ala		Pro		Thr		
	Asp		Ala		Lys		Leu		
	Gly		Glu		Asp		Phe		
	Pro		Lys		Lys		Lys		
	Ala		Lys		Arg		Asn		
	Ala		Asp		Tyr		Ala		
	Thr		Glu		Gly		Ile		
	Ala		Gly		Gly		Ile		
	Gln		Pro		Phe		Lys		
	Gly		Tyr		Met		Asn		
	Pro		Arg		Thr		Ala		
Gly	Met	Ser	Tyr						
Asp	Glu	Glu	Lys						
Leu	His	Lys	Lys						
Glu	Phe	Ser	Gly						
His	Arg	Gln	Glu						
+70	Ser	+90	Trp	+110	Thr				

Labels for peptide products: β -LPH, γ -LPH, β -MSH, γ -LPH, β -MSH, β -LPH, Met-Enkephalin, β -LPH, β -End., β -LPH, β -Endorphin.

Daten aus ROBERTS & HERBERT, 1977; CHANG *et al.*, 1980a; DIXON *et al.*, 1987; HADLEY & HASKELL-LUEVANO, 1999;

Abkürzungen: +1 = N-terminale Aminosäure der ACTH-Primärstruktur; -90 - +120 = auf ACTH bezogene Aminosäure-Position in der POMC-Sequenz; **Ala** = Alanin; **Arg** = Arginin; **Asn** = Asparagin; **Asp** = Asparaginsäure; **-COOH** = Carboxy-Terminus des POMC-Peptids; **Gln** = Glutamin; **Glu** = Glutaminsäure; **Gly** = Glycin; **His** = Histidin; **Ile** = Isoleucin; **Leu** = Leucin; **Lys** = Lysin; **Met** = Methionin; **NH₂-** = Aminoterminus des POMC-Peptids; **Phe** = Phenylalanin; **Pro** = Prolin; **Ser** = Serin; **Thr** = Threonin; **Trp** = Tryptophan; **Tyr** = Tyrosin; **Val** = Valin

Die POMC-Produkte können in Melanocortine und opioide Peptide und erstere weiter in Melanotropine und Corticotropine gegliedert werden (HADLEY & HASKELL-LUEVANO, 1999) (Tab. 3, S. 18).

Die Struktur des POMC-Gens wurde mit Hilfe der cDNA von bovinem ACTH-beta-LPH aufgeklärt (NAKANISHI *et al.*, 1978; NAKANISHI *et al.*, 1979; NAKANISHI *et al.*, 1981; NUMA & NAKANISHI, 1981; DIXON *et al.*, 1987). Das Vorläufermolekül wird von zwei nicht-konsekutiven Desoxyribonukleinsäure(DNA)-Segmenten kodiert. Das kleinere Exon enthält die Information für das Signalpeptid, das größere repräsentiert die biologisch aktiven Peptide. Das humane Gen ist um ein nicht-translatiertes Exon

und ein entsprechendes Intron erweitert. Die Nukleotidsequenz der cDNA des bovinen Gens läßt darauf schließen, daß das ACTH- β -LPH-Strukturgen sich durch sukzessive Duplikation von MSH-kodierenden Einheiten entwickelt hat. Die vier repetitiven Einheiten wurden in einer Abfolge von Substitutionen, Additionen und Deletionen zum rezenten Genabschnitt umgewandelt (NAKANISHI *et al.*, 1979).

Tab. 3: Opiomelanocortine.

Melanocortine	Melanotropine	α -, γ -MSH, β -LPH
	Corticotropin	ACTH

Opioide Peptide	Endorphine	α -, β -, γ -Endorphin

Abkürzungen: ACTH = adrenocorticotropes Hormon; LPH = Lipotropin; MSH = Melanocytenstimulierendes Hormon

1.3.2 Stimulation, Inhibition und Wirkung von ACTH in der HPA-Achse

Die innerhalb der HPA-Achse vermittelte ACTH-Induktion stehen unter der übergeordneten Kontrolle des Zentralen Nervensystems (ZNS) , das z.B. bei traumatischen Einflüssen auf den Organismus die systemische Reaktion mitbestimmt.

Direkte Effekte auf die ACTH-Sekretion wurden im Nagermodell an Hypophysen-Präparaten bzw. an hypophysären Tumorzelllinien untersucht. Zu den Faktoren, die ohne ZNS-Beteiligung wirken können gehören zunächst die synergistisch stimulierenden klassischen Liberine CRH und AVP (GILLIES *et al.*, 1982), aber auch die Cytokine IL-1 (WOLOSKI *et al.*, 1985), IL-2 (KARANTH & MCCANN, 1991), IL-6 (WOLOSKI *et al.*, 1985) und IL-10 (HUGHES *et al.*, 1994).

Anhand der Wirkung von Lipopolysaccharid (LPS, exogenes Pyrogen) läßt sich das Prinzip der ACTH-Induktion darstellen. Während bakterieller Infektionen sowie experimentell induziert LPS eine Signalkaskade, an deren Anfang eine erhöhte Expression von induzierbarer NO-Synthase (iNOS) und damit steigende Produktion des Mediators Stickstoffoxid (NO) sowie der proinflammatorischen Cytokine Interleukin 1 (IL-1, endogenes Pyrogen), IL-2, IL-6, TNF- α und antiinflammatorischen Cytokine IL-10 und IL-13 steht. Eine systemische Wirkung von NO wird derzeit

diskutiert (RASSAF *et al.*, 2002; JOSHI *et al.*, 2002). Stickstoffoxid induziert Corticoliberin (CRH) und bewirkt so die Sekretion von ACTH (McCANN *et al.*, 2000).

Der Effekt einer Stimulation der HPA-Achse kann von weiteren Faktoren synergistisch oder antagonistisch beeinflusst werden. So ist die durch LPS induzierte und über CRH und Arginin-Vasopressin (AVP) regulierte hypophysäre ACTH-Sekretion von den osmotischen und den Volumenverhältnissen im Organismus abhängig. Hypervolämie und Hyperosmolalität dämpfen die ovinen Plasmaspiegel an Liberinen und ACTH (DADOUN *et al.*, 1999).

Die anhaltende Identifizierung neuer ACTH-Induktoren bestätigt die HPA-Achse als umfassenden Effektorweg für systemische leistungsphysiologische Anpassungsreaktionen (MERALI *et al.*, 2002).

Die ACTH-Expression und -Sekretion wird im Sinne einer Rückkoppelungshemmung von den Endprodukten in der HPA-Achse inhibiert. Nicht-steroidale Inhibitoren können, wie z.B. NO, an der Signalübertragung im Zuge der ACTH-Induktion beteiligt oder, wie β -Endorphin, Abkömmlinge von POMC oder anderen Prohormonen sein (JESSOP, 1999).

ACTH wirkt primär auf die Nebennierenrinde, wo das Hormon die Synthese und Sekretion von Glucocorticoiden, Mineralocorticoiden und androgenen Steroiden über die Transformationsrate von Cholesterol zu Pregnenolon stimuliert. Der Signalweg führt von den ACTH-Rezeptoren über eine membrangebundene Adenylylcyclase. Neben diesen adrenalen Effekten wirkt ACTH im Fettgewebe lipolytisch und, über die Freisetzung von Insulin aus den pankreatischen β -Zellen, hypoglykämisch. Beta-LPH stimuliert die Freisetzung von Fettsäuren aus dem Fettgewebe. Es hat zwar keine direkte Opiataktivität, wird aber durch Proteolyse in Endorphine umgewandelt (DIXON *et al.*, 1987).

Die Leukozytenzahl und phänotypische Verteilung steht im Rattenmodell mit dem endokrinen Tagesprofil, gemessen als Corticosteron, im Zusammenhang. Steigende Hormonspiegel nach dem Übergang in die aktive Phase und nach mildem Immobilisationsstreß gehen mit einer geringeren Leukozyten- und Gesamtlymphozytenzahl einher (DHABHAR *et al.*, 1994). Physische Aktivität wirkt sich auf die Menge und phänotypische Verteilung von Leukozyten im peripheren Blut aus. Akute Anstrengung läßt die Leukozytenzahl ansteigen, in der Erholungsphase sinkt sie wieder ab. Der kurzfristigste Effekt betrifft die Lymphozyten, deren Zahl im

peripheren Blut ansteigt, dann innerhalb von einer Stunde nach dem Training reaktiv wieder absinkt und sich innerhalb von 24 h wieder auf den Ausgangswert einstellt (GABRIEL *et al.*, 1992; HOFFMAN-GOETZ & PEDERSEN, 1992). Zwischen untrainierten, trainierten und übertrainierten Personen sind deutliche Unterschiede feststellbar. Klinisch-epidemiologisch ist moderates Training am günstigsten; Bewegungsmangel und häufige erschöpfende Anstrengung fördern vor allem Atemwegsinfektionen (BRINES *et al.*, 1996). Neuropeptide beeinflussen wahrscheinlich über leistungsphysiologische Situationen hinaus allgemein regulatorisch die Rezirkulation von Leukozyten und ihre Migration zwischen Blutkreislauf und Geweben (OTTAWAY & HUSBAND, 1994).

1.4 Adrenocorticotropes Hormon und seine immunologischen Wirkungen in leukozytären Mikromilieus

Regulatorische Neuropeptide und ihre Rezeptoren sind in Vertebraten und Invertebraten (OTTAVIANI & FRANCESCHI, 1997; OTTAVIANI *et al.*, 1998) verbreitet. In humanen Leukozyten sind POMC und seine Produkte (OATES *et al.*, 1988; REDER *et al.*, 1988) sowie die entsprechenden Rezeptoren (RAMACHANDRAN *et al.*, 1987; SMITH *et al.*, 1987) auf verschiedenen Ebenen der Expression nachgewiesen worden. Untersuchungen an Milz-Lymphozyten der Ratte mit ¹²⁵I-ACTH legen nahe, daß das Peptid an den Melanocortin-5-Rezeptor bindet und über Endocytose in Lysosomen gelangt (CLARKE, 1999). Die Bindung von β -Endorphin an seine Rezeptoren auf Lymphozyten wird durch hohe Konzentrationen von ACTH inhibiert (BORBONI *et al.*, 1989). Corticotropin erhöht die Konzentrationen von zyklischem Adenosin-Monophosphat (cAMP) und zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) in lymphoiden Zellen. Seine biologische Aktivität ist calciumabhängig. Während die immunsupprimierende Wirkung hoher ACTH-Konzentrationen cAMP-vermittelt ist, könnten immunstimulatorische Effekte mit der Ca-Aufnahme im Zusammenhang stehen (JOHNSON *et al.*, 1988; CLARKE, 1995). Die Konzentrationen von zyklischen Nucleotiden in Lymphozyten werden von einer Reihe von Agonisten beeinflusst, die z.T. mit der ACTH-Expression im Zusammenhang stehen, darunter LPS, das in T-Lymphozyten cAMP und in B-Lymphozyten cGMP induziert (COFFEY & HADDEN, 1985).

Im Chemotaxiskammer-Assay induzierten CRH und ACTH₁₋₂₄ die Migration von humanen Monozyten, während ACTH₁₋₃₉ und α -MSH keine Effekte ausübten (GENEDANI *et al.*, 1992). Die Phagozytoseleistung von Hämozyten der Posthornschncke (*Planorbarius corneus* L.) sowie der urodelen Amphibien *Salamandra s. salamandra* (Feuersalamander) und *Triturus c. carnifex* für Bakterien war nach Zugabe von ACTH *in vitro* erhöht (OTTAVIANI *et al.*, 1991; OTTAVIANI *et al.*, 1992a). Die Phagozytose von Latex-Beads durch murine peritoneale Makrophagen, durchflußzytometrisch gemessen als prozentualer Anteil von Zellen, die Beads phagozytiert hatten, wurde dagegen von ACTH₁₋₃₉ und insbesondere von ACTH₁₋₂₄ gehemmt (ICHINOSE *et al.*, 1994).

Auf die Antikörperproduktion übt ACTH unterschiedliche Effekte aus. Der *plaque forming cell* (PFC) Test auf die Produktion muriner Antikörper gegen Schafserythrozyten (SRBC) bzw. Dinitrophenol(DNP)-Ficoll ergab eine Suppression bereits zu einem frühen Zeitpunkt (JOHNSON *et al.*, 1982). Demgegenüber war die Proliferation und Antikörpersekretion humaner B-Zellen *in vitro* erhöht, wenn zusätzliche Stimuli, wie z.B. IL-2, in den Kulturen eingesetzt wurden (ALVAREZ-MON *et al.*, 1985). Mit Tetanus-Toxoid stimulierte, humane mononukleäre Leukozyten aus peripherem Blut (PBMC) zeigten eine erhöhte Antikörpersynthese im höheren (10^{-9} und 10^{-11} M) bzw. eine Suppression im niedrigen Konzentrationsbereich (10^{-13} und 10^{-17} M) (MUNN & LUM, 1989).

In Experimenten zum Einfluß von ACTH auf die IgE-Synthese wurden humane mononukleäre Leukozyten des peripheren Blutes (PBMC) mit IL-4 und monoklonalen Antikörpern gegen CD40 stimuliert. Die IgE-Produktion war konzentrationsabhängig gesteigert oder vermindert. Ähnliche Wirkungen gehen von CRH und α -MSH sowie weiteren Neuropeptiden aus. Im Unterschied zu früheren Befunden (BOST *et al.*, 1990, s.o.) hatte ACTH keine Wirkung auf die IgG- oder IgM-Synthese in diesem Kultursystem. Der Einfluß auf Lymphozyten ist von akzessorischen Zellen abhängig. (AEBISCHER *et al.*, 1994; STADLER *et al.*, 1994; AEBISCHER *et al.*, 1996).

Vergleichende Untersuchungen an verschiedenen Wirbeltier-Spezies, die unterschiedliche stammesgeschichtliche Entwicklungsstadien repräsentieren, lassen einen Übergang erkennen: von Arten, die nur Immunglobulin (Ig)M besitzen, zu solchen, die zusätzlich IgG exprimieren. Mit der Möglichkeit zum Klassenswitch geht die Fähigkeit zur Synthese von ACTH in lymphoiden Zellen einher. So wird das

Peptid bei urodelen Amphibien in Lymphozyten gebildet, während es bei anuranen nur in Phagozyten nachweisbar ist (OTTAVIANI *et al.*, 1992b).

Für einen Peptidabschnitt aus dem variablen Teil der schweren Kette von humanem IgG₁ mit ACTH-ähnlicher Aminosäuresequenz sind immunsupprimierende Eigenschaften *in vitro* beschrieben. Eine regulatorische Funktion ist denkbar, wenn während des Maximums der spezifischen humoralen Immunantwort hohe Antikörpertiter erreicht werden (NAVOLOTSKAYA *et al.*, 2000).

Adrenocorticotropes Hormon beeinflusst die T-Zell-Proliferation (SANDI *et al.*, 1990). Während es die T-Zell-vermittelte Zytotoxizität im Recall (JOHNSON *et al.*, 1987) verstärken kann, ist die Produktion von Interferon- γ (IFN- γ) durch T-Zellen (JOHNSON *et al.*, 1984; PETERSON *et al.*, 1987) supprimiert und infolge dessen die Makrophagen-abhängige Tumorzell-Toxizität (KOFF & DUNEGAN, 1985; PECK, 1987) beeinflusst. Die Alloantigen-induzierte T-Zell-Proliferation in Lymphozytenkulturen der Ratte ist in Anwesenheit von ACTH moderat erhöht, und ebenso ist die Zytotoxizität (⁵¹Cr-Freisetzung) gesteigert (GONSALKORALE *et al.*, 1995).

1.5 Stimulation und Inhibition von ACTH in Leukozyten

Immunologische und zelluläre leistungsphysiologische Signale lösen die Freisetzung vom CRH in Milz, Thymus und entzündetem Gewebe aus. Peripheres CRH wirkt als parakriner Mediator über die Bindung an CRH-R1- und CRH-R2-Rezeptoren auf benachbarte Zellen des Abwehrsystems. Sein Einfluß ist sowohl *in vivo* als auch *in vitro* proinflammatorisch. Einige dieser Effekte gehen möglicherweise von CRH-ähnlichen Peptiden wie z.B. dem Urocortin aus, das in Zellen des Immunsystems nachweisbar ist und eine hohe Affinität zu CRH-R2 hat (BAIGENT, 2001).

Die Induktion der ACTH-Synthese in Leukozyten kann - mit zum Teil fließenden Übergängen zwischen den genannten Gruppen - durch physikalische, chemische, biochemische, (patho)physiologische und mikrobiologische Stimulatoren hervorgerufen werden. Inhibitorische Einflüsse gehen vor allem von den hormonellen Endprodukten der HPA-Achse und ihren synthetischen Analoga aus.

Die Wirkung von Hyperthermie (38 - 44 Grad Celsius [°C] , 20 min. bis über Nacht) auf Leukozyten wurde hauptsächlich mit molekularbiologischen und proteinbiochemischen Methoden anhand der Gentranskription und Expression von

Hitzeschockproteinen (HSP) untersucht (FERRIS *et al.*, 1988; JOSLIN *et al.*, 1991; JAQUIER-SARLIN *et al.*, 1995; HOUSBY *et al.*, 1999). Die Temperaturabhängigkeit und Kinetik der HSP70-Synthese kann auch durchflußzytometrisch analysiert werden, und die Ergebnisse stimmen mit denen aus Referenzmethoden (*metabolic labelling* mit ^{35}S -Methionin, Western-Immunoblot) überein (BACHELET *et al.*, 1998). Corticoliberin bzw. ACTH (ELISA) waren in murinen Milzzellen, humanen PBMC sowie aus den PBMC angereicherten Lymphozyten, T-Zellen bzw. CD4+ T-Lymphozyten und B-Zellen um den Faktor 12 - 24 (für CRH) bzw. 14 (für ACTH) hyperthermisch induzierbar (KRAVCHENCO & FURALEV, 1994).

Hyperosmolarität konnte mit Hilfe unvollständig verdünnter Zellkulturmedien und Hypoxie durch Absenken des Sauerstoffgehaltes im Inkubator auf 5 Prozent (%) modelliert werden. Beide Bedingungen induzierten (8× - 27× bzw. 10× - 26×) die CRH- und (14× - 19× bzw. 23×) die ACTH-Expression (KRAVCHENCO & FURALEV, 1994). Die Bedeutung des osmotischen Wertes für immunologische Regulationsmechanismen geht auch aus Untersuchungen zur Expression des proinflammatorischen Cytokins Interleukin 8 hervor, die durch Zusatz von Kaliumiodid (KI), Natriumiodid (NaI) und Natriumchlorid (NaCl) induziert und durch wässriges Verdünnen des Zellkulturmediums supprimiert werden konnte (SHAPIRO & DINARELLO, 1995; SHAPIRO & DINARELLO, 1997).

Corticoliberin und AVP bewirkten, wie in der Hypophyse, synergistisch die ACTH-Freisetzung aus Leukozyten auf (radiometrisch) mehr als die 20fache Konzentration. Leukozytäres ACTH entfaltete in der murinen Nebennieren-Tumorzelllinie Y-1 steroidogene Aktivität. Die Synthese wurde durch Dexamethason supprimiert (SMITH *et al.*, 1986).

Um Erkenntnisse über die Wirkungen von LPS, LPS + IL-4 und Concanavalin A (Con A) auf die Proteinsynthese und den Stoffwechsel von Maus-Splenozyten zu gewinnen, wurden Mäuse mit ^{35}S -Methionin radioaktiv markiert (*in-vivo*-Verfahren) bzw. Milzzellen in Gegenwart von ^{35}S -Methionin kultiviert (*in-vitro*-Markierung). Proben von immobilisierten und Kontroll-Tieren wurden parallel untersucht. Die streßbedingten Veränderungen waren bei B Zellen minimal, abgesehen von einer geringgradigen Abnahme der Proliferationskapazität. Im Gegensatz dazu gab es ausgeprägte Effekte auf T-Zellen. Im zweidimensionalen (2D-)Gel war erkennbar, daß diese T-Zellen im Vergleich zu Kontrolltieren mehr als

100 neue Proteine exprimierten (DOMINGUEZ-GERPE & LEFKOVITS, 1996). Quantitative Untersuchungen (ELISA) zu Effekten von LPS und ConA (beide $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) wurden an Maus-Splenozyten und verschiedenen Fraktionen humaner mononukleärer Blutleukozyten durchgeführt. Unter LPS war CRH aus B-Zellen unverändert, aus T-Lymphozyten dagegen $32\times$ erhöht. Umgekehrte Verhältnisse lagen für ConA vor, das praktisch keine Wirkung auf T-Zellen ausübte, B-Zellen dagegen zur CRH-Sekretion bis auf die $21\times$ Konzentration stimulierte. Die Werte der übrigen Zellfraktionen lagen innerhalb dieser Spannweite. Die Konzentrationen von ACTH aus humanen Lymphozyten stiegen unter LPS auf das 10fache und unter ConA auf das 3fache an (KRAVCHENCO & FURALEV, 1994). Immunradiometrische Detektion der LPS-Wirkung auf mononukleäre Zellen ergab eine auf ca. das 3fache erhöhte ACTH-Konzentration (HARBOUR-MCMENAMIN *et al.*, 1985).

Einflüsse des Newcastle-Disease- (NDV) (SMITH & BLALOCK, 1981; WESTLY *et al.*, 1986) und des humanen Immundefekt-Virus (HIV) (HASHEMI *et al.*, 1998) deuten auf eine Beteiligung leukozytärer Neuropeptide bei Interferon-vermittelten antiviralen Abwehrprozessen hin. Die POMC-Transkription in Epstein-Barr-Virus(EBV) -transformierten humanen B-Lymphozyten und -Zelllinien wird von Dexamethason nicht beeinflusst (OATES *et al.*, 1988; OATES *et al.*, 1990).

Den Effekt systemisch wirksamer Umweltfaktoren demonstrieren Untersuchungen an bovinen Lymphozyten. Die Tiere wurden 14 h im Lastwagen transportiert und verblieben entweder für weitere 24 h im stehenden Fahrzeug oder wurden für die Ruhephase in den Stall verbracht. Nach 72stündiger Nachinkubation von PBMC war eine transportbedingte ungefähre Verdoppelung der ACTH-Sekretion durch Lymphozyten, gemessen im Radioimmunassay, feststellbar. Die Stimulation persistierte bei Zellmaterial von Tieren, die im Lastwagen belassen worden waren, und ging in den Bereich des Ausgangswertes zurück, wenn die Rinder im Stall geruht hatten (DIXIT *et al.*, 2001).

1.6 Durchflußzytometrie und ACTH-Detektion

Die Durchflußzytometrie dient der Messung unterschiedlicher physikalischer und chemischer Merkmale von einzelnen Zellen oder Partikeln - also z.B. Zellkerne, Chromosomen, Bakterien, Zellorganellen, Liposomen oder Viren - in Suspension. Sie

werden mit einem hohen analytischen Durchsatz bis > 3000 pro Sekunde (s^{-1}) vermessen, während sie einzeln nacheinander einen Lichtstrahl passieren. Es können in heterogenen Gemischen auch verhältnismäßig seltene Ereignisse, etwa mit Häufigkeiten um 10^{-7} , identifiziert werden. Neben der Analyse besteht mit entsprechendem technischen Aufwand die Möglichkeit, markierte Subpopulationen durch automatisiertes Sortieren anzureichern (SCHAUER *et al.*, 1996; BOECK *et al.*, 2001).

Unterschiedliche Partikeln im Größenbereich von 1 bis 30 μm lassen sich anhand ihrer morphologischen Eigenschaften identifizieren, die im Durchflußzytometer zur charakteristischen Streuung des einfallenden Lichts führen. Die in der Verlängerung des einfallenden Strahls gemessene Lichtintensität (Vorwärtsstreulicht = FSC) und die Partikelgröße sowie die Intensität im rechten Winkel zur Einfallrichtung (Seitwärtsstreulicht = SSC) und die morphologische Komplexität des Partikels sind jeweils miteinander korreliert. Zur Komplexität tragen bei Zellen die Strukturierung der Membranen, die Granularität und die Morphologie des Zellkerns bei. Anhand ihrer Streulichteigenschaften lassen sich so Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten des peripheren Blutes unterscheiden.

Aus dem Seitwärtsstreulicht werden desweiteren Fluoreszenzsignale detektiert. Sollen mehrere Wellenlängenbereiche gemessen werden können, so ist das Durchflußzytometer üblicherweise mit einem Laserlicht-Generator ausgestattet, der monochromatisches, polarisiertes Licht emittiert. Die übertragene Energie regt die Zelle, speziell deren Pyridin- und Flavinnucleotide zur Abgabe von längerwelligem, unpolarisiertem Fluoreszenzlicht (Autofluoreszenz) an (BOECK, 2001). Es ist ein guter Indikator für die strukturelle Integrität der Zelle, denn morphologisch intakte Zellen geben, auch wenn sie nicht mehr vital sind, relativ niedrige Autofluoreszenzsignale ab. Insbesondere aber dienen Fluorochrome, mit denen Zellbestandteile direkt oder in Kombination mit spezifischen Sonden markiert oder die das Produkt fluorogener Substrate sind, zur Identifizierung struktureller oder funktioneller Charakteristika.

Das Vorwärtsstreulicht wird typischerweise zum größten Teil ausgeblendet und die restliche Intensität durch eine Photodiode erfaßt, während das Seitwärtsstreulicht aufgrund seiner Polarisierung und Wellenlängen über Strahlenteiler, dichroische Spiegel und optische Filter zerlegt und auf Verstärkerröhren (*Photo-*

multiplier Tubes = PMT) gelenkt wird. So werden mit Geräten, die mit *einem* Lasergenerator ausgestattet sind, üblicherweise bis zu drei Fluoreszenzparameter meßbar (Abb. 1, S. 26). Diese unterschiedlichen Wellenlängenbereiche werden häufig auch als Kanäle bezeichnet. Der Begriff Kanäle soll hier aber den diskreten Intensitätsbereichen vorbehalten bleiben, in die die (nach der klassischen Physik) kontinuierlich modulierten Lichtintensitäten und die daraus in den PMT erzeugten kontinuierlichen Spannungsschwankungen nach analog/digital-Wandlung klassiert werden. Daher werden die Merkmale Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht, Fluoreszenz(en-1, 2 ... n = FL-1, FL-2 ... FL-n) und gegebenenfalls Zeit (bei kinetischen Studien, SEAMER & SKLAR, 2001) als Parameter bezeichnet.

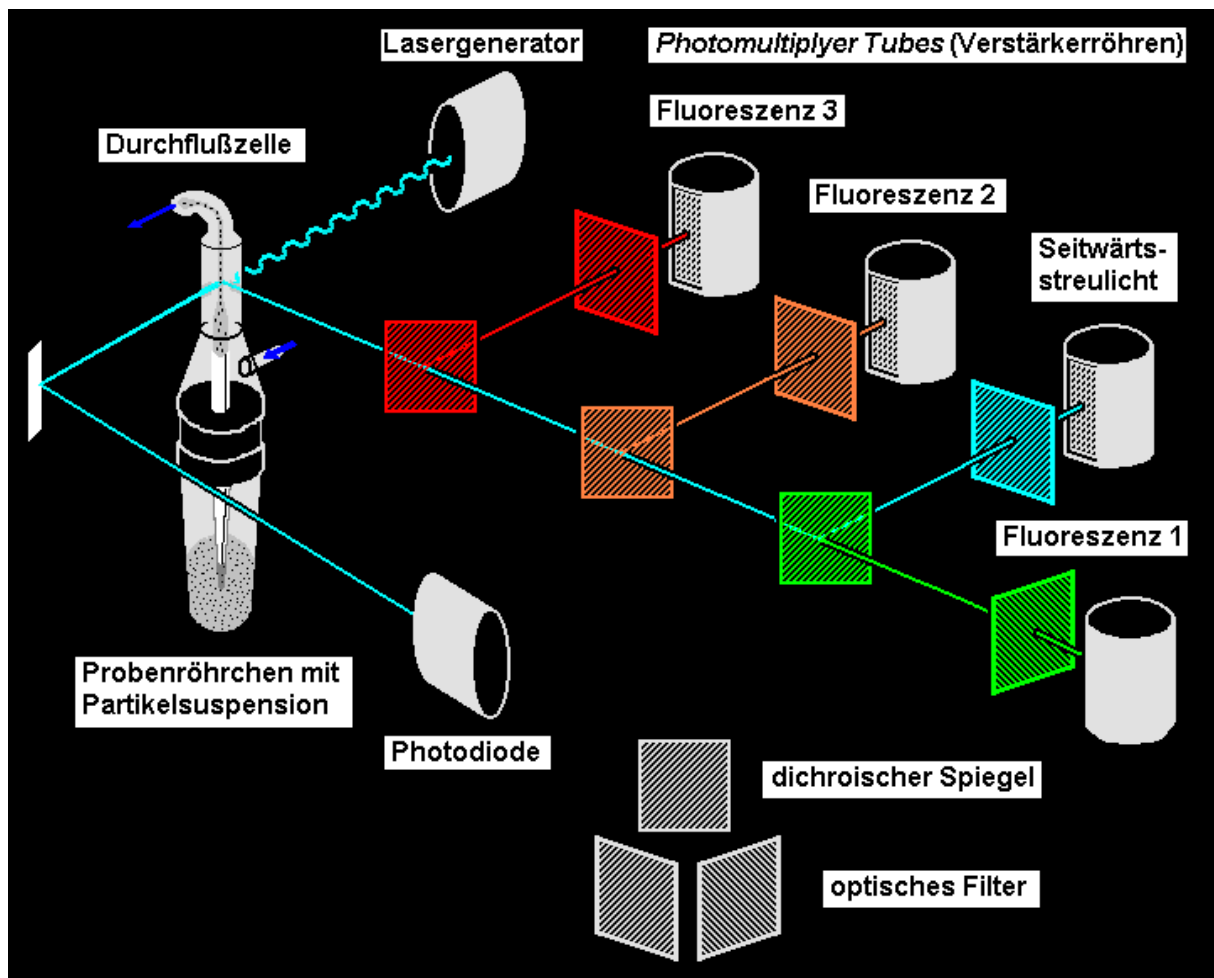


Abb. 1: Schema ausgewählter Hauptkomponenten eines Durchflußzytometers

Jedes Meßereignis ist somit durch eine Schar von Merkmalsausprägungen repräsentiert, die computergestützt in einen Datensatz umgewandelt und auf einem Datenträger gespeichert werden kann. Für einen der Parameter, üblicherweise die

relative Größe (Vorwärtsstreulicht), kann ein Schwellenwert eingestellt werden, der erreicht werden muß, damit einem Ereignis ein Datensatz zugeordnet wird. Ebenso wird in der Regel vorab der Umfang der Messung, also die Zahl der erfaßten Ereignisse, festgelegt. So erzeugt z.B. die Messung von 10 000 Partikeln mit Erfassung beider Streulicht- und dreier Fluoreszenzparameter eine Matrix von 50 000 Werten aus 10 000 Fünftupeln. Sie werden in einer Listmode-Datei gespeichert, die neben der Matrix auch Informationen über Art und Einstellung des Durchflußzytometers, Beginn und Ende der Messung und, soweit vom Bediener eingegeben, verwendete Reagenzien und Anmerkungen zum Experiment enthält (SEAMER *et al.*, 1997; SHAPIRO, 2001).

Aus der Datei können die Ergebnisse in vielfältiger Weise ausgelesen und weiter ausgewertet werden (Abb. 2, S. 30):

- Einzelne Parameter können anhand der Ereignishäufigkeit je Kanal in einem Histogramm dargestellt werden. Die Dichtefunktion kann als tabulierter Text ausgelesen und gespeichert oder für andere Anwendungen zur Verfügung gestellt werden.
- Die Korrelation von mehreren Parametern kann in zwei- oder dreidimensionalen Diagrammen dargestellt werden. Bei den zweidimensionalen werden Punktwolkendiagramme (*Dotplots*, für Streulichtparameter: *Scatterplots*), die korrelierte Daten zweier ausgewählter Parameter auf Basis jedes einzelnen Ereignisses darstellen, von Verteilungsdichte-Diagrammen unterschieden: 2D-Histogramme (*Density Plots*) stellen zwei Parameter als zweidimensionale Häufigkeitsverteilung dar, *Contour Plots* ordnen gleichen Häufigkeiten von Ereigniskombinationen eine gemeinsame Kennzeichnung analog den Höhenlinien auf einer Landkarte zu. Die Häufigkeiten einzelner Merkmalskombinationen lassen sich im *Perspective Plot* in der schrägen Aufsicht als "Gebirge" darstellen. Mit dreidimensionalen Drei-Parameter-Diagrammen kann z.B. die relative Expressionsdichte eines Antigens, anhand des Fluoreszenzsignals, in den über die Streulichteigenschaften unterscheidbaren Zellpopulationen dargestellt werden.

Ein wirksames Mittel für die nähere Analyse und detailliertere Auswertung durchflußzytometrischer Daten ist aber das elektronische Auswählen von Ereignissen durch sogenannte Regionen und logische Verknüpfen dieser Regionen zu sogenannten Gates. So können beispielsweise die Signale von strukturell intakten

Zellen mit niedriger Autofluoreszenz über den Bool-Operator "AND" (exklusives, logisches Und) mit den Ereignissen in eine Schnittmenge gebracht werden, die anhand ihrer Streulichteigenschaften als von Monozyten hervorgerufen erkannt worden sind. Daraus läßt sich wiederum ein Histogramm erstellen, aus dem die mittlere relative Fluoreszenzintensität (MFI) und damit die relative Antigendichte dieser Monozyten errechnet werden kann.

Die Durchflußzytometrie liefert relative Daten. Die Signalintensität hängt bei den Fluoreszenzparametern außer von gleichbleibenden Markierungsbedingungen auch von der Spezifität der Nachweisreaktion ab. Dies sind die Voraussetzungen, die bei einem Assay erfüllt sein müssen. Unterschiedliche Mengen an gebundenem bzw. umgesetzten Nachweisreagenz kennzeichnen dann die unterschiedlichen Einflüsse der variierten Versuchsbedingungen. Im Sinne der Vergleichbarkeit müssen aber auf Seiten der Messung gleiche Intensitäten zu verschiedenen Zeitpunkten gleiche Signale hervorrufen. Denn die Stärke der Lichtquelle (Laser, Lichtbogen etc.) nimmt mit zunehmendem Alter ab. Ebenso sinkt die Empfindlichkeit der Detektoren. Daher muß das Gerät mit Hilfe eines Standards regelmäßig kalibriert werden. Über die Detektorempfindlichkeit und elektronische Signalverstärkung werden die Intensitätswerte dabei der bekannten Signalstärke angepaßt.

Für die Grundeinstellung werden in der Regel Kalibrationspartikeln definierten Durchmessers eingesetzt, die ungefärbt zur Einstellung der Streulichtdetektoren sowie zusätzlich mit definierter Fluorochromierung zur Einstellung der Fluoreszenzdetektoren dienen. Mit biologischem Standardmaterial kann bei Bedarf, z.B. für DNA-Analysen, eine Feineinstellung vorgenommen werden.

Dem jeweiligen Fluoreszenzdetektor vorgeschaltet sind optische Bandpass-Filter, die möglichst die Bereiche außerhalb des Emissionsmaximums eines Fluorochroms sowie den Spektralbereich, in dem sich die Emissionsspektren zweier "benachbarter" Fluorochrome überschneiden, herausfiltern sollen. Dennoch spricht ein Teil des von einem Fluoreszenzfarbstoff emittierten Lichts praktisch immer auch einen nicht dafür vorgesehenen Detektor an. So wird die von Fluorescein-isothiocyanat (FITC) emittierte grüne Fluoreszenz über den ersten Fluoreszenzdetektor (FL-1) gemessen, streut aber auch in FL-2, den Detektor für Phycoerythrin (PE) und andere im orangen Bereich emittierende Fluorochrome. Der Einfluß dieser

Störstrahlung muß elektronisch kompensiert werden, und der Einstellung dieser Kompensation dienen ebenfalls die fluoreszierenden Standardpartikeln.

Die intrazelluläre Cytokinmarkierung mit durchflußzytometrischer Auswertung hat sich innerhalb weniger Jahre zur Standardmethode entwickelt. Die Mediatoren können auf Einzelzell-Ebene detektiert werden, und die Probenvorbereitung dauert, je nach Fragestellung, nur wenige Stunden.

Die Durchflußzytometrie wurde zum Nachweis von Adrenocorticotropem Hormon in Blutzellen von verschiedenen Tierarten eingesetzt. So wurde das Neuropeptid in Leukozyten des Wasserfroschs (*Rana esculenta*) mit Hilfe poly- und monoklonaler Antikörper und sekundärer Immunfluoreszenz detektiert (OTTAVIANI *et al.*, 1992b). Bei der Posthornschnecke (*Planorbarius corneus* L.) enthalten die zur Phagozytose von Bakterien befähigte Zellen nach immunocytochemischer mikroskopischer Analyse mit polyklonalen Antikörpern ACTH-immunreaktives Antigen. Es handelt sich um eine von zwei Hämozyten-Arten sowie Zellen mit Resorptionsfunktion aus dem Gastrointestinaltrakt. Der Gehalt an ACTH-immunreaktiven Antigenen in den Hämozyten wurde durchflußzytometrisch bestätigt (OTTAVIANI *et al.*, 1990; OTTAVIANI *et al.*, 1991).

Immunzytochemische Untersuchungen an Leukozyten des Menschen bzw. der Ratte wurden fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Konventionelle Studien erlaubten die Zuordnung der Fluoreszenz zu einer von fünf Intensitätsstufen (0 - 4⁺) nach visuellem Eindruck. Mit Hilfe der digitalen Bildauswertung von Aufnahmen mit dem konfokalen Laserscanning-Fluoreszenzmikroskop konnten die Intensitäten in Grauwerten dargestellt und quantifiziert werden (REDER, 1992; LYONS & BLALOCK, 1995).

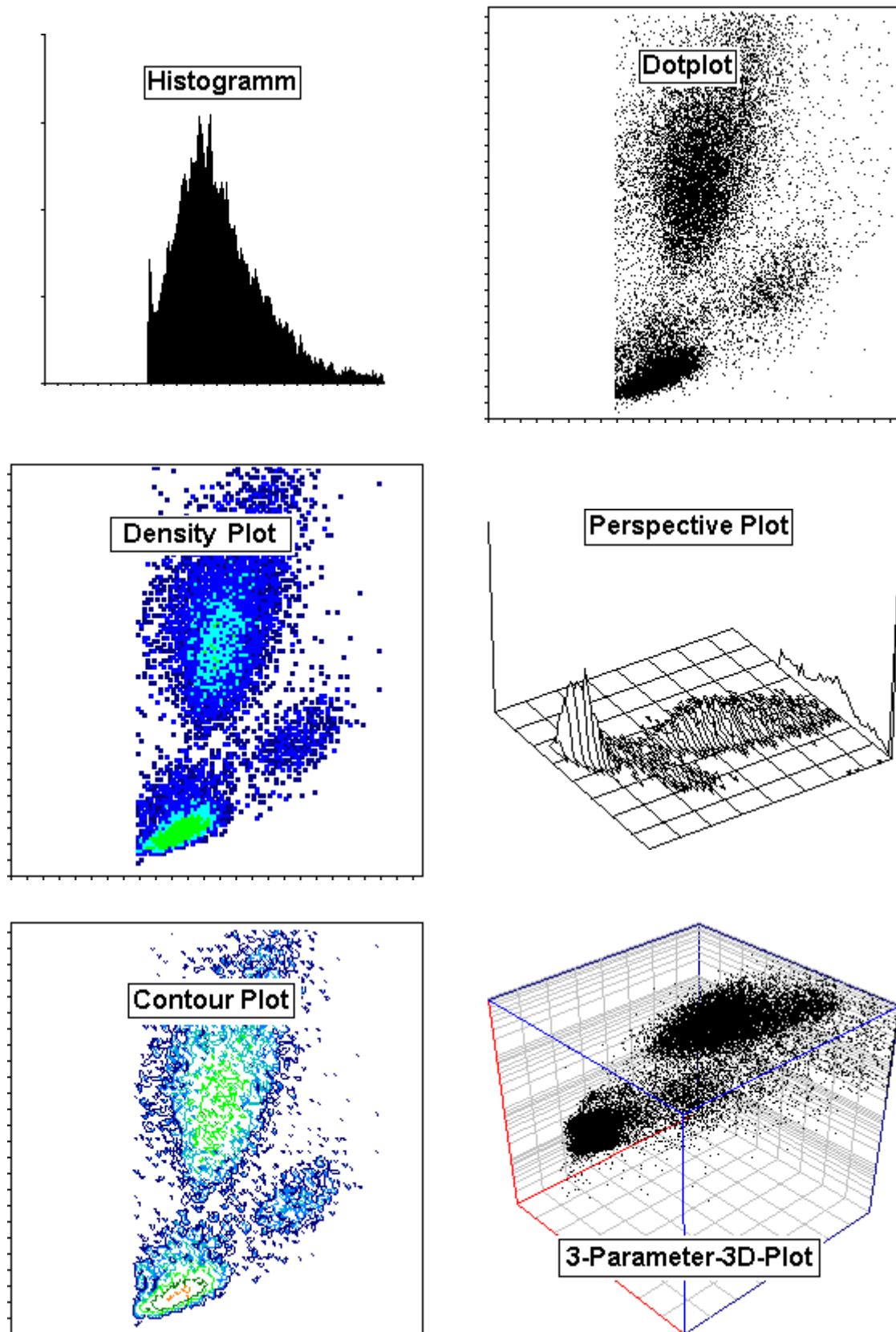


Abb. 2: Möglichkeiten der graphischen Darstellung durchflußzytometrischer Daten

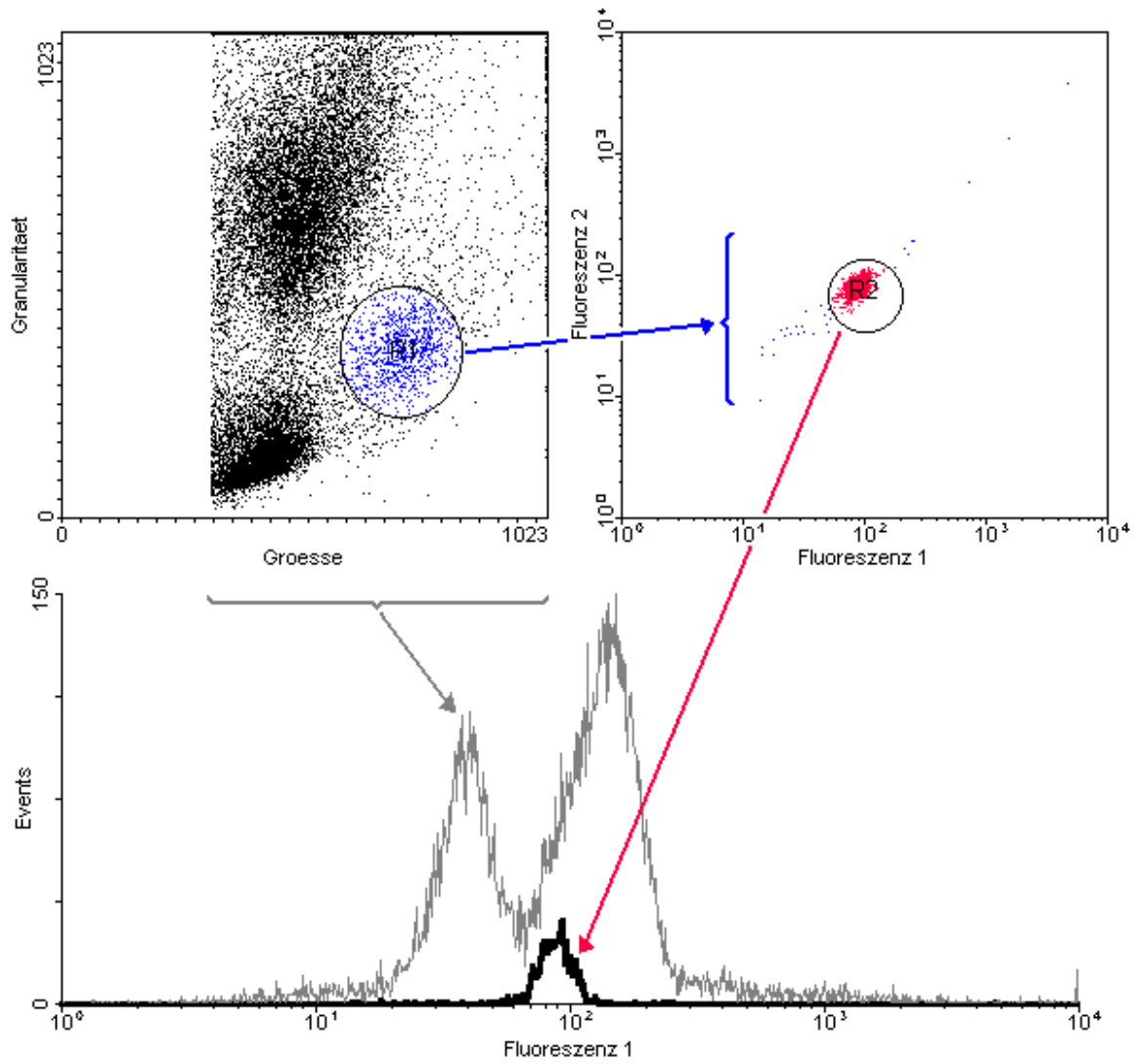


Abb. 3: Regionen und Gates in der Durchflußzytometrie

2 Material und Methoden

Die Vorversuche betrafen die Funktionalität und Spezifität des durchflußzytometrischen Detektionssystems sowie den Zellstoffwechsel unter leistungsphysiologischer Stimulation. In den Hauptversuchen sollte die Corticotropin(ACTH)-Expression durch Corticoliberin (CRH) und einschlägige ACTH-Induktoren beeinflusst werden.

2.1 Leistungsphysiologische Zellkultursysteme

Die Vorversuche wurden überwiegend mit mononukleären Leukozyten durchgeführt, wie sie auch in den Hauptversuchen eingesetzt wurden. Darüber hinaus wurden Hauptversuche mit komplettem *Buffy Coat* aus Spenderblut durchgeführt.

2.1.1 Zellkultur mit mononukleären Leukozyten

Mononukleäre Leukozyten wurden aus Spenderblut über Dichtegradienten-Zentrifugation angereichert (modifiziert nach BØYUM, 1968), in definierter Zellzahl über Nacht mit ACTH-Induktoren inkubiert und nach Formalin-Fixierung konserviert aufbewahrt.

Tab. 4: Materialien für die Zellkultur mit mononukleären Leukozyten.

Material	Spezifikation, Bezugsquellen, Formulierung
Spenderblut	Aliquots von <i>Buffy-Coats</i> aus Blutspendematerial vom Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin der Universität Bonn
Sterilbank	Sterile Werkbank Gelaire® TCA 72, Flow Laboratories, Meckenheim (Rheinland)

Tab. 4: Materialien für die Zellkultur mit mononukleären Leukozyten.

Material	Spezifikation, Bezugsquellen, Formulierung		
Zentrifugen- röhrchen	Polypropylen-Tubes	15 mL	50 mL
		Produktnummer (Prod.-Nr.)	
	Greiner, Solingen	188261 bzw. 188271	227261 bzw. 227270
	Nunc, Wiesbaden	366036 bzw. 366060	373660 bzw. 373687
DPBS	Sterile phosphatgepufferter Natriumchloridlösung, Dulbeccos Modifikation, ohne zweiwertige Kationen, Zellkultur-Grad		
	Biochrom	Prod.-Nr. L-1825	
	Invitrogen, Karlsruhe	Gibco™, Prod.-Nr. 14190-094	
	Sigma, Taufkirchen	Prod.-Nr. D-8537	
Pipetten	serologisch, einweg, Greiner: Volumen, Produktnummer (Prod.-Nr.)		
	1 mL, 604181	2 mL, 710180	5 mL, 606180
	10 mL, 607180	25 mL, 760180	
Gradient	Steriler Ficoll-Diatrizaot-Dichtegradient, $\rho = 1077$ g/L		
	Biochrom	Biocoll 1,077, Prod.-Nr. L6115	
	Sigma	Histopaque®-1077	Hybrimax®, Prod.-Nr. H-8889
Zentrifuge	temperierbar mit Ausschwingrotor		
	Heraeus, Hanau	Megafuge 1.0R	
		Varifuge K Typ 4500	
Zellkulturmedium aus			
• RPMI- Medium	Roswell Park Memorial Institute(RPMI)-1640		
	Biochrom	Prod.-Nr. F-1275	
	Invitrogen	Prod.-Nr. 11835-030	
	Sigma	Prod.-Nr. R-7509	
• FBS	Steriles fetales bovines Serum		
	Biochrom	Prod.-Nr. S-2113	
	Invitrogen	Prod.-Nr. 16250-086	
	Sigma	Prod.-Nr. F-2442	

Tab. 4: Materialien für die Zellkultur mit mononukleären Leukozyten.

Material	Spezifikation, Bezugsquellen, Formulierung
Zellzahl-Bestimmung	
• Trypanblau	Trypanblau-Lösung, 0,4 %, Prod.-Nr. T-8154, Sigma
• 96er-U-MTP	96-Well-Mikrotiterplatte, Rundboden, Nunc, Prod.-Nr. 163320
• Zählkammer	Hämacytometer Neubauer improved, doppelte Netzteilung, amtl. geeicht, Prod.-Nr. 717805 bzw. 717820, mit Borosilikat-Deckglas, Prod.-Nr. 723055, Brand, Wertheim
• Mikroskop	SM-LUX, Leitz, Wetzlar
• Rechner, Software	Palm m500, Palm, Wokingham, Berkshire, UK, mit Software-Schnittstelle SheetsToGo, Avantgo, München, zu Microsoft Excel, Microsoft, Unterschleissheim
Zellkulturmedium mit ACTH-Stimulatoren bzw. -Inhibitor	
• CRH	Corticotropin Releasing Factor, Prod.-Nr. C-3042, Sigma: 2102 µL 10 ⁻⁵ M Stammlösung aus 0,1 mg angesetzt
• LPS	Lipopolysaccharid aus <i>Escherichia coli</i> 055:B5, Zellkultur-Grad, Prod.-Nr. L-6529, Sigma
• NaCl	Natriumchlorid, Zellkultur-Grad, Prod.-Nr. S-5886, Sigma
• Dexamethason	Sigma, Prod.-Nr. 8893
Test des Zellstoffwechsels	
• 96er-F-MTP	96-Well-Mikrotiterplatte, Flachboden, Nunc, Prod.-Nr. 167008
• MTT	Cell Proliferation Kit I (MTT), Roche, Mannheim, Prod.-Nr. 1465007, bestehend aus <ul style="list-style-type: none"> - Arbeitslösung mit 5 mg mL⁻¹ 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) in PBS, unsteril; - Arbeitslösung für die Zell-Lysierung und MTT-Löslichkeitsvermittlung aus 10 % SDS in 0,01 M HCl.
• Photometer	Titertek Plus MS2 Reader für 96-Well-Mikrotiterplatten, ICN, Eschwege, mit Filtersatz 405 nm / 450 nm / 550 nm / 600 nm / 690 nm
Sekretions-Inhibitoren	
• Monensin	Sigma, Prod.-Nr. M-5273, Stammlösung zu 10 mM in 100% Ethanol
• Brefeldin A	Sigma, Prod.-Nr. B-6542, Stammlösung
Kulturgefäße	Sterile silikonisierte Glasröhrchen für die Spurenelemente-Bestimmung, 7,0 mL, 100 × 13 mm, Vacutainer, Prod.-Nr. 367737, Becton Dickinson, Heidelberg
Halterung	24-Well-Zellkulturplatten

Tab. 4: Materialien für die Zellkultur mit mononukleären Leukozyten.

Material	Spezifikation, Bezugsquellen, Formulierung		
	Greiner	Prod.-Nr. 662160	
	Nunc	Prod.-Nr. 143982	
Frischhaltefolie	Polyethylen-Haushaltsfolie, Plus Vertriebs GmbH, Mülheim/Ruhr		
Inkubator	Begasungsbrutschrank CO ₂ Auto Zero, Heraeus, Hanau		
Fixativ	Formaldehyd, 4%ig in DPBS, aus 37%iger Lösung, <i>p.a.</i> , Methanolstabilisiert, Prod.-Nr. 1.04003		
Waschlösung aus PBS, 0,5 % BSA, 0,1 % NaN ₃			
• PBS	Phosphatgepufferte Natriumchlorid-Lösung (technische Qualität, modifiziert nach Holtzhauer, 1997)		
	Reagenz	Sigma, Prod.-Nr.	Menge
	NaCl	S-9888	8,0 g
	Na ₂ HPO ₄	S-5136	1,08 g
	KH ₂ PO ₄	P-5379	0,2 g
	H ₂ O <i>bidest.</i>		<i>ad</i> 1000 mL
• BSA	Rinderserumalbumin, Fraktion V, Sigma, Prod.-Nr. A-9418		
• NaN ₃	Natriumazid, Sigma, Prod.-Nr. S-2002		

Aliquots von 10 mL *Buffy Coat* wurden in 50-mL-Zentrifugenröhrchen mit dem selben Volumen DPBS durch Invertieren behutsam bis zur Homogenität gemischt. In 15-mL-Zentrifugenröhrchen wurden je 6 mL dieser Mischung auf 5 mL Dichtegradient überschichtet und 30 min mit 1800 min⁻¹ bei RT zentrifugiert. Das danach im oberen Teil des Zentrifugenröhrchens befindliche Gemisch aus Blutplasma und DPBS wurde bis auf eine Schichtdicke von ca. 1 cm abgenommen. Die darunter, auf dem Gradienten liegende Interphase aus mononukleären Leukozyten und Thrombozyten wurde vorsichtig mit einer sterilen serologischen 2-mL-Kunststoffpipette in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt, wobei möglichst geringe Anteile des Gradienten erfaßt werden sollten.

Jedes 15-mL-Zentrifugenröhrchen wurde bis max. zu 1/3 mit Interphase gefüllt und mit dem ins restliche freie Volumen aufgefüllte DPBS behutsam bis zur Homogenität durchmischt. Die nachfolgende 10min Zentrifugation mit 1500 min⁻¹ bei RT resultierte in einer mit Thrombozyten angereicherten flüssigen Phase und einem Zellpellet im Konus des Zentrifugenröhrchens. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet behutsam aufgeklopft bzw. mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette in ca. 3 mL DPBS mit 0,5 % FBS (D.5B) resuspendiert.

An dieser Stelle kann das auf verschiedene Zentrifugenröhrchen verteilte Zellmaterial eines Spenders über jeweils mehrere kleine Volumina in einem Röhrchen zusammengeführt werden. Der Röhrcheninhalt wurde nach Auffüllen mit D.5B behutsam bis zur Homogenität durchmischt. Die nachfolgende 10min Zentrifugation mit 1200 min^{-1} bei RT resultierte in einem weiter von Thrombozyten abgereicherten Zellpellet, das entsprechend dem zuvor beschriebenen Verfahren resuspendiert wurde. Während das Pellet in Zellkulturmedium mit 20 % FBS-Anteil (R20B) aufgenommen wurde, wurde anhand der Trübung der Suspension darauf geachtet, daß die Zelldichte noch sicher über $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ lag.

Von der Zellsuspension wurden $20 \mu\text{L}$ in einem der 96 Wells einer Rundboden-Mikrotiterplatte mit dem selben Volumen Trypanblau-Lösung durch mehrfaches vorsichtiges Pipettieren homogen vermischt und im Hämacytometer ausgezählt (Hinweise bei LINDL & BAUER, 1994). Bei Zelldichten, die wesentlich über $6 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ – entspr. > 20 Zellen je Kleinquadrat - lagen, wurde im Verhältnis 1 + 9 vorverdünnt. Die Anzahlen vitaler und devitaler Zellen je Kleinquadrat wurden im Palm-Handheld erfaßt, das die Zelldichte und –vitalität aus - je nach vorliegender Zelldichte - ein bis vier Großquadraten auf Zellen pro mL hochrechnete. Mit R20B wurde auf eine Zellzahl von $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ eingestellt.

In RPMI-1640 wurden die ACTH-Induktoren aus den Stammlösungen bis auf das Doppelte der Endkonzentration verdünnt bzw. reines RPMI-1640 für den Kontrollansatz bereitgestellt. In Vorversuchen wurden in gleicher Weise Medien mit 2×10^{-8} bzw. 2×10^{-7} M Dexamethason (für Endkonzentrationen 1×10^{-8} bzw. 1×10^{-7} M) (Abb. 4, S. 37) und 0,45 / 0,9 / 1,35 / 1,8 % w/v NaCl (für Endkonzentrationen 0,225 / 0,45 / 0,675 / 0,9 %) eingesetzt. Durch Mischen von $500 \mu\text{L}$ der Zellsuspension mit $500 \mu\text{L}$ von einer dieser Lösungen ergab sich jeweils der komplette Ansatz (Tab. 5, S. 37).

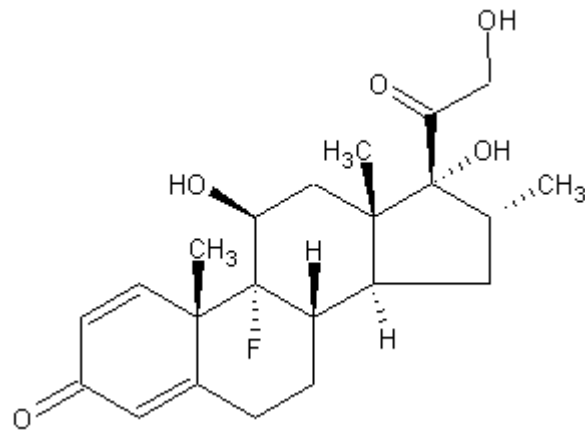


Abb. 4: Dexamethason - Inhibitor der ACTH-Synthese

Tab. 5: Herstellung von 1-mL-Proben aus Kulturmedien mit doppeltem Gehalt an Stimulatoren und aus Zellsuspension mit doppeltem Serumgehalt und doppelter Zelldichte.

500 μ L RPMI-1640

- ohne Zusatz bzw. mit 500 μ L RPMI-1640
- 2×10^{-7} M CRH bzw. + 20 % FBS
- 50 μ g (100 μ g mL⁻¹) LPS bzw. Zelldichte 1×10^6 mL⁻¹
- 0,8 % w/v NaCl



1000 μ L RPMI-1640 mit 10 % FBS, Zelldichte 5×10^5 mL⁻¹

- ohne Zusatz bzw. mit
- 10^{-7} M CRH bzw.
- 50 μ g mL⁻¹ LPS bzw.
- 0,4 % w/v NaCl,

in Vorversuchen

- 0,225 / 0,45 / 0,675 / 0,9 % w/v NaCl bzw.
- 10^{-8} M / 10^{-7} M Dexamethason.

Die Stoffwechselaktivität der PBMC aus sechs Blutspenden unter Einfluß von komplettem Medium mit Zusätzen von 0,225 / 0,45 / 0,675 bzw. 0,9 % w/v NaCl wurde in 200- μ L-Ansätzen in Flachboden-MTP mit 96 Wells untersucht. Sechsfach-Ansätze wurden für die letzten 4 h der Kultur mit je 10 μ L der (gelben) MTT-Arbeitslösung versetzt. Nach Ablauf der Inkubation und mikroskopischer Prüfung auf (blauviolette) Formazan-Kristalle (Abb. 5, S. 38) wurden die Zellen lysiert und das entstandene Formazan in Lösung gebracht. Die optische Dichte (OD) wurde mit dem ELISA-Reader bei einer Testwellenlänge von 550 nm mit einer Hintergrundsubtraktion bei 690 nm gemessen (MOSMANN, 1983; LINDL & BAUER, 1994), die Daten in Microsoft Excel übertragen und ausgewertet. Im Anschluß daran wurde gleicher Weise die Stoffwechselaktivität unter Einfluß von NaCl (+ 0,4 % w/v) bzw. LPS (50 μ g mL⁻¹) untersucht.

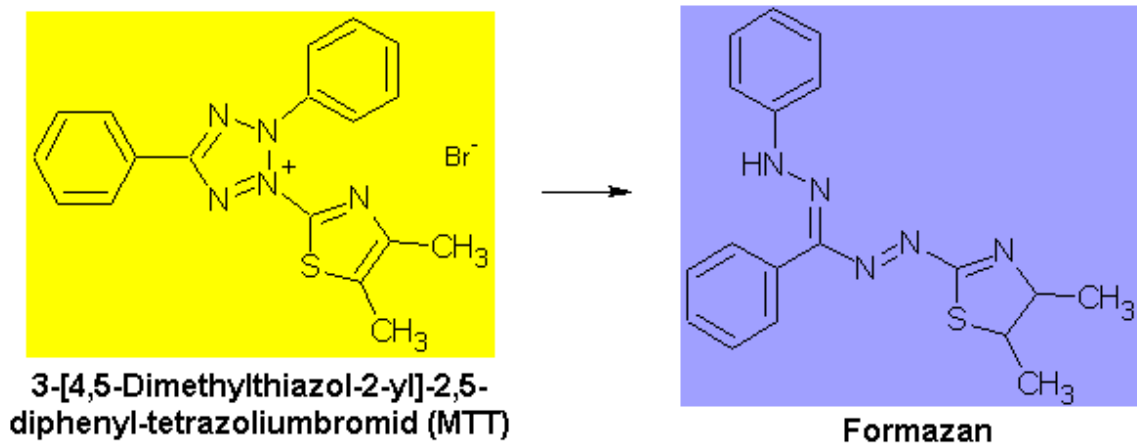


Abb. 5: Strukturen von MTT und seinem Metaboliten Formazan

Die Proben für die ACTH-Detektion wurden entweder direkt in 24-Well-Kulturplatten angesetzt, oder in silikonisierten Glasröhrchen und dann in 24-Well-Kulturplatten aufgestellt, in die zu diesem Zweck geeignete Stopfen eingepaßt waren. Im letzteren Fall waren auf den Ecken der Kulturplatten gleichhohe Plastikröhrchen in zwei übereinandersitzenden Stopfen aufgestellt. Diese hielten den Deckel der Kulturplatte auf Abstand zur Oberseite der Kulturröhrchen, so daß im Inkubator ungehinderter Gasaustausch mit den Proben sichergestellt war. Die Platten wurden zum Schutz vor Kontamination mit Frischhaltefolie verpackt (Abb. 6, S. 39).

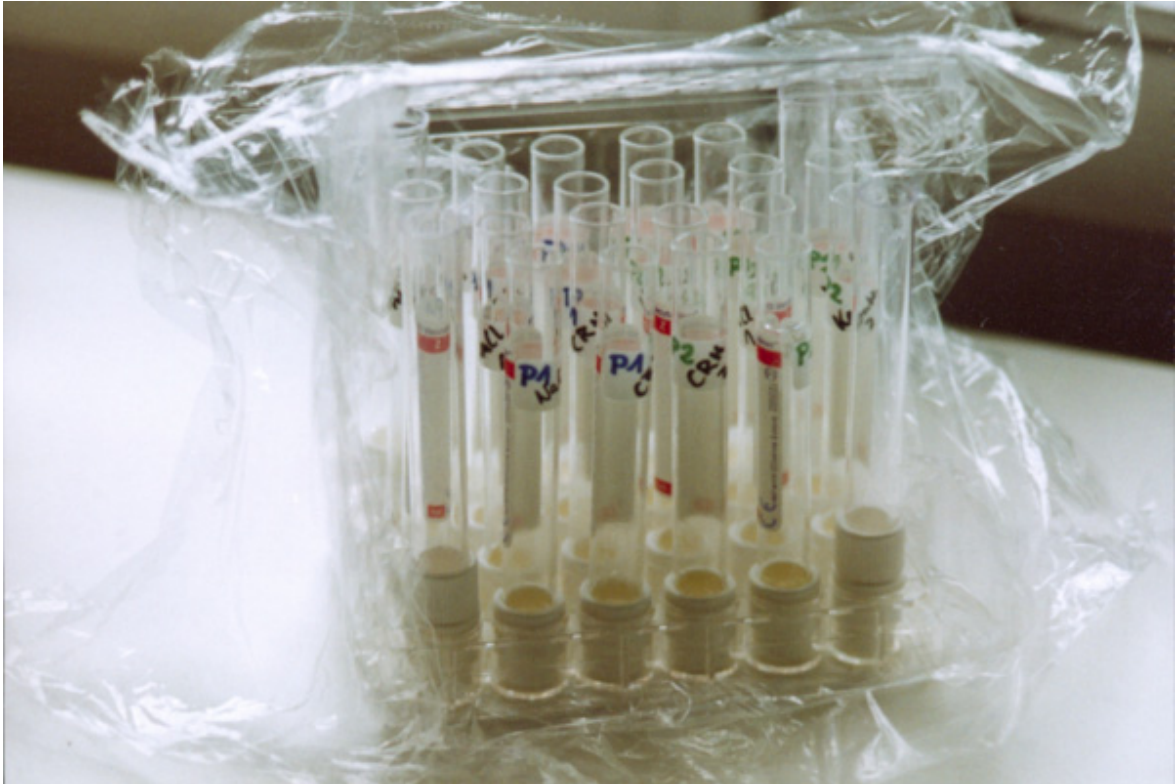


Abb. 6: Silikonisierte Glasröhrchen aufgestellt in Plastikstopfen in einer 24-Well-Zellkulturplatte

In Vorversuchen wurden die Inhibitoren des Golgi-Apparates Monensin und Brefeldin A (KARKMANN *et al.*, 1999; MISUMI *et al.*, 1986) (Abb. 7, S. 39) eingesetzt, die eine Sekretion des Antigens verhindern und zur intrazellulären Akkumulation führen sollen.

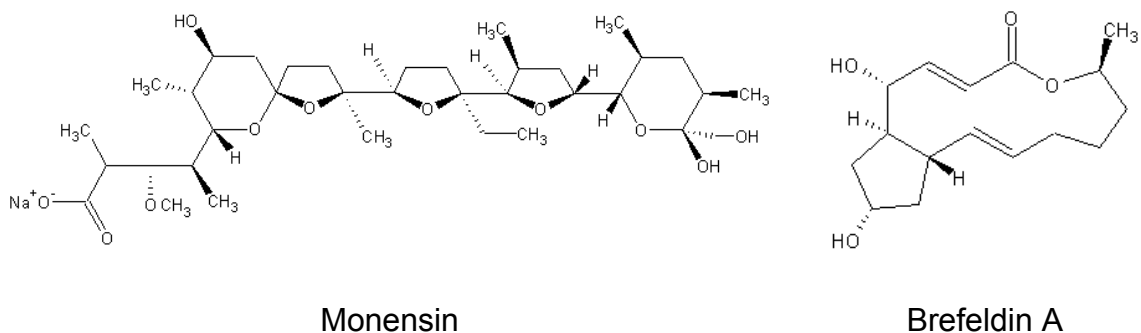


Abb. 7: Inhibitoren des Golgi-Apparates, eingesetzt zur Hemmung der Sekretion von zellulären Exportpeptiden

Nach Ablauf der Inkubationszeit von 18 bzw. 42 h wurden die Kultur-
röhrchen 10 min mit 2000 min^{-1} bei RT zentrifugiert, der Überstand mit Vakuum-

pumpe und Saugflasche abgenommen, das Zellpellet aufgeklopft und in 2 mL Formaldehyd-Fixativ über 20 min bei RT fixiert. Nach Auffüllen mit 3 mL PBS wurde wieder 10 min mit 2000 min^{-1} bei RT zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Zellpellet aufgeklopft und in 1 mL PBS / 0,5 % BSA / 0,01 % NaN_3 bis zur Markierung für die Durchflußzytometrie konserviert.

2.1.2 Zellkultur mit Vollblut

In diesem Ansatz wurde ein definiertes Volumen des Spenderblutes für 5 h in Zellkulturmedium mit ACTH-Induktoren inkubiert und nach Lysieren der Erythrozyten und Fixierung konserviert aufbewahrt.

Tab. 6: Materialien für die Zellkultur mit komplettem Blutspendematerial, die zusätzlich zu den in Kap. 2.1.1, S. 32, aufgezählten Posten gebraucht wurden.

Material	Spezifikation, Bezugsquellen, Formulierung
Eppendorf-Caps	Reaktionsgefäße, 1,5 mL, Eppendorf
Lyselösung	FACS™ Lysing Solution (Becton Dickinson, Heidelberg, Prod.-Nr. 92-0002), aus $10\times$ Stammlösung mit <i>Aqua ad iniect.</i> verdünnt

In 1,5-mL-Reaktionsgefäßen wurden je 850 μL Medium bzw. Medium mit Stimulatoren für die vorgesehenen Endkonzentrationen (s. Kap. 2.1.1) bezogen auf 1000 μL vorbereitet. Je 100 μL Blutspendematerial wurden hinzupipettiert, behutsam durchmischt und in 24-Well-Kulturplatten mit eingepaßten Stopfen aufgestellt. Die offenen Deckel der Reaktionsgefäße hielten den Deckel der Kulturplatte auf Abstand zur Oberseite, so daß im Inkubator ungehinderter Gasaustausch mit den Proben sichergestellt war. Die Kulturplatte wurde mit Frischhaltefolie verpackt. Nach 3 h wurden je 50 μL Monensin zu einer Endkonzentration von $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ für die letzten 2 h hinzugegeben (Tab. 7, S. 41).

Tab. 7: Herstellung von 1-mL-Proben aus Kulturmedien ohne bzw. mit Stimulatoren und Vollblut.

850 μL RPMI-1640	
<ul style="list-style-type: none"> • ohne Zusatz bzw. mit • $1,18 \times 10^{-7}$ M CRH bzw. + 100 μL Blutspendematierial • $58,83 \mu\text{g mL}^{-1}$ LPS bzw. • 0,47 % w/v NaCl 	
⇓	
950 μL RPMI-1640	nach 3 h:
<ul style="list-style-type: none"> • ohne Zusatz bzw. mit • $1,05 \times 10^{-7}$ M CRH bzw. • + • $52,63 \mu\text{g mL}^{-1}$ LPS bzw. • 0,42 % w/v NaCl 	50 μL RPMI-1640 mit 20 μM Monensin, in Vorversuchen Kontrollen ohne Monensin
⇓	
1000 μL RPMI-1640	
<ul style="list-style-type: none"> • ohne Zusatz bzw. mit • 1×10^{-7} M CRH bzw. • $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ LPS bzw. • 0,4 % w/v NaCl 	

Nach Ablauf der Inkubation wurden die Kulturröhrchen 10 min mit 2000 min^{-1} bei RT zentrifugiert, der Überstand mit Vakuumpumpe und Saugflasche abgenommen, das Zellpellet aufgeklopft, in 1 mL Lyselösung 15 min bei RT fixiert und die Erythrozyten lysiert. Nach 10min Zentrifugation mit 2000 min^{-1} bei RT wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet aufgeklopft und in 1 mL PBS / 0,5 % BSA / 0,01 % NaN_3 bis zur Antigen-Markierung für die Durchflußzytometrie konserviert.

2.2 Markierung und Detektion von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) und Zelldifferenzierungsmarkern (CD)

2.2.1 Markierung von ACTH und CD

Das Adrenocorticotrope Hormon wurde nach Permeabilisierung der Zellmembranen markiert, wodurch sowohl intrazellulär vorliegendes als auch gegebenenfalls in Membranrezeptoren extrazellulär gebundenes ACTH erfaßt wurde.

Tab. 8: Materialien für die Markierung und Detektion von ACTH und Immunphänotypen.

Material	Spezifikation, Bezugsquellen, Formulierung	
Probenröhrchen	Falcon® 2052, 12 × 75 mm, Rundboden, mit Verschuß, steril, Becton Dickinson	
Permeabilisierungslösung aus		
• Waschlösung	PBS mit BSA und NaN ₃ , s. Kap. 2.1.1 mit 0,5 % Saponin aus <i>Quillaja saponaria</i> , Sigma, Prod.-Nr. S-2149	
• Saponin	0,5 % w/v Saponin aus <i>Quillaja saponaria</i> , Sigma, Prod.-Nr. S-2149	
Antikörper (Ab)	Spezifität, Klon, Ig-Isotyp	Bezugsquelle, Produktnummer
• anti-(α)ACTH-Antikörper	gegen C-terminales Epitop, Klon 02A3, mu-IgG ₁	DAKO, Hamburg, M-3501
	gegen C-terminales Epitop, Klon 56, mu-IgG ₁	Biodesign, Saco / Maine, USA, über Dunn Labortechnik, Asbach, E54056M
	gegen N-terminales Epitop, Klon 57, mu-IgG ₁	Biodesign → Dunn, E54057M
• Isotyp-Kontrolle	α <i>Aspergillus-niger</i> -Glucose-Oxidase, Klon DAK-GO1, mu-IgG ₁ κ	DAKO, X 0931

Tab. 8: Materialien für die Markierung und Detektion von ACTH und Immunphänotypen.

Material	Spezifikation, Bezugsquellen, Formulierung
<ul style="list-style-type: none"> • Sekundär-antikörper 	<p>Kaninchen-αmu-Ig, F(ab)₂, FITC-konjugiert, aus Kaninchen DAKO, F 0313</p> <p>Kontrolle: Präimmun-F(ab)₂, FITC-konjugiert, aus Kaninchen DAKO, X 0929</p> <p>αmu-IgG₁ FITC, Klon A85-1, IgG₁ κ aus Ratte Becton Dickinson / Pharmingen, 553443</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Monozyten-marker 	<p>αCD14 PE, Klon MΦP9, Becton Dickinson, 347497</p> <p>mu-IgG2b κ</p>
<ul style="list-style-type: none"> • B-Lymphozyten-Marker 	<p>αCD20 PE, Klon B-H20, Diaclone, Besançon, Frankreich, über Hölzel Diagnostika, Köln, 854.152.010</p> <p>mu-IgG2a</p>
Kalibrierungspartikel	CaliBRITE™-Beads, Becton Dickinson, Prod.-Nr. 340486
Datenakquisition	
<ul style="list-style-type: none"> • Durchflußzytometer 	FACScan, Gerät Nr. 82776, Becton Dickinson, mit Argonionen-Laser, Emissionswellenlänge $\lambda = 488$ nm, 2 Streulichtparameter, Standard-Filtersatz für 3 Fluoreszenzparameter
<ul style="list-style-type: none"> • Computer 	Apple Macintosh Quadra 650, Apple Computer GmbH, Feldkirchen
<ul style="list-style-type: none"> • Betriebssystem 	MacOS 7.6.1
<ul style="list-style-type: none"> • Software 	FACSCComp für die Kalibration des Durchflußzytometers; CELLQuest 3.3 für die Datenakquisition
Auswertung der durchflußzytometrischen Daten	
<ul style="list-style-type: none"> • Computer 	PC, CPU Intel Pentium III, 128 MB RAM

Tab. 8: Materialien für die Markierung und Detektion von ACTH und Immunphänotypen.

Material	Spezifikation, Bezugsquellen, Formulierung
• Betriebssystem	Microsoft Windows 98 SE
• Software	WinMDI 2.8.13 vom 19.01.2000, Joseph Trotter, The Scripps Research Institute, FACS Core Facility, La Jolla, CA 92037, USA http://facs.scripps.edu/software.html für das Gating und Auslesen durchflußzytometrischer Daten Microsoft Word 97 SR-1 für die makrogestützte Umwandlung von Tabulatoren in Zeilenvorschübe Microsoft Excel 97 SR-1 für die Sammlung, Transformation und deskriptiv-statistische sowie Vorbereitung der analytisch-statistischen Auswertung

Jede Probe wurde in Aliquots zu je 300 µL auf drei Probenröhrchen für die durchflußzytometrische Bestimmung der Autofluoreszenz sowie der Fluoreszenz durch den Sekundärantikörper und nach spezifischer Färbung aufgeteilt. In Vorversuchen wurden darüber hinaus Isotypkontrollen mitgeführt und die Mengen an Primär- und Sekundärantikörper variiert. Diese vorbereitenden Untersuchungen wurden überwiegend mit dem monoklonalen Antikörper gegen ACTH (α ACTH-mAb) von DAKO (M 3501) und dem F(ab)₂-FITC gegen murines Ig (DAKO F 0313) durchgeführt.

Im ersten Schritt wurden die für die ACTH-Detektion vorgesehenen Proben mit je 20 µL einer Arbeitslösung aus einem Volumen α ACTH-mAb mit drei Volumina Permeabilisierungslösung und die Kontrollen mit einem entsprechenden Volumen ohne Antikörper versetzt. Nach 30min Inkubation bei 4 °C wurde mit je 2 mL Permeabilisierungslösung aufgefüllt und 10 min bei 4 °C mit 2000 min⁻¹ zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet aufgeklopft, wieder mit je 2 mL Permeabilisierungslösung aufgefüllt und abermals 10 min bei 4 °C mit 2000 min⁻¹ zentrifugiert (Inkubation des Primärantikörpers und

zweimaliges Waschen). Nachdem der Überstand abgesaugt und das Zellpellet aufgeklöpft worden war, wurde mit je 100 μL Permeabilisierungslösung aufgefüllt.

Im zweiten Schritt wurden wieder je Probe 20 μL Antikörperlösung vorbereitet, die für Vorversuche anteilig vom $\text{F(ab)}_2\text{-FITC}$ 4 μL bzw. für die Hauptversuche vom $\alpha\text{IgG}_1\text{-FITC}$ 0,4 μL enthielten. Nach Inkubation der ACTH- und Referenzproben mit dieser Färbelösung bzw. der Autofluoreszenzproben mit 20 μL reiner Permeabilisierungslösung für 30 min bei 4 °C wurde zweimal wie oben beschrieben gewaschen. Abschließend wurde das Zellpellet jeweils in 200 μL Waschlösung ohne Saponin aufgenommen und, bis zur durchflußzytometrischen Analyse innerhalb von 30 min, im Eiswasserbad bei Dunkelheit aufbewahrt.

2.2.2 Durchflußzytometrische Analyse

Die Proben wurden im kalibrierten Durchflußzytometer bei hohem Durchfluß gemessen. Es wurden je Probe 20 000 Ereignisse akquiriert. Der Schwellenwert für das Vorwärtsstreulicht wurde knapp unterhalb einer für kleine Lymphozyten typischen Mindestintensität gesetzt. Die Intensitätswerte für alle drei Fluoreszenzparameter wurden erfaßt. Dadurch stand ein Autofluoreszenzwert in den ACTH- und den Referenzproben auch dann zur Verfügung, wenn zwei unterschiedlich fluorochromierte Antikörper, z.B. $\alpha\text{ACTH}/\alpha\text{IgG}_1\text{-FITC}$ + $\alpha\text{CD14-PE}$, parallel eingesetzt wurden. Die Daten der fünf Parameter wurden im Listmode-Format gespeichert.

2.3 Aufbereitung der durchflußzytometrischen Daten

2.3.1 Spezifische Auswahl und Transfer

Aus den Daten wurden in WinMDI Dotplots generiert. In den Scatterplots wurden Regionen auf Ereignisse mit jeweils typischen Streulichteigenschaften für Lymphozyten, Monozyten und - im Falle der Stimulation von komplettem Blutspendematerial - neutrophile Granulozyten gelegt. Nach Gating dieser Populationen wurden in den jeweiligen Fluoreszenzplots Regionen auf alle Ereignisse mit für morphologisch intakte Zellen charakteristischen Autofluoreszenzwerten gelegt.

Durch Gating einer Schnittmenge aus Ereignissen mit geeigneten Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften konnten dann die Inhalte der Histogramme für Fluoreszenz 1, den "ACTH-Parameter", auf die aussagekräftigen Werte begrenzt werden (s. Abb. 3, S. 31).

Die Resultate der Vorversuche wurden qualitativ anhand der übereinandergeblendeten Histogramme (*histogram overlay*) beurteilt. Dabei sollte das Referenzsignal des Sekundärantikörpers möglichst gut mit der Autofluoreszenz übereinstimmen, während sich das Signal des kompletten Detektionssystems aus α ACTH-mAb und Sekundärantikörper möglichst deutlich von der Referenz abheben sollte.

Aus den Histogrammen der Hauptversuche wurden die auf die verschiedenen Kanäle entfallenen Häufigkeiten als tabulierte ASCII-Textdatei ausgelesen. Die Tabulatorbefehle wurden in MS Word mit Hilfe einer Makro-Routine in Zeilenvorschübe umgewandelt, wodurch ein Datenimport in Tabellenspalten von MS-Excel-Arbeitsblättern möglich wurde. Ein Direktimport aus dem tabulierten Format wäre dagegen wegen der zu geringen Zeilenlänge in Excel nicht erfolgreich gewesen. Die Daten der beiden experimentellen Grundansätze der Hauptversuche, 18h PBMC-Stimulation bzw. 5h Stimulation des kompletten Zellmaterials, wurden in jeweils einer Datei erfaßt. Jede dieser Dateien beruht somit auf Rohdaten aus 144 Listmode-Dateien. Der jeweilige Proband ist in der ersten Spalte des Tabellenblatts ausgewiesen, die fortlaufenden Kanalnummern der Histogramme in der nächsten Spalte. Die Spaltenköpfe geben Auskunft über die analysierte Zellart sowie den zugrundeliegenden experimentellen Ansatz und den Markierungszustand der Probe. Die Anzahl der Ereignisse je untersuchter Zellpopulation ist als kumulierte Häufigkeit über den nach individuellem Kanal aufgelisteten Ereignissen wiedergegeben (Abb. 8, S. 47).

	A	B	C	D	E	F	G	H	
1	Zellart		Lymphozyten			Lymphozyten			
2	Stimulation		Kontrolle 1			Kontrolle 2			
3	Proband	Kanal	Autofluor.	2nd Step	ACTH-Signal	Autofluor.	2nd Step	ACTH-Signal	Aut
4	Ereignisse		4230	4438	4469	4176	4233	4205	
5	1	1	3	0	0	0	0	0	0
6	1	2	0	0	0	0	0	0	0
7	1	3	0	0	0	0	0	0	0
8	1	4	0	0	0	0	0	0	0
9	1	5	0	0	0	0	0	0	0
10	1	6	0	0	0	0	0	0	0
11	1	7	0	0	0	0	0	0	0
12	1	8	0	0	0	0	0	0	0
13	1	9	0	0	0	0	0	0	0
14	1	10	0	0	0	0	0	0	0
15	1	11	0	0	0	0	0	0	0

Abb. 8: Erfassung und Zuordnung der Ereignishäufigkeiten je Fluoreszenzkanal

2.3.2 Datentransformation und Bestimmung der mittleren relativen Fluoreszenzintensität

Jeder der 1024 Kanäle entspricht einer Intensitätsklasse der relativen Fluoreszenz. Diese relativen Fluoreszenzintensitäten sind einem logarithmisch in vier Dekaden bis 10^4 eingeteilten Bereich zugeordnet, in dem der Kanal (K) 256 die Fluoreszenzintensität (FI) 10^1 , K 512 \rightarrow FI 10^2 , K 768 \rightarrow FI 10^3 und K 1024 \rightarrow FI 10^4 repräsentiert. Allgemein wird dieser Zusammenhang durch die Gleichung

$$FI = 10^{\left(\frac{K}{256}\right)}$$

beschrieben. In einem weiteren Tabellenblatt wurden die Kanalnummer auf Basis dieser Gleichung in Intensitäten umgerechnet und mit den zugehörigen Häufigkeiten zu Gesamtintensitäten pro Kanal multipliziert. Diese wurden zur totalen relativen Fluoreszenzintensität aufsummiert, aus der sich nach Division durch die Gesamtzahl der Ereignisse die mittlere relative Fluoreszenzintensität als Maß für die ACTH-Expression ergab (Abb. 9, S. 48).

Zur Bereinigung des mittleren relativen Fluoreszenzwertes wurde von dem Ergebnis aus der Probe mit α ACTH-Antikörper plus Sekundärantikörper der entsprechende Mittelwert des Hintergrundes (= Sekundärantikörper alleine) subtrahiert. Die beiden bereinigten Ergebnisse der Doppelbestimmung wurden gemittelt.

B5		=10^(18hroh!B5/256)						
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Zellart		Lymphozyten			Lymphozyten		
2	Stimulation		Kontrolle 1			Kontrolle 2		
3	Proband	Intensität	Autofluor.	2nd Step	ACTH-Signal	Autofluor.	2nd Step	ACTH-Signal
4	Gesamtfluoreszenz		38,7115354	122,269401	262,212971	39,8073789	79,4057989	216,829018
5	1	1,009	3,0271051	0	0	0	0	0
6	1	1,018	0	0	0	0	0	0
7	1	1,027	0	0	0	0	0	0
8	1	1,037	0	0	0	0	0	0
9	1	1,046	0	0	0	0	0	0
10	1	1,055	0	0	0	0	0	0
11	1	1,065	0	0	0	0	0	0
12	1	1,075	0	0	0	0	0	0

Abb. 9: In Fluoreszenzintensitäten transformierte Häufigkeitswerte aus Histogrammen

2.4 Statistische Auswertung

Die Daten aus der MTT-basierten Analyse des Zellstoffwechsels und aus den Stimulationsexperimenten wurden mit Hilfe des verteilungsunabhängigen Vorzeichen-Rangtests nach Wilcoxon auf statistische Abweichungen im Vergleich mit den Kontrollexperimenten untersucht. Bei der Fallzahl von 6 Probanden und einem Signifikanzniveau von 0,95 ($r[6; 0,975] = 0$) ist dieses Kriterium erfüllt, wenn alle Differenzwerte das gleiche Vorzeichen haben und damit die Rangsumme gleich der Summe der Ränge ist (WERNER, 1984).

2.5 Bewertung der Daten als leistungsphysiologische Parameter

Im Rahmen der leistungsphysiologischen Anpassungsreaktion wird, neben anderen Neuropeptiden, ACTH in Leukozyten induziert. Sofern sich der Anstieg der Expression intrazellulär in einer Zunahme des Antigens widerspiegelt, sollte durchflußzytometrisch eine höhere mittlere relative Fluoreszenzintensität detektierbar sein.

3 Ergebnisse

Die Vorversuche betrafen die Funktionalität und Spezifität des durchflußzytometrischen Detektionssystems sowie den Zellstoffwechsel unter leistungsphysiologischer Stimulation. Die durchflußzytometrischen Daten wurden qualitativ anhand übereinandergelegter Histogramme, der MTT-Test quantitativ photometrisch ausgewertet. Die Hauptversuche dienten dazu, die Höhe der Corticotropin(ACTH)-Basisexpression, die Stimulierbarkeit durch Corticoliberin (CRH) und den Einfluß spezifischer Induktoren halbquantitativ einzuschätzen. Zu diesem Zweck wurden die um das Hintergrundsignal bereinigte, mittleren relativen Fluoreszenzintensitäten bestimmt.

3.1 Ergebnisse der Vorversuche

Der Zellstoffwechsel wurde sowohl vom NaCl-hyperosmolaren Medium als auch durch LPS beeinflusst. Die in Vierteln bis auf ein zusätzliches isotonisches Äquivalent ansteigenden Salzkonzentrationen hatten nach 4h Inkubation bei + 0,225 % und +0,45 % geringe Auswirkungen auf die Metabolisierung von MTT durch die Leukozyten (92 bzw. 89 % der optischen Dichte (OD) der Kontrolle). Bei + 0,675 % und 0,9 %, war der Stoffwechsel deutlich gedämpft (58 bzw. 53 % OD), wobei vor der Auflösung mikroskopisch keine Formazan-Kristalle mehr erkennbar waren.

Die aus diesem Ergebnis für die weiteren Experimente abgeleitete Konzentration von + 0,4 % NaCl führte nach 18h Inkubation zu geringen, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ LPS zu einer signifikant gesteigerten Formazanbildung (104 % bzw. 131 % OD).

Die Vorversuche wurden hauptsächlich mit dem gegen den C-Terminus von ACTH gerichteten Antikörper, dem FITC-gekoppelten F(ab)₂-Fragment gegen murines Ig sowie den entsprechenden Isotyp-Kontrollen von DAKO durchgeführt. Verglichen mit Signalen aus der Markierung immunphänotypischer Antigene (CD) oder auch höher exprimierter Cytokine, wie z.B. Interferon- γ , hob sich das Signal nur schwach von der Referenz ab. Daher wurden größere Antikörpermengen, gemessen an der Zellzahl der Proben bis zum 6fachen des für CD oder Cytokine Üblichen, eingesetzt.

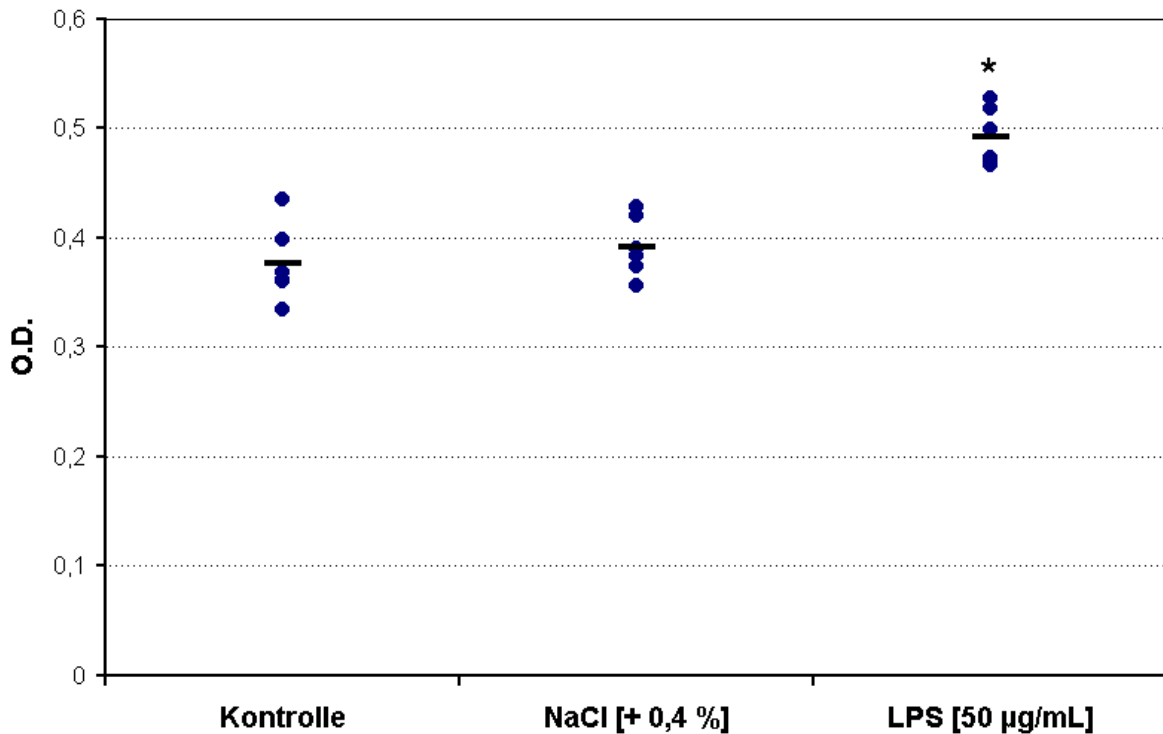


Abb. 10: Zellstoffwechsel von PBMC im MTT-Test nach Kultur in hyperosmolarem Medium [+ 0,4 % NaCl] bzw. LPS [50 µg mL⁻¹], p < 0,05

Die Fluoreszenz-Intensitäten (FI) aus den Isotyp-Kontrollansätzen lagen im Bereich der Referenzsignale [$\alpha\mu$ -Ig-F(ab)₂-FITC bzw. $\alpha\mu$ -IgG₁-FITC alleine]. Somit scheint keine wesentliche unspezifische Antikörperbindung stattgefunden zu haben. Die Fluoreszenz nahm nach CRH-Applikation zu und unter Einfluß von Dexamethason dosisabhängig ab (Abb. 11, S. 51).

Aus den einschlägigen Stimulationszeiten wurden 18 h und 42 h ausgewählt. Die längere Inkubation ergab keine weitere Zunahme der FI. Auch führten die Inhibitoren des Golgi-Apparates Monensin und Brefeldin A hier zu keiner Intensivierung, sondern zur Suppression der Fluoreszenz. Keine erkennbare ACTH-Expression lag nach Stimulation von 20 % komplettem Blutspendematernal in 80 % Zellkulturmedium in 24-Well-Zellkulturplatten über 18 bzw. 42 h vor.

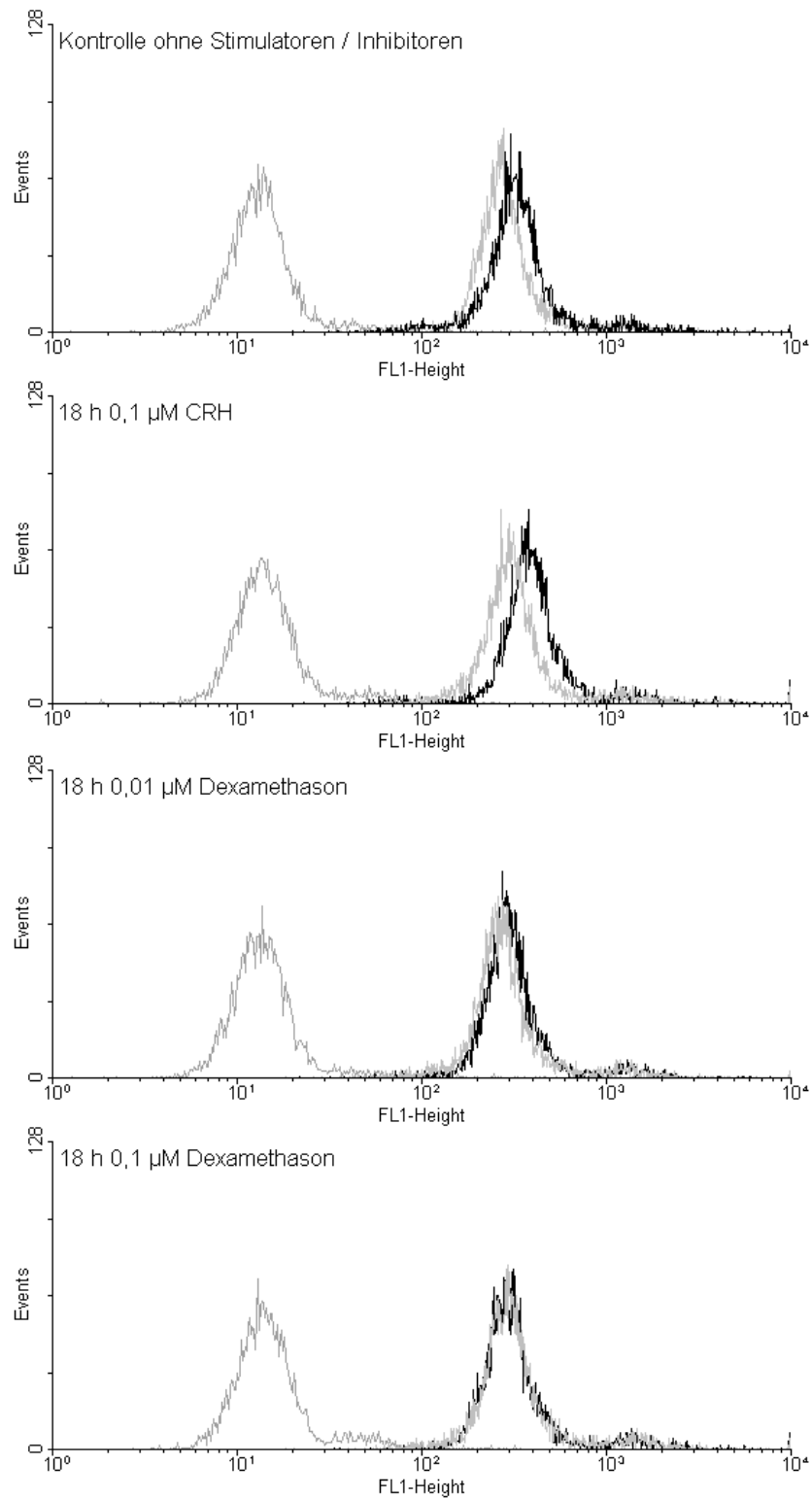


Abb. 11: **Durchflußzytometrische Detektion von Adrenocorticotropem Hormon in sezernierenden peripheren mononukleären Leukozyten mit Induktion durch Corticoliberin und Suppression durch Dexamethason.** Grau: Autofluoreszenz (links) bzw. Referenz (Sekundärantikörper), schwarz: ACTH-Signal.

Zum Abschluß der Vorversuche wurden vergleichende Untersuchungen mit drei für ACTH spezifischen monoklonalen Antikörpern durchgeführt. Der Klon 56 von Biodesign gegen ACTH-C-Terminus zeigte die deutlich günstigsten Bindungseigenschaften. Im direkten Vergleich rief Klon 02A3 von DAKO gegen ACTH-N-Terminus unter 5 % und Klon 57 von Biodesign gegen ACTH-C-Terminus weniger als 10 % der entsprechenden mittleren FI (MFI) hervor.

Der Sekretionsinhibitor Monensin führte in den Kulturen mit mononukleären Leukozyten über 18 h wiederum zu keiner Signalverstärkung. In 1-mL-Kulturen aus 10 % komplettem Blutspendematierial und 90 % Zellkulturmedium mit 5stündiger Stimulation bewirkte eine Monensin-Applikation über die letzten 2 h erhöhte Fluoreszenz, wohingegen eine Einwirkung über die gesamte Inkubationsdauer zu ausgeprägtem Zelluntergang führte.

Zum Abschluß der Vorversuche wurde beim Sekundärantikörper auf den spezifisch gegen murines IgG₁ gerichteten Klon umgestellt, der ohne erkennbare Kreuzreaktivität zusammen mit phänotypspezifischen nicht-IgG₁-mAb eingesetzt werden konnte.

3.2 Ergebnisse der Hauptversuche

Die Ergebnisse der Hauptversuche mit mononukleären Leukozyten nach Dichtegradienten-Zentrifugation (PBMC) bzw. mit komplettem Blutspendematierial sind in Tab. 9, S. 53, und in Abb. 12, S. 54, bzw. Abb. 13, S. 55, dargestellt.

Die Reaktivitäten der einzelnen Spendermaterialien waren heterogen und die durchschnittliche Basisexpression in den Kontrollen vergleichsweise hoch (min. 55 % der Intensität nach Stimulation). Beide Protokolle erbrachten tendenziell ähnliche Ergebnisse. Die kürzere Stimulation mit Kompletmaterial und Monensin ergab um ca. den Faktor 1,5 (Lymphozyten) bis 2 (Monozyten) höhere, mittlere relative Fluoreszenzintensitäten als der PBMC-Ansatz.

Keiner der Stimulatoren verursachte eine durchgehend konsistente Veränderung der Meßwerte. Im Vorzeichen-Rangtest nach Wilcoxon waren die Rangsummen in jedem Fall kleiner als die Gesamtsumme der Ränge, so daß sich auch bei deutlicher durchschnittlicher Signalzunahme keine statistische Signifikanz ergab.

Tab. 9: ACTH-Expression in unstimulierten sowie mit CRH, LPS und NaCl stimulierten Leukozyten, durchschnittliche [n = 6] mittlere relative Fluoreszenzintensität aus der Durchflußzytometrie.

	PBMC 18 h		Komplettmaterial 5 h, 2 h Monensin [1 µM]	
	Lymphozyten	Monozyten	Lymphozyten	Monozyten
Kontrolle	68,9	249,0	163,4	320,2
CRH [10^{-7} M]	74,6	273,4	165,6	578,4
LPS [50 µg mL ⁻¹]	70,0	(227,5)	174,2	-
NaCl [+ 0,4 %]	85,5	317,9	166,5	567,3

PBMC und Vollblut von jeweils 6 unabhängigen Spendern; der eingeklammerte Wert LPS-stimulierter Monozyten ist methodisch unsicher. Abkürzungen: PBMC = periphere mononukleäre Leukozyten, CRH = Corticotropin Releasing Hormon, LPS = Lipopolysaccharid (aus *Escherichia coli* 055:B5)

Die ACTH-Expression nach Stimulation mit 50 µg mL⁻¹ LPS wich bei den Lymphozyten jeweils nicht bzw. nicht erkennbar positiv (vergl. Kap. 2.5; S. 48) von der Basisexpression ab. Eine Monozytenpopulation war anhand ihrer Streulicht-Eigenschaften praktisch nicht mehr erkennbar. Daher sind die in Tab. 9, S. 53, und Abb. 12, S. 54, wiedergegebenen Werte aus den wenigen passenden Ereignissen nur als Hinweis aufzufassen. Eine Immunphänotypisierung schlug ebenfalls fehl, da im Gegensatz zur Kontrolle und den übrigen Stimulationen in den LPS-induzierten Proben kein CD14 identifizierbar war.

ACTH-Expression als mittlere relative Fluoreszenzintensität

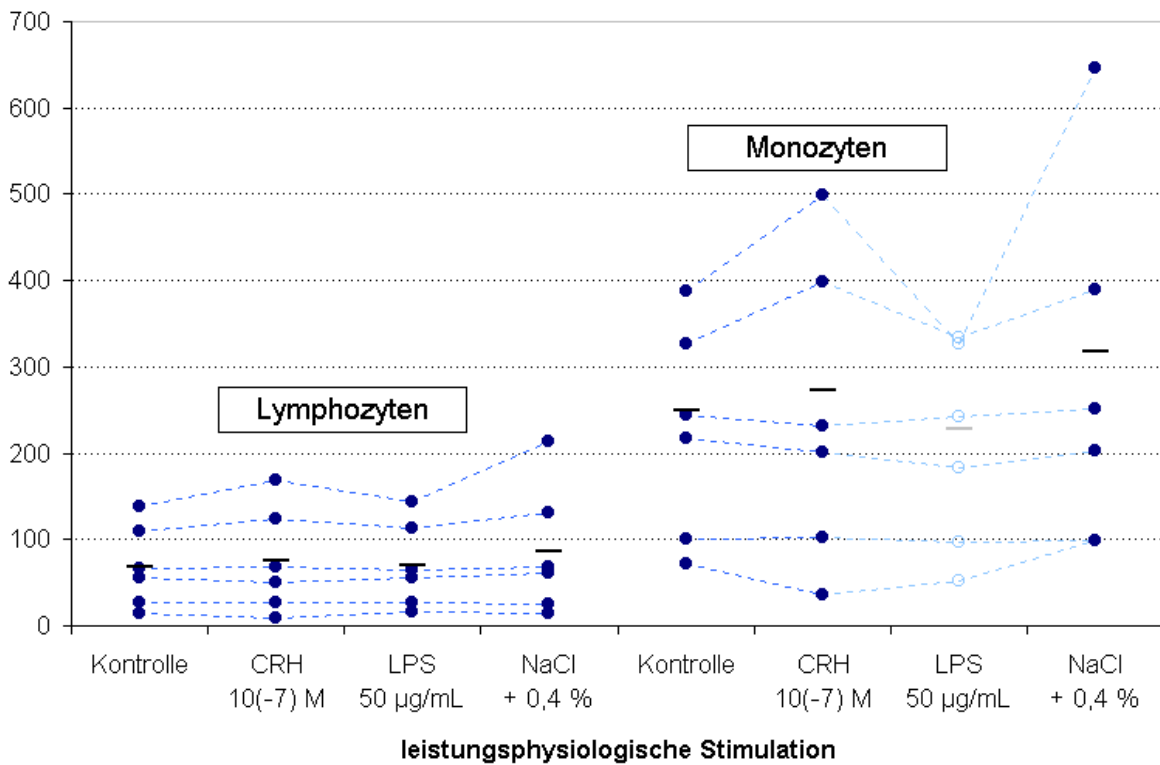


Abb. 12: ACTH-Expression in 18 h mit CRH [10^{-7} M], LPS [$50 \mu\text{g mL}^{-1}$], und NaCl [+ 0,4 % hyperosmolar] stimulierten, sezernierenden peripheren mono-nukleären Leukozyten, gemessen als durchschnittliche [$n = 6$] mittlere relative Fluoreszenzintensität im Durchflußzytometer. Linien verbinden jeweils zum selben Probanden gehörende Meßwerte; Balken kennzeichnen Mittelwerte; Werte LPS-stimulierter Monozyten sind methodisch unsicher; Abkürzungen: CRH = Corticotropin Releasing Hormon, LPS = Lipopolysaccharid (aus *Escherichia coli* 055:B5), MFI = mittlere relative Fluoreszenzintensität

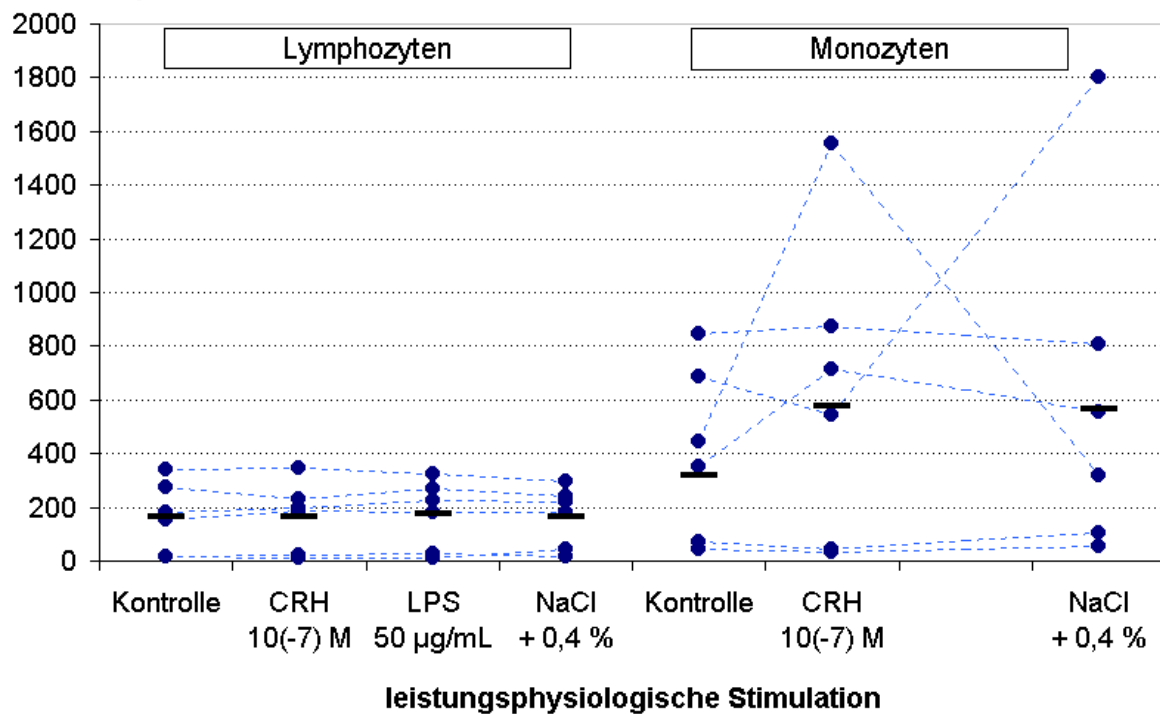
ACTH-Expression als mittlere relative Fluoreszenzintensität

Abb. 13: ACTH-Expression in 5 h mit CRH [10^{-7} M], LPS [$50 \mu\text{g mL}^{-1}$], und NaCl [+ 0,4 % hyperosmolar] stimulierten mononukleären Leukozyten aus Vollblut, gemessen als durchschnittliche [$n = 6$] relative Fluoreszenzintensität im Durchflußzytometer. Linien verbinden jeweils zum selben Probanden gehörende Meßwerte; Balken kennzeichnen Mittelwerte; Abkürzungen: CRH = Corticotropin Releasing Hormon, LPS = Lipopolysaccharid (aus *Escherichia coli* 055:B5), MFI = mittlere relative Fluoreszenzintensität

Innerhalb der Granulozytenpopulation war keine ACTH-Expression nachweisbar. Ein Vergleich der Signale von Referenz (Sekundärantikörper alleine) mit komplettem Dektektionssystem ergab keine konsistenten Unterschiede.

4 Diskussion

Primärkulturen humaner Leukozyten bieten als Bewertungsmodell für Substanzen und Konditionen, die Anpassungsreaktionen im Rahmen der zellulären Leistungsphysiologie induzieren, mehrere Vorteile:

- Leukozyten sind leicht zugänglich, und ihre Gewinnung stellt für gesunde Probanden nur eine minimale Belastung dar.
- Sie liegen in Suspension vor und erfüllen damit eine wichtige Voraussetzung für die durchflußzytometrische Analyse.
- Sie sind eine heterogene Zellpopulation, die in der Durchflußzytometrie anhand ihrer Streulichteigenschaften mikromorphologisch, über ihre charakteristischen membranständigen Differenzierungsantigene immunphänotypisch und funktionell sowie durch die Detektion intrazellulär synthetisierter Mediatoren weiter funktionell differenziert werden kann.
- Leukozyten lassen sich vergleichsweise einfach in Kultur nehmen. Die Reaktionszeiten, innerhalb derer sich Kenngrößen zellulärer leistungsphysiologischer Prozesse verändern, stimmen mit den einschlägigen Zellkulturzeiten für mononukleäre Leukozyten überein.

4.1 Aussagefähigkeit von *in-vitro*-Modellen der zellulären Leistungsphysiologie

Da wesentliche Teile der HPA-Achse im Kontext leukozytärer Mikromilieus abgebildet sind, können leistungsphysiologische Anpassungsreaktionen auf zellulärer Ebene *in vitro* bewertet werden. Mit Leukozyten als Repräsentanten des Abwehrsystems kommt den modellierten Prozessen gegebenenfalls eine direkte gesundheitsbezogene Bedeutung zu.

Allerdings sind *in vitro* modellierte Teilaspekte von physiologischen Abläufen, die *in vivo* einer übergeordneten Regulation unterliegen, in ihrer Aussagekraft grundsätzlich eingeschränkt, wenn Rückschlüsse auf den Organismus gezogen werden sollen. Jedoch ist das wissenschaftlich in Nervensystem, Endokrinum und Immunsystem unterteilte Netzwerk zwar komplex reguliert, es scheint in seiner Reaktivität auf erhöhte exogene Anforderungen aber

einem stereotypen Muster unterworfen zu sein. Diese als Adaptationssyndrom bezeichnete physiologische Gesetzmäßigkeit setzt Untersuchungen über reizspezifische Anpassungsreaktionen enge Grenzen (PACAK *et al.*, 1998).

Vor diesem Hintergrund liegt ein Vorteil von leistungsphysiologischen Zellkulturmodellen darin, daß Mediatoren einschließlich der beteiligten Neuropeptide im Zusammenhang eines leukozytären Mikromilieus wirken können. Damit bleiben die Reaktivität auf die darin vorhandenen Akteure bezogen und die ermittelten Effekte auf diesen Kontext beschränkt. So sind unter Umständen wesentlich spezifischere Aussagen möglich, als wenn ein Stimulator systemisch appliziert, also z.B. intravenös injiziert, und ein auf diesen Reiz hin sezernierter Mediator in analoger Weise, etwa als Plasmakonzentration, analysiert wird. Ein Nachteil besteht in der Empfindlichkeit gegenüber den Störgrößen, die durch die Aufarbeitung der Zellen und die Zellkultur eingebracht werden.

4.2 Vorversuche und Methodik

Unspezifische, d.h. hier: nicht durch die Stimulatoren bedingte, die ACTH-Expression betreffende Einflüsse sollten in der Zellkultur möglichst ausgeschlossen werden. Daher wurden die Bestandteile des kompletten Zellkulturmediums auf das unbedingt Erforderliche begrenzt.

Als Basis diente RPMI-1640-Medium ohne Phenolrot, das in sterilen, gegen Luftaustausch geschützten Aliquots gelagert wurde. Die pH-Stabilität während der Inkubation wurde durch CO₂-Begasung unterstützt. Auf Phenolrot als pH-Indikator, das *in vitro* oxidative Vorgänge beeinflusst (DUGAS *et al.*, 2000), wurde verzichtet. Auch das oft eingesetzte 2-Mercaptoethanol wurde nicht verwendet, da es die ACTH-Wirkung auf Leukozyten inhibiert (JOHNSON *et al.*, 1982). Antibiotika waren wegen der kurzen Kulturdauer nicht erforderlich.

Heparin wird als Antikoagulans für PBMC- und Vollblut-Kulturen empfohlen (McCoy Jr., 2001). Insbesondere in Studien zur Wirkung von LPS auf Monozyten ist es Ethylendiamintetraacetat (EDTA) vorzuziehen (BRUNIALTI *et al.*, 2002).

Monozyten sind eine in der zellulären Leistungsphysiologie wichtige Leukozytenpopulation. Mikroskopisch und durchflußzytometrisch war erkennbar, daß ein großer Teil dieser Zellen in den Kulturplatten adhärent geworden und

dadurch selektiv abgereichert worden war. Im Eiswasserbad vorgekühltes Medium bzw. PBS und vorsichtiges Pipettieren brachten wenige Zellen zusätzlich in Suspension und schädigten sie unverhältnismäßig stark. Daher wurde zum Ende der Vorversuche hin und für die Hauptversuche mit PBMC auf silikonisierte Glasröhrchen umgestellt.

Corticoliberin diente in den Vorversuchen der ACTH-Induktion, vor allem aber validierte es die Funktionalität und Spezifität des Detektionssystems. In den Hauptversuchen sollte es ein Standard sein, an dessen Effekt die Wirksamkeit der beiden Stimulatoren LPS und Hyperosmolarität abgeschätzt werden sollte.

Da Hinweise aus der Durchflußzytometrie vorlagen, daß bereits 5 % isotonische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl w/v) im Zellkulturmedium als Stimulator wirken können (SCHWAN & LINSCHIED, unveröffentlicht), wurde, statt eine Stammlösung von Zellkulturmedium unvollständig zu verdünnen (KRAVCHENCO & FURALEV, 1994; Kap. 1.5, S. 22), einer normalen Arbeitslösung NaCl zugesetzt. Aus Untersuchungen zur Intensität des Zellstoffwechsels ergab sich eine Konzentration von + 0,4 % als angemessen.

Vor dem Hintergrund der im Vergleich zum CRH-Effekt hohen intrazellulären ACTH-Basisexpression wurde für die Hauptversuche eine hohe LPS-Konzentration ausgewählt, deren Größenordnung einschlägig als geeignet ausgewiesen war (HARBOUR-McMENAMIN *et al.*, 1985; KRAVCHENCO & FURALEV, 1994; LYONS & BLALOCK, 1995; DOMINGUEZ-GERPE & LEFKOVITS, 1996). Da der Stoffwechsel von Leukozyten, die für 18 h mit $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ LPS inkubiert worden waren, signifikant über dem der Kontrollzellen lag, stand die Vitalität nicht infrage.

In zahlreichen Studien zur Expression von Mediatoren wurden Inhibitoren des Golgi-Apparates eingesetzt, die eine Sekretion der Exportprodukte verhindern und zur intrazellulären Akkumulation des Antigens führen. In Tab. 10, S. 59, sind exemplarisch einige dieser Arbeiten und die darin verwendeten Konzentrationen von Monensin und Brefeldin A aufgeführt. In den Vorversuchen zur ACTH-Stimulation in Leukozyten zeigte sich bei PBMC allgemein ein hemmender Effekt beider Wirkstoffe. Die Signalverstärkung durch Monensin während der letzten beiden Stunden der 5h Kultur von 10 % komplettem Blutspendematernal in 90 %

Zellkulturmedium war trotz der zytotoxischen Wirkung einer 5h Applikation Anlaß, den Golgi-Inhibitor in gleicher Weise während der Hauptversuche einzusetzen.

Tab. 10: Monensin- und Brefeldin-A-Konzentrationen und Inkubationszeiten zur Sekretionsinhibition vor der durchflußzytometrischen Analyse.

Monensin (Mon.)	Brefeldin A (BfA)	Autoren
1 μM , 1 - 12 h		VITALE <i>et al.</i> , 2000
2 μM , 6 - 12 h		BARAN <i>et al.</i> , 2001
2 μM , 16 h		SULLIVAN <i>et al.</i> , 2000
1,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (2,5 μM), 4 - 48 h		ROSTAING <i>et al.</i> , 1999
	5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 2 h	KARKMANN <i>et al.</i> , 1999
2 μM , 3 - 12 h	1,4 μM (0,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 3 - 12 h	SCHUERWEGH <i>et al.</i> , 2001
	10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 6 h oder 2 μM Mon. + 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ BfA, 6 h	BUENO <i>et al.</i> , 2001
6 μM , 4 h	20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 4 h	MENDES <i>et al.</i> , 2000

Intrazelluläre Antigene müssen den Antikörpern, mit denen sie markiert werden sollen, zugänglich gemacht werden. Zu diesem Zweck werden die Zellmembran und die Membranen der Kompartimente, die das Antigen enthalten, permeabilisiert. Zuvor wird die Zelle fixiert und damit die Antigene in ihrem jeweiligen Kompartiment verankert. Dadurch werden Verluste bei der Zellpermeabilisierung vermindert. Die hier untersuchten, ACTH-exprimierenden Leukozyten wurden mit dem nicht-koagulierenden Standard-Fixativ Formaldehyd behandelt (ASSENMACHER *et al.*, 1994; KARKMANN *et al.*, 1999; KOESTER & BOLTON, 2001a).

Saponin, das sich aus *Quillaja saponaria* (*Rosaceae*) gewinnen läßt, ist ein Standardreagenz zum permeabilisieren von Leukozyten (JACOB *et al.*, 1991; ASSENMACHER *et al.*, 1994; SCHAUER *et al.*, 1996; KARKMANN *et al.*, 1999). Obwohl

erprobte Alternativmethoden existieren und - wie auch für Golgi-Inhibition und Fixierung - Fertigpräparate im Handel sind (MILLARD *et al.*, 1998; BARAN *et al.*, 2001), lieferte Saponin im leistungsphysiologischen Zellkulturmodell konsistente Ergebnisse (BACHELET *et al.*, 1998) und sollte in Untersuchungen eingesetzt werden, in denen es um Aussagen über die Antigenmenge geht (KOESTER & BOLTON, 2001a).

4.3 Ergebnisdiskussion

Die drei wesentlichen Ergebnisse der Vorversuche bestätigen die Funktionsfähigkeit und Spezifität des Detektionssystems:

- Mit einem für die Immunhistochemie entwickelten, in vergleichsweise hoher Konzentration eingesetzten, murinen monoklonalen Antikörper (mAb) wurde ACTH in humanen Leukozyten des peripheren Blutes markiert. Durch sekundäre Immunfluoreszenz mit Hilfe eines fluorochromierten divalenten antigenbindenden Antikörperfragments [α mu-Ig-F(ab)₂-FITC] wurde das Peptid durchflußzytometrisch detektierbar. Kontrollansätze mit unspezifischem Immunglobulin(Ig)-Isotyp bestätigten, daß die Markierung antigenspezifisch war.
- Ausgehend von einer deutlichen basalen ACTH-Expression kam es unter dem Einfluß von Corticoliberin in einschlägiger Konzentration (10^{-7} M) zur ACTH-Induktion, die unter 10^{-8} M Dexamethason partiell und unter 10^{-7} M Dexamethason komplett inhibiert wurde. Auch dieser Befund bestätigt die Spezifität der Bindung.
- Gleiche Konzentrationen von monoklonalen Antikörpern (mAb) eines anderen Herstellers (Biosdesign) mit unterschiedlicher Spezifität (ACTH-N- bzw. -C-Terminus, Klon 57 bzw. 56) führten zu deutlich unterschiedlicher Markierung. So können die schwächer markierenden Antikörper als unbeabsichtigte Isotypkontrolle angesehen werden.

In den Hauptversuchen wurde zusätzlich zu Corticoliberin als einschlägiger Induktor der ACTH-Expression in Leukozyten Lipopolysaccharid (LPS) bzw. NaCl-hyperosmolares Medium als Stimulator eingesetzt. Die Expressionsniveaus unterlagen in dem verwendeten Blutspendematernal deutlichen individuellen Unterschieden. Infolge dieser Heterogenität waren die im Durchschnitt relativ

deutlichen Zunahmen der ACTH-Expression unter Einfluß von Corticoliberin und von NaCl statistisch nicht signifikant. Die für CRH vorgesehene Funktion eines Standardstimulators für ACTH war ebenfalls nicht erfüllt.

Mit ihrem Isotyp IgG₁ gehören die kommerziell verfügbaren murinen monoklonalen Antikörper (mAb) gegen ACTH zu der Immunglobulin-Subklasse, mit der auch die meisten Immunphänotypen (CD u.a.) und Mediatoren (Cytokine) durchflußzytometrisch detektiert werden. Indem in den Hauptversuchen PE-fluorochromierte α CD20- und α CD14-mAb anderer Subklassen sowie ein spezifisch gegen murines IgG₁ gerichteter, FITC-konjugierter Antikörper in Kombination eingesetzt wurde, wurden Aussagen über die ACTH-Expression in Leukozyten-Subpopulationen möglich.

Die Markierung von CD14 diente dazu, abzusichern, daß die Monozyten anhand ihrer Streulichteigenschaften erfolgreich ausgewählt worden waren. Durch Detektion von CD20 wurde deutlich, daß die zum Teil inhomogenen Fluoreszenzintensitäten (im durchflußzytometrischen Fluoreszenzdiagramm) innerhalb der im Streulichtdiagramm selektierten Lymphozytenpopulation nicht mit dem Immunphänotyp zusammenhingen, soweit dies aus der Färbung deutlich werden konnte. In bezug auf die Frage, bei welcher Lymphozytenpopulation die ACTH-Synthese bevorzugt induzierbar ist (KRAVCHENCO & FURALEV, 1994; LYONS & BLALOCK, 1995; DOMINGUEZ-GERPE & LEFKOVITS, 1996), brachte dieser Ansatz daher keine zusätzlichen Erkenntnisse.

Die durchschnittlichen Basiswerte der ACTH-Expression, gemessen als relative Fluoreszenzintensität, lagen stets über der Hälfte des Durchschnitts der stimulierten Proben, d.h. der durchschnittliche Stimulationsindex lag in jedem Fall unter 2. Dieser Befund steht im Kontrast zu im Kap. 1.5, S. 22, dargestellten, zum Teil wesentlich höheren Literaturwerten. Hierbei sind methodische Unterschiede zu beachten. Das durchflußzytometrisch detektierte ACTH war zellgebunden. Die PBMC sezernierten zum Zeitpunkt ihrer Fixierung uneingeschränkt, die Sekretion der Leukozyten aus Kompletmaterial war durch Monensin blockiert, worin die höhere relative Fluoreszenz trotz kürzerer - nach einschlägigen Maßstäben suboptimal kurzer (SMITH & BLALOCK, 1981; SMITH *et al.*, 1986; KRAVCHENCO & FURALEV, 1994; LYONS & BLALOCK, 1995) - Stimulation begründet liegen könnte. In quantitativen Studien und Bioassays, die deutlichere Unterschiede dokumentierten

(SMITH & BLALOCK, 1981; KRAVCHENCO & FURALEV, 1994) wurde ACTH aus Zellkulturüberständen nachgewiesen, wo es wahrscheinlich anderen stoffkinetischen Einflüssen als in den Zellen unterlag. Quantitative Studien mit intrazellulärer ACTH-Detektion nutzten Zell-Lysate unstimulierter Hämocyten niederer Vertebraten (OTTAVIANI *et al.*, 1992b) bzw. einer humanen Zelllinie (H9-T-Lymphom), die mit dem Glykoprotein gp120 aus HIV stimuliert wurde und unter diesem Einfluß eine signifikante, aber ebenfalls nur leicht gesteigerte ACTH-Synthese (ca. $\times 1,7$) zeigte (HASHEMI *et al.*, 1998).

In Untersuchungen mit fluoreszenzmikroskopischer Auswertung wurden die Signale in visuelle Intensitätsklassen (Scores) eingeteilt und ergaben maximale Stimulationsindices um 5 (REDER, 1992) oder erfaßten den prozentualen Anteil immunreaktiver Zellen (SMITH & BLALOCK, 1981; LYONS & BLALOCK, 1995).

Aus Kulturgefäßen gehen Stoffe in Lösung (HELMRICH & BARNES, 1998), die nicht unbedingt zelltoxische, sondern z.B. wachstumsfördernde (LINCOLN & GABRIDGE, 1998) oder hormonelle Wirkungen (ISHIKAWA *et al.*, 2001) ausüben können. Ob und inwieweit sie die ACTH-Expression beeinflussen, ist nicht bekannt. Auch die in den Hauptversuchen eingesetzten, silikonisierten Glasröhrchen können kontaminierende Elemente an das Medium abgeben, unter denen sich toxische Schwermetalle befinden. Der Hersteller (Becton Dickinson) gibt im Datenblatt Maximalwerte aus der atomabsorptionsspektrometrischen Analyse nach 4h wässriger Extraktion an:

Calcium	400,0 µg/L	Magnesium	60,0 µg/L	Eisen	60,0 µg/L
Zink	40,0 µg/L	Kupfer	8,0 µg/L	Blei	2,5 µg/L
Mangan	1,5 µg/L	Arsen	1,0 µg/L	Chrom	0,9 µg/L
Antimon	0,8 µg/L	Cadmium	0,6 µg/L		

Unter LPS-Einfluß war bei der gewählten Konzentration von $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ weder bei der Über-Nacht-Stimulation von mononukleären Zellen alleine, noch bei der 5stündigen Stimulation des kompletten Blutspendematerials eine Zunahme der ACTH-Expression erkennbar. Vielmehr büßten die Monozyten weitgehend ihre strukturelle Integrität ein, so daß sie praktisch nicht mehr anhand ihrer Streulichteigenschaften identifizierbar waren. Auch die Detektion des immunphänotypischen Markers für Monozyten, CD14, mit Hilfe eines fluoro-

chromierten monoklonalen Antikörpers schlug fehl. Da die Markierung an permeabilisierten Zellen versucht wurde, ist davon auszugehen, daß das Fehlen der CD14-Moleküle kein Nebeneffekt der Anwendung des Sekretionsinhibitors Monensin war. In den nicht mit LPS behandelten Proben war das CD14-Antigen, dessen Expression u.a. der Regulation durch die HPA-Achse unterliegt (NOCKHER & SCHERBERICH, 1997), im erwarteten Umfang markiert.

Zur Wirkung unterschiedlicher LPS-Konzentrationen auf die Vitalität von peripheren mononukleären Leukozyten und die CD14-Expression durch bzw. -Antigendichte auf/in Monozyten liegen zum Teil kontroverse Ergebnisse vor. So waren unter dem Einfluß von 10 ng mL^{-1} aus den *Salmonella-enterica*-Serotypen *typhimurium* und *abortusequi* sowie aus *Escherichia coli* Re und anderer mikrobieller Zellwandbestandteile membrangebundenes und lösliches CD14 von humanen Monozyten nach 44stündiger Kultur erhöht, und schon 10 pg mL^{-1} LPS stimulieren die monozytäre CD14-Membranexpression. Ab 100 ng mL^{-1} LPS schien sich eine rückläufige Tendenz abzuzeichnen. Bei 15h Inkubation blieb die CD14-Dichte auf PBMC und angereicherten Monozyten unter dem Wert der Kontrolle (MARCHANT *et al.*, 1992; LANDMANN *et al.*, 1996).

Aus den durchflußzytometrischen Streulichtsignalen ergibt sich der Eindruck, daß die Monozyten unter LPS-Einfluß im Wege der Apoptose untergegangen sind. In den eingesetzten Größenordnungen ($100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ aus *Escherichia coli* K-235) kann LPS die Apoptoserate in vorbelasteten PBMC erhöhen (KURITA-OCHIAI *et al.*, 1999), obwohl für Monozyten eher eine antiapoptotische Wirkung beschrieben ist. Diese ist bei 1 ng mL^{-1} LPS aus *Escherichia coli* 0127:B8 am effektivsten ($p < 0,05$), bei $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ aber bereits nicht mehr signifikant (HEIDENREICH *et al.*, 1997). Trotzdem wird für diese Konzentration nach 3h Inkubation über keinen signifikant gesteigerten, nach 6 - 12 h nur über geringfügig erhöhten Zelluntergang berichtet. Auch die CD14-Expression kann unter diesen Bedingungen und Monensin-Einfluß (s.o.) noch unverändert sein (SCHUERWEGH *et al.*, 2001).

Lipopolysaccharid wirkt also im Bereich ng mL^{-1} , der pathogenetisch bedeutsam ist, stimulierend auf die CD14-Expression und supprimierend auf die Apoptoserate von Monozyten. Im höheren $\mu\text{g-mL}^{-1}$ -Bereich, wo der zelluläre und

der Plasma-CD14-Pool erschöpft sind (BAZIL & STROMINGER, 1991; MALISZEWSKI, 1991; ANTAL-SZALMAS *et al.*, 2000), kehren sich die Verhältnisse um.

Die unterschiedlichen Niveaus der Basisexpression erwecken zusammen mit den individuellen Stimulationsergebnissen den Eindruck einer Teilung der Reaktivitäten in Gruppen mit niedriger bzw. hoher ACTH-Expression. Hinweise auf unterschiedliche systemische Reaktivitätslagen der HPA-Achse ergaben sich aus Untersuchungen an Sepsispatienten, deren Prognose mit der steroidogenen Reaktivität korreliert war. Zwar waren die Plasma-ACTH-Ausgangswerte von gesunden Kontrollprobanden sowie überlebenden und nicht-überlebenden Patienten im Durchschnitt unterschiedslos und der Unterschied der niedrigeren Plasma-ACTH-Reaktivität der später Verstorbenen auf injiziertes CRH nicht signifikant, aber die Cortisol-Plasmaspiegel ohne und mit CRH-Stimulation waren signifikant positiv mit der Verlaufsprognose korreliert (SCHROEDER *et al.*, 2001).

4.4 Methodisches Entwicklungspotential

Möglichkeiten, das vorgestellte Detektionssystem zu verbessern, ergeben zunächst aus den vorangegangenen Ausführungen zum Probenmaterial und zur Zellkulturtechnik. Darüber hinaus kann der Versuch unternommen werden, die ACTH-spezifischen Antikörper zu fluorochromieren, und dadurch die Probenvorbereitung zu vereinfachen und die Methodik zu erweitern und zu vertiefen.

4.4.1 Entwicklungsperspektiven für die Zellkultur

Frisches Vollblut sollte sich für leistungsphysiologische Zellkulturmodelle besser eignen als das bisher verwendete Beiprodukt aus der Blutspende, auf das bis zum Einsatz in der Zellkultur mehr belastende Einflüsse einwirken.

Psychische Einflüsse auf die ACTH-Synthese, die vor allem in Tiermodellen in ihrer Wirkung auf die HPA-Achse untersucht worden sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht näher dargestellt werden. Sie könnten aber insbesondere für humane *ex-vivo*-Interventionsstudien von Bedeutung sein, wo durch sorgfältige Gestaltung der Rahmenbedingungen die Belastung der Probanden zu minimieren wäre. Denkbare Konsequenz suboptimaler Bedingungen für die leukozytäre

ACTH-Synthese könnte die direkte Stimulation sein. Wenn peripheres Blut als Untersuchungsmaterial verwendet wird, so ist aber vor allem an den hemmenden Einfluß erhöhter Glucocorticoidspiegel zu denken.

Die Vollblut-Kultur kommt ohne die Belastungen aus, die während einer Dichtegradientenzentrifugation und der notwendigen begleitenden Manipulationen entstehen, und die Inkubationszeit kann auf wenige Stunden beschränkt werden. In diesem Zusammenhang könnte es sich als günstiger erweisen, auf die bisherige Golgi-Inhibition zu verzichten, da die entsprechenden Wirkstoffe zwar eine intrazelluläre Akkumulation von Exportpeptiden bewirken, zugleich aber die Prozessierung von Prohormonen stören und die Regulation der Freisetzung von Neuropeptiden durchbrechen können. (MISUMI *et al.*, 1986; DINTER & BERGER, 1998; BÄCK *et al.*, 2000; JACKSON, 2000).

Das in der Zellkultur humaner PBMC eingesetzte RPMI ist im Vergleich zu humanem Plasma hyperosmolar (SHAPIRO & DINARELLO, 1997). Ob dies Konsequenzen für die ACTH-Expression hat und ob die Osmolarität ohne entscheidende Nebenwirkungen angepaßt werden kann, sollte gegebenenfalls untersucht werden.

Die ACTH-Basisexpression läßt sich möglicherweise reduzieren, sobald inerte Zellkulturmaterialien entwickelt werden, die geringere Mengen von hormonell wirksamer Kontaminanten und Schwermetallen freisetzen.

Leistungsphysiologische Zellkulturmodelle zur Wirkung von oxidativem Streß und die Effekte von antioxidativ wirksamen Nährstoffen und Lebensmittelinhaltsstoffen könnten zu einem Haupteinsatzbereich der durchflußzytometrischen ACTH-Detektion werden. Oxidativer Streß, modelliert in Kulturen humaner PBMC unter Einfluß von 2,2'-Azobis-(2-amidinopropan)-dihydrochlorid (AAPH), erhöht die durch Hitzeschock induzierte Synthese von Hitzeschockproteinen (HSP). Dabei war die HSP-Expression in Leukozyten von Probanden, die mit Antioxidantien supplementiert wurden, signifikant höher als bei Kontrollprobanden (PENG *et al.*, 2000). In durchflußzytometrischen Untersuchungen mit Hitzeschock als alleinigem Induktor zeigten Referenzanalysen im Western-Immunoblot, daß die mittlere Fluoreszenzintensität der HSP-Signale ein geeigneter Parameter für die Abschätzung der HSP-Expression war (BACHELET *et al.*, 1998). Vor diesem

Hintergrund sind *ex-vivo*-Studien zum Einfluß von Antioxidantien in der Ernährung auf unterschiedliche Parameter der zellulären Leistungsphysiologie vorstellbar. Die methodische Konsistenz von *in-vitro*-Modellen mit Reinsubstanzen antioxidativ wirksamer Verbindungen kann zur Zeit nur ungenügend eingeschätzt werden, da Antioxidantien unter diesen Bedingungen schwer kalkulierbare prooxidative Eigenschaften entwickeln können (LONG *et al.*, 2000).

4.4.2 Entwicklungsperspektiven für die Durchflußzytometrie

Die Gen- und Aminosäuresequenz von ACTH ist im Verlauf der stammesgeschichtlichen Entwicklung vergleichsweise stark konserviert geblieben. Dies trifft insbesondere für den N-terminalen Bereich des Peptids zu. In Tab. 11, S. 66, sind einschlägige Sequenzen zusammengefaßt. Darunter sind Primärstrukturen, die mit dem humanen Peptid identisch übereinstimmen (Finnwal, Seiwal).

Tab. 11: Aminosäuresequenzen von ACTH aus verschiedenen Spezies und einige korrespondierende DNA-Teilsequenzen aus dem POMC-Gen.

ACTH Mensch (*Homo sapiens*) (CHANG *et al.*, 1980a; RINIKER *et al.*, 1972)

+1	+10												
NH ₂ -	-COOH												
Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val	
5'-	TCC	TAC	TCC	ATG	GAG	CAC	TTC	CGC	TGG	GGC	AAG	CCG	GTG
+20													
-	Gly	Lys	Lys	Arg	Arg	Pro	Val	Lys	Val	Tyr	Pro	Asn	Gly
-	GGC	AAG	AAG	CGG	CGC	CCA	GTG	AAG	GTG	TAC	CCT	AAC	GGC
+30													
-	Ala	Glu	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Ala	Phe	Pro	Leu	Glu	Phe
-	GCC	GAG	GAC	GAG	TCG	GCG	GAG	GCC	TTC	CCC	CTG	GAG	TTC

Hypophysen-ACTH Maus (*Mus musculus*) (SMITH *et al.*, 1990)

NH ₂ -	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val	...
5'-	TCC	TAC	TCC	ATG	GAG	CAC	TTC	CGC	TGG	GGC	AAG	CCG	GTG	...
...	Gly	Lys	Lys	Arg	Arg	Pro	Val	Lys	Val	Tyr	Pro	Asn	Val	...
...	GGC	AAG	AAA	CGG	CGC	CCG	GTG	AAG	GTG	TAC	CCC	AAC	GTT	...
...	Ala	Glu	Asn	Glu	Ser	Ala	Glu	Ala	Phe	Pro	Leu	Glu	Phe	-COOH
...	GCT	GAG	AAC	GAG	TCG	GCG	GAG	GCC	TTT	CCC	CTA	GAG	TTC	-3'

Tab. 11: Aminosäuresequenzen von ACTH aus verschiedenen Spezies und einige korrespondierende DNA-Teilsequenzen aus dem POMC-Gen.

Lymphozyten-ACTH Maus (SMITH *et al.*, 1990)

NH ₂ -	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val	...
5'-	TCC	TAC	TCC	ATG	GAG	CAC	TTC	CGC	TGG	GGC	AAG	CCG	GTG	
...	Gly	Lys	Lys	Arg	Arg	Pro	Val	Lys	Val	Tyr	Pro	Asn	Val	...
	GGC	AAG	AAA	CGG	CGC	CCG	GTG	AAG	GTG	TAC	CCC	AAC	GTT	
...	Ala	Glu	Asn	Glu	Ser	Ala	Glu	Ala	Phe	Pro	Leu	Glu	Phe	-COOH
	GCT	GAG	AAC	GAG	TCG	GCG	GAG	GCC	TTT	CCC	CTA	GAG	TTC	-3'

ACTH Schwein (*Sus scrofa domestica*) (SHEPHERD *et al.*, 1956; GRAF, 1972)

NH ₂ -	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val	...
...	Gly	Lys	Lys	Arg	Arg	Pro	Val	Lys	Val	Tyr	Pro	Asn	Gly	...
...	Ala	Glu	Asp	Glu	Leu	Ala	Glu	Ala	Phe	Pro	Leu	Glu	Phe	-COOH

ACTH Hund (*Canis familiaris*) (MOL *et al.*, 1991)

NH ₂ -	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val	...
...	Gly	Lys	Lys	Arg	Arg	Pro	Val	Lys	Val	Tyr	Pro	Asn	Gly	...
...	Ala	Glu	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Ala	Phe	Pro	Val	Glu	Phe	-COOH

ACTH Rind (*Bos taurus*) (CHANG *et al.*, 1980a)

NH ₂ -	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val	...
5'-	TCT	TAC	TCC	ATG	GAA	CAC	TTC	CGC	TGG	GGC	AAG	CCG	GTG	
...	Gly	Lys	Lys	Arg	Arg	Pro	Val	Lys	Val	Tyr	Pro	Asn	Gly	...
	GGC	AAG	AAG	CGG	CGC	CCG	GTG	AAG	GTG	TAC	CCC	AAC	GGC	
...	Ala	Glu	Asp	Glu	Ser	Ala	Gln	Ala	Phe	Pro	Leu	Glu	Phe	-COOH
	GCC	GAG	GAC	GAG	TCG	GCG	CAG	GCC	TTT	CCC	CTC	GAA	TTC	-3'

ACTH Schaf (*Ovis aries*) (LI *et al.*, 1955)

NH ₂ -	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val	...
...	Gly	Lys	Lys	Arg	Arg	Pro	Val	Lys	Val	Tyr	Pro	Ala	Gly	...
...	Glu	Asp	Asp	Glu	Ala	Ser	Glu	Ala	Phe	Pro	Leu	Glu	Phe	-COOH

ACTH Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) (MULAY *et al.*, 1986)

NH ₂ -	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val	...
...	Gly	Lys	Lys	Arg	Arg	Pro	Val	Lys	Val	Tyr	Pro	Asn	Gly	...
...	Ala	Glu	Asn	Glu	Ser	Ala	Glu	Ala	Phe	Pro	Val	Glu	Val	-COOH

ACTH Finnwal (*Balaenoptera physalus*) (PANKOV *et al.*, 1976)

NH ₂ -	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val	...
...	Gly	Lys	Lys	Arg	Arg	Pro	Val	Lys	Val	Tyr	Pro	Asn	Gly	...
...	Ala	Glu	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Ala	Phe	Pro	Leu	Glu	Phe	-COOH

ACTH Seiwal (*Balaenoptera borealis*) (PANKOV *et al.*, 1977)

NH ₂ -	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val	...
...	Gly	Lys	Lys	Arg	Arg	Pro	Val	Lys	Val	Tyr	Pro	Asn	Gly	...
...	Ala	Glu	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Ala	Phe	Pro	Leu	Glu	Phe	-COOH

Tab. 11: Aminosäuresequenzen von ACTH aus verschiedenen Spezies und einige korrespondierende DNA-Teilsequenzen aus dem POMC-Gen.

ACTH Huhn (*Gallus gallus*) (HAYASHI *et al.*, 1991)

NH ₂ -	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val	...
...	Gly	Arg	Lys	Arg	Arg	Pro	Ile	Lys	Val	Tyr	Pro	Asn	Gly	...
...	Val	Asp	Glu	Glu	Ser	Ala	Glu	Ser	Tyr	Pro	Met	Glu	Phe	-COOH

ACTH Truthahn (*Meleagris gallopavo*) (CHANG *et al.*, 1980b)

NH ₂ -	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val	...
...	Gly	Arg	Arg	Lys	Arg	Pro	Ile	Lys	Val	Tyr	Pro	Asn	Gly	...
...	Ser	Val	Asx	Glx	Glx	Gln	Ala	Ser	Tyr	Pro	Val	Glu	Phe	-COOH

ACTH Strauß (*Struthio camelus*) (LI *et al.*, 1978)

NH ₂ -	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val	...
...	Gly	Arg	Lys	Arg	Arg	Pro	Val	Lys	Val	Tyr	Pro	Asn	Gly	...
...	Val	Gln	Glu	Glu	Thr	Ser	Glu	Gly	Phe	Pro	Leu	Glu	Phe	-COOH

Unterscheide gegenüber der humanen Aminosäure- bzw. Gensequenz sind halbfett gedruckt. **Abkürzungen:** **+1** = Erstes für die ACTH-Peptidsequenz codierendes Basentriplett bzw. N-terminale Aminosäure der ACTH-Primärstruktur; **+10 / +20 / +30** = DNA-Codon- bzw. Aminosäure-Position in der ACTH-Sequenz; **-3'** = Terminationsrichtung der codogenen DNA in bezug auf die Transkription; **5'** = Initiationsrichtung der codogenen DNA in bezug auf die Transkription; **A** = Adenin(base der DNA); **Ala** = Alanin; **Arg** = Arginin; **Asn** = Asparagin; **Asp** = Asparaginsäure; **Asx** = Asparagin oder Asparaginsäure; **C** = Cytosin(base der DNA); **-COOH** = Carboxy-Terminus des (ACTH-)Peptids; **G** = Guanin(base der DNA); **Gln** = Glutamin; **Glu** = Glutaminsäure; **Glx** = Glutamin oder Glutaminsäure; **Gly** = Glycin; **His** = Histidin; **Ile** = Isoleucin; **Leu** = Leucin; **Lys** = Lysin; **Met** = Methionin; **NH₂-** = Aminoterminus des (ACTH-)Peptids; **Phe** = Phenylalanin; **Pro** = Prolin; **Ser** = Serin; **T** = Thymin(base der DNA); **Thr** = Threonin; **Trp** = Tryptophan; **Tyr** = Tyrosin; **Val** = Valin

Die grundlegende Bedeutung von ACTH für die physiologischen Integrität des Organismus spiegelt sich in der umfassenden Reaktivität von Antiseren gegen das humane Peptid und molekularbiologischen Sonden (OTTAVIANI *et al.*, 1995; OTTAVIANI *et al.*, 1997; OTTAVIANI & Francheschi, 1997) wider und ebenso darin, daß Corticotropin-analoge Produkte stammesgeschichtlich älterer Arten über weite phylogenetische Distanzen hinweg wirken. So sezerniert der Erreger der Bilharziose, der Trematode *Schistosoma mansoni*, ein ACTH-ähnliches Peptid, wodurch er sich den Abwehrreaktionen sowohl seines Zwischenwirtes, der Süßwasserschnecke *Biomphalaria glabrata*, als auch seines humanen Endwirtes bzw. des entsprechenden Tiermodells, *Mesocricetus auratus* (Goldhamster), entzieht (Duvaux-Miret *et al.*, 1992).

Entwicklungsbiologische Studien sind deshalb grundsätzlich ein weiterer möglicher Anwendungsbereich für die durchflußzytometrische ACTH-Detektion. Die geringe Affinität des evaluierten N-terminal bindenden α ACTH-mAb relativierte jedoch diese Aussichten. Von einem weiteren Hersteller (Serotec) wird aber ein mAb mit Spezifität gegen den ACTH-N-Terminus angeboten, der hier nicht eingesetzt wurde und über dessen durchflußzytometrische Eignung daher keine Aussagen getroffen werden können. Der C-terminale Bereich vom ACTH der dem Menschen stammesgeschichtlich nahestehenden Organismen, insbesondere der Säugetiere, stimmt möglicherweise gut genug mit humanem ACTH überein, um von dem entsprechenden hochaffinen mAb erkannt zu werden. Erste Ergebnisse von caprinen Leukozyten deuten darauf hin (LINSCHIED & SEIDLER, unveröffentlicht).

Ungeachtet des Ausgangs zukünftiger Bemühungen, die darauf zielen, die ACTH-Basisexpression in der Nähe eines *in vivo* möglicherweise geringeren Wertes zu halten, rechtfertigen die Untersuchungsergebnisse proteinchemische Arbeiten mit dem Ziel eines fluorochromierten α ACTH-mAb. Neben einer kürzeren und damit schonenderen Probenvorbereitung würde das methodische Spektrum wesentlich erweitert werden. So müßte bei der Kombination mit anderen fluoreszenzmarkierten mAb nicht mehr auf die Ig-Subklasse geachtet werden. Damit ließen sich eine umfangreichere Immunphänotypisierungen durchführen, die Coexpression von Cytokinen und anderen Mediatoren untersuchen und z.B. apoptotische Prozesse analysieren (KOESTER & BOLTON, 2001b). Darüber hinaus ermöglichen Fluorochrom-konjugierte Antikörper quantitative durchflußzytometrische Untersuchungen über den Vergleich der Fluoreszenzintensität von Standardpartikeln, die mit definierten Antigenmengen beschichtet und mit dem Antikörper markiert wurden, und die sich anhand ihrer Streulichteigenschaften von den untersuchten Zellen unterscheiden lassen.

Die Durchflußzytometrie ist bereits seit längerer Zeit ein Hauptwerkzeug der zellbiologischen Analytik, wenn es um die Klassifizierung von Populationen immunkompetenter Zellen nach ihrem Immunphänotyp geht. Mit der routinemäßigen Identifizierung intrazellulärer Antigene konnten die Subpopulationen weiter anhand der von ihnen selektiv synthetisierten Mediatoren untergliedert werden (JUNG *et al.*, 1993). Dadurch sind durchflußzytometrische

Differenzierungen im Sinne des T_{H1}/T_{H2} -Konzepts der Immunregulation (MOSMANN *et al.*, 1986; MOSMANN & SAD, 1996) möglich geworden. Ähnliche Entwicklungen könnten sich aus der durchflußzytometrischen Detektion leukozytärer Hormone ergeben.

5 Zusammenfassung

Zellkulturmodelle, in denen Mediatoren der zellulären Leistungsphysiologie synthetisiert werden, können zur Bewertung gesundheitsfördernder und gesundheitsbeeinträchtigender Wirkungen von Substanzen und physiologischen Konditionen herangezogen werden. Ernährungsimmunologisch sind Nährstoffe und Nährstoffmangel, nicht-nutritive bioaktive Lebensmittelinhaltsstoffe sowie -immuntoxikologisch - Rückstände und Kontaminanten in Lebensmitteln interessant.

Humane Leukozyten können problemlos gewonnen werden und entstammen als primäres Zellkulturmaterial einem physiologisch regulierten Umfeld. Sie sind Schlüsselemente des Abwehrsystems. Damit sind sie in die Regulation der Homöostase eingebunden und spiegeln gleichzeitig die aktuellen Rahmenbedingungen wider, unter denen sich das physiologische Gleichgewicht eingestellt hat. In diesem Zusammenhang sind Neuropeptide, die von Leukozyten produziert werden und an der Signalübermittlung zwischen den Zellen beteiligt sind, insbesondere das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH), charakteristische Kenngrößen der zellulären Leistungsphysiologie.

Leukozyten sind auch ein günstiger Untersuchungsgegenstand für die durchflußzytometrische Analytik. Für ihre phänotypische Klassifizierung und die Kennzeichnung ihrer immunologischen Prägung sowie ihre immunologische Aktivität und Leistungsfähigkeit stehen umfangreiche zytochemische und immunzytochemische Methoden zur Verfügung.

Vor diesem Hintergrund sollte ACTH in humanen Leukozyten, nach Dichtegradientenzentrifugation bzw. aus komplettem Blutspendematériau, durchflußzytometrisch detektiert und die Höhe seiner Expression abgeschätzt werden. Dazu wurden im Handel befindliche monoklonale Antikörper (mAb) mit Spezifität gegen ACTH und entsprechende fluorochromierte Antikörper(fragmente) für die sekundäre Immunfluoreszenz eingesetzt. Weitere, gegen immunphänotypische leukozytäre Membranantigene gerichtete, fluorochromierte mAb wurden für die nähere Charakterisierung von Leukozytenpopulationen benutzt.

Mit Hilfe dreier einschlägiger Stimulatoren der ACTH-Expression in Leukozyten - Corticoliberin (CRH), Lipopolysaccharid (LPS) und hyperosmolares

Zellkulturmedium - wurde die methodische Relevanz des Nachweissystems überprüft. Die Höhe der ACTH-Expression wurde abgeschätzt, indem die vom kalibrierten Durchflußzytometer dokumentierten Signalintensitäten hintergrundbereinigt in mittlere relative Fluoreszenzintensitäten umgerechnet wurden.

Das detektierte Antigen war durch CRH induzierbar, Dexamethason supprimierte die Expression (beide Wirkstoffe in einschlägigen Konzentrationen). Unspezifische mAb und Sekundärantikörper gleicher Isotypen verursachten keine nennenswerten Signale. Die Detektion war somit ACTH-spezifisch. Zwei von drei untersuchten mAb gegen ACTH (spezifisch gegen den C- bzw. N-Terminus), die alle für immunhistochemische Zwecke ausgewiesen und durchflußzytometrisch nicht erprobt waren, waren schwach affin, der dritte zeigte die für eine wirtschaftlich vertretbare durchflußzytometrische Analytik erforderlichen Bindungseigenschaften.

Vor dem Hintergrund einer deutlichen ACTH-Basisexpression reagierten die stimulierten Leukozyten aus Blutspendematernal spenderabhängig heterogen. Niedrige Basisexpression fiel mit schwacher Reaktivität zusammen, und besser stimulierbare Proben wiesen höhere Ausgangswerte auf. Trotz höherer durchschnittlicher relativer Fluoreszenzintensitäten der mit CRH und NaCl-hyperosmolarem Medium stimulierten Leukozyten waren die Effekte statistisch nicht signifikant.

Lipopolysaccharid-behandelte Lymphozyten zeigten keine gesteigerte ACTH-Synthese. Monozyten hatten unter der hohen eingesetzten Konzentration ihre charakteristischen Streulichteigenschaften verloren. Das monozytentypische Membranantigen CD14, ein LPS-Rezeptor, war nicht mehr nachweisbar. Wahrscheinlich ist, daß zelluläres und lösliches CD14 abgesättigt worden waren und die Monozyten apoptotisch wurden. Diese Befunde standen im Kontrast zu Vorversuchen, in denen der Zellstoffwechsel bezogen auf alle mononukleären Leukozyten unter den selben Kulturbedingungen gegenüber der Kontrolle erhöht war.

Insgesamt ergab sich, trotz fehlender statistischer Signifikanz, der Eindruck eines entwicklungsfähigen Testsystems für die zelluläre Leistungsphysiologie. Die Aussagefähigkeit wird von der noch vergleichsweise hohen ACTH-

Basisexpression eingeschränkt, die wahrscheinlich wesentlich von Art und Aufarbeitung des Zellmaterials sowie von unspezifischen Einflüssen aus der Zellkultur abhängt. Das naheliegendste Konzept ist frisches Vollblut, das über wenige Stunden ohne Inhibitoren des Golgi-Apparates in chemisch möglichst inerten Kulturgefäßen inkubiert wird.

Aktuelle Fragestellungen in der Anwendung, die sich zum Teil aus der Methodenentwicklung ergeben haben, sind z.B.

- prooxidative Wirkungen von Antioxidantien in der Zellkultur und ihre möglichen Einflüsse auf die ACTH-Expression
- LPS-Effekte auf ACTH-Synthese und apoptotische Prozesse in Abhängigkeit von Bakterienart und LPS-Dosis, von Interesse auch vor dem Hintergrund der Pathogenese und funktionellen Diagnostik der Sepsis,
- geeignete tierexperimentelle Modelle,
- entwicklungsbiologische und vergleichend-immunologische Untersuchungen.

Hohen methodischen Stellenwert würde direkt-fluorochromierten Antikörpern mit Spezifität gegen ACTH zukommen, die bei kürzerer und schonenderer Probenvorbereitung umfassende Immunglobulin-Subklassen-unabhängige Kombinationsmöglichkeiten mit phänotyp-, aktivierungs-, prägungs- und mediatorspezifischen Markern eröffnen würden. In Kombination mit Standardpartikeln würden quantitative Aussagen möglich.

Eine der intrazellulären Cytokindetektion gleichrangige Bedeutung ist vorstellbar.

6 Literaturverzeichnis

- AEBISCHER, I.; STÄMPFLI, M.R.; ZÜRCHER, A.; MIESCHER, S.; URWYLER, A.; FREY, B.; LUGER, T.; WHITE, R.R.; STADLER, B.M. (1994): **Neuropeptides are potent modulators of human in vitro immunoglobulin E synthesis.**
Eur J Immunol 24 (8) 1908-13.
- AEBISCHER, I.; STAMPFLI, M.R.; MIESCHER, S.; HORN, M.; ZURCHER, A.W.; STADLER, B.M. (1996): **Neuropeptides accentuate interleukin-4 induced human immunoglobuline E synthesis in vitro.**
Exp Dermatol 5 (1) 38-44.
- ALVAREZ-MON, M.; KEHRL, J.H.; FAUCI, A.S. (1985): **A potential role for adrenocorticotropin in regulating human B lymphocyte functions.**
J Immunol 135 (6) 3823-6.
- ANTAL-SZALMAS, P.; POPPELIER, M.J.; BROEKHUIZEN, R.; VERHOEF, J.; VAN STRIJP, J.A.; VAN KESSEL, K.P. (2000): **Diverging pathways for lipopolysaccharide and CD14 in human monocytes.**
Cytometry 41 (4) 279-88.
- ASSENMACHER, M.; SCHMITZ, J.; RADBRUCH, A. (1994): **Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expression of interleukin-10 in interferon-gamma and in interleukin-4-expressing cells.**
Eur J Immunol 24 (5) 1097-101.
- BACHELET, M.; MARIETHOZ, E.; BANZET, N.; SOUIL, E.; PINOT, F.; POLLA, C.Z.; DURAND, P.; BOUCHAERT, I.; POLLA, B.S. (1998): **Flow cytometry is a rapid and reliable method for evaluating heat shock protein 70 expression in human monocytes.**
Cell Stress Chaperones 3 (3) 168-76.
- BÄCK, N.; SOINILA, S.; TÖRNQUIST, K. (2000): **Monensin and hypo-osmolar medium cause calcium-independent beta-endorphin secretion from melanotropes.**
Neuroendocrinology 71 (2) 99-106.
- BAIGENT, S.M. (2001): **Peripheral corticotropin-releasing hormone and urocortin in the control of the immune response.**
Peptides 22 (5) 809-20.
- BARAN, J.; KOWALCZYK, D.; OZOG, M.; ZEMBALA, M. (2001): **Three-color flow cytometry detection of intracellular cytokines in peripheral blood mononuclear cells: comparative analysis of phorbol myristate acetate-ionomycin and phytohemagglutinin stimulation.**
Clin Diagn Lab Immunol 8 (2) 303-13.
- BAZIL, V.; STROMINGER, J.L. (1991): **Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes.**
J Immunol 147 (5) 1567-74.
- BOECK, G. (2001): **Current status of flow cytometry in cell and molecular biology.**
Int Rev Cytol 204 239-98.
- BOHM, H.; BOEING, H.; HEMPEL, J.; RAAB, B.; KROKE, A. (1998): **[Flavonols, flavone and anthocyanins as natural antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases].**
Z Ernährungswiss 37 (2) 147-63.

- BORBONI, P.; DI COLA, G.; SESTI, G.; MARINI, M.A.; DEL PORTO, P.; SAVERIA, M.; MONTANI, G.; LAURO, R.; DE PIRRO, R. (1989): **Beta-endorphin receptors on cultured and freshly isolated lymphocytes from normal subjects.**
Biochem Biophys Res Commun 163 (1) 642-8.
- BOST, K.L.; CLARKE, B.L.; XU, J.C.; KIYONO, H.; MCGHEE, J.R.; PASCUAL, D. (1990): **Modulation of IgM secretion and H chain mRNA expression in CH12.LX.C4.5F5 B cells by adrenocorticotrophic hormone.**
J Immunol 145 (12) 4326-31.
- BRINES, R.; HOFFMAN-GOETZ, L.; PEDERSEN, B.K. (1996): **Can you exercise to make your immune system fitter?**
Immunol Today 17 (6) 252-4.
- BRUNIALTI, M.K.; KALLAS, E.G.; FREUDENBERG, M.; GALANOS, C.; SALOMAO, R. (2002): **Influence of EDTA and heparin on lipopolysaccharide binding and cell activation, evaluated at single-cell level in whole blood.**
Cytometry 50 (1) 14-8.
- BUENO, C.; ALMEIDA, J.; ALGUERO, M.C.; SANCHEZ, M.L.; VAQUERO, J.M.; LASO, F.J.; SAN MIGUEL, J.F.; ESCRIBANO, L.; ORFAO, A. (2001): **Flow cytometric analysis of cytokine production by normal human peripheral blood dendritic cells and monocytes: comparative analysis of different stimuli, secretion-blocking agents and incubation periods.**
Cytometry 46 (1) 33-40.
- BØYUM, A. (1968): **Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g.**
Scand J Clin Lab Invest Suppl 97 77-89.
- CHANG, A.C.; COCHET, M.; COHEN, S.N. (1980): **Structural organization of human genomic DNA encoding the pro-opiomelanocortin peptide.**
Proc Natl Acad Sci U S A 77 (8) 4890-4.
- CHANG, W.C.; CHUNG, D.; LI, C.H. (1980): **Isolation and characterization of beta-lipotropin and adrenocorticotropin from turkey pituitary glands.**
Int J Pept Protein Res 15 (3) 261-70.
- CLARKE, B.L. (1995): **Calcium uptake by ACTH-stimulated lymphocytes: what is the physiological significance?**
Adv Neuroimmunol 5 (3) 271-81.
- CLARKE, B.L. (1999): **Binding and processing of (125)I-ACTH by isolated rat splenic lymphocytes.**
Biochem Biophys Res Commun 266 (2) 542-6.
- COFFEY, R.G.; HADDEN, J.W. (1985): **Neurotransmitters, hormones, and cyclic nucleotides in lymphocyte regulation.**
Fed Proc 44 (1 Pt 1) 112-7.
- COMB, M.; SEEBURG, P.H.; ADELMAN, J.; EIDEN, L.; HERBERT, E. (1982): **Primary structure of the human Met- and Leu-enkephalin precursor and its mRNA.**
Nature 295 (5851) 663-6.
- DADOUN, F.; VELUT, J.G.; GUILLAUME, V.; SAUZE, N.; ORSONI, J.C.; GAILLARD, R.C.; OLIVER, C.C. (1999): **Combined hypervolemia and hypoosmolality alter hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to endotoxin stimulation.**
Neuroendocrinology 69 (5) 352-9.

- DHABHAR, F.S.; MILLER, A.H.; STEIN, M.; MCEWEN, B.S.; SPENCER, R.L. (1994): **Diurnal and acute stress-induced changes in distribution of peripheral blood leukocyte subpopulations.**
Brain Behav Immun 8 (1) 66-79.
- DINTER, A.; BERGER, E.G. (1998): **Golgi-disturbing agents.**
Histochem Cell Biol 109 (5-6) 571-90.
- DIXIT, V.D.; MARAHRENS, M.; PARVIZI, N. (2001): **Transport stress modulates adrenocorticotropin secretion from peripheral bovine lymphocytes.**
J Anim Sci 79 (3) 729-34.
- DIXON, J.E.; HAUN, R.S.; MINTH, C.D.; NICHOLS, R. (1987): **Neuropeptide gene families.**
In: TURNER, A.J. (Hrsg.): *Neuropeptides and Their Peptidases*. VCH, Weinheim, New York, S. 9-30
- DOMINGUEZ-GERPE, L.; LEFKOVITS, I. (1996): **Lymphocyte protein synthesis: evidence that murine T cells are more affected by stress than B cells.**
Immunol Lett 52 (2-3) 109-23.
- DUGAS, T.R.; MOREL, D.W.; HARRISON, E.H. (2000): **Novel cell culture medium for use in oxidation experiments provides insights into mechanisms of endothelial cell-mediated oxidation of LDL.**
In Vitro Cell Dev Biol Anim 36 (9) 571-7.
- DUVAUX-MIRET, O.; STEFANO, G.B.; SMITH, E.M.; DISSOUS, C.; CAPRON, A. (1992): **Immunosuppression in the definitive and intermediate hosts of the human parasite *Schistosoma mansoni* by release of immunoreactive neuropeptides.**
Proc Natl Acad Sci U S A 89 (2) 778-81.
- FERRIS, D.K.; HAREL-BELLAN, A.; MORIMOTO, R.I.; WELCH, W.J.; FARRAR, W.L. (1988): **Mitogen and lymphokine stimulation of heat shock proteins in T lymphocytes.**
Proc Natl Acad Sci U S A 85 (11) 3850-4.
- FURUTA, M.; YANO, H.; ZHOU, A.; ROUILLE, Y.; HOLST, J.J.; CARROLL, R.; RAVAZZOLA, M.; ORCI, L.; FURUTA, H.; STEINER, D.F. (1997): **Defective prohormone processing and altered pancreatic islet morphology in mice lacking active SPC2.**
Proc Natl Acad Sci U S A 94 (13) 6646-51.
- GABRIEL, H.; SCHWARZ, L.; STEFFENS, G.; KINDERMANN, W. (1992): **Immunoregulatory hormones, circulating leucocyte and lymphocyte subpopulations before and after endurance exercise of different intensities.**
Int J Sports Med 13 (5) 359-66.
- GENEDANI, S.; BERNARDI, M.; BERTOLINI, A. (1992): **Neuropeptides of the stress response and monocyte motility.**
Ann N Y Acad Sci 663 494-6.
- GILLIES, G.E.; LINTON, E.A.; LOWRY, P.J. (1982): **Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin.**
Nature 299 (5881) 355-7.
- GONSALKORALE, W.M.; DASCOMBE, M.J.; HUTCHINSON, I.V. (1995): **Adrenocorticotrophic hormone as a potential enhancer of T-lymphocyte function in the rat mixed lymphocyte reaction.**
Int J Immunopharmacol 17 (3) 197-206.

- GRAF, L. (1972): **Re-examination of the sequence of the C-terminal tryptic fragment from porcine adrenocorticotrophic hormone.**
Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung 7 (4) 293-7.
- GROßKLAUS, R. (2000): **Sekundäre Pflanzenstoffe - Was ist beim Menschen wissenschaftlich hinreichend gesichert?**
Aktuel Ernährungsmed 25 227-37
- GUBLER, U.; SEEBURG, P.; HOFFMAN, B.J.; GAGE, L.P.; UDENFRIEND, S. (1982): **Molecular cloning establishes proenkephalin as precursor of enkephalin-containing peptides.**
Nature 295 (5846) 206-8.
- HADLEY, M.E.; HASKELL-LUEVANO, C. (1999): **The proopiomelanocortin system.**
Ann N Y Acad Sci 885 1-21.
- HARBOUR-MCMENAMIN, D.; SMITH, E.M.; BLALOCK, J.E. (1985): **Bacterial lipopolysaccharide induction of leukocyte-derived corticotropin and endorphins.**
Infect Immun 48 (3) 813-7.
- HASHEMI, F.B.; HUGHES, T.K.; SMITH, E.M. (1998): **Human immunodeficiency virus induction of corticotropin in lymphoid cells.**
J Clin Endocrinol Metab 83 (12) 4373-81.
- HAYASHI, H.; IMAI, K.; IMAI, K. (1991): **Characterization of chicken ACTH and alpha-MSH: the primary sequence of chicken ACTH is more similar to Xenopus ACTH than to other avian ACTH.**
Gen Comp Endocrinol 82 (3) 434-43.
- HEIDENREICH, S.; SCHMIDT, M.; AUGUST, C.; CULLEN, P.; RADEMAEKERS, A.; PAUELS, H.G. (1997): **Regulation of human monocyte apoptosis by the CD14 molecule.**
J Immunol 159 (7) 3178-88.
- HELMRICH, A.; BARNES, D. (1998): **Animal cell culture equipment and techniques.**
Methods Cell Biol 57 3-17.
- HOFFMAN-GOETZ, L.; PEDERSEN, B.K. (1994): **Exercise and the immune system: a model of the stress response?**
Immunol Today 15 (8) 382-7.
- HOLTZHAUER, M. (1997): **Biochemische Labormethoden.**
: Springer Labormanuale. 3., korr. Aufl., *Springer*, Berlin, ...,
- HOUSBY, J.N.; CAHILL, C.M.; CHU, B.; PREVELIGE, R.; BICKFORD, K.; STEVENSON, M.A.; CALDERWOOD, S.K. (1999): **Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit the expression of cytokines and induce HSP70 in human monocytes.**
Cytokine 11 (5) 347-58.
- HUGHES, T.K.; CADET, P.; RADY, P.L.; TYRING, S.K.; CHIN, R.; SMITH, E.M. (1994): **Evidence for the production and action of interleukin-10 in pituitary cells.**
Cell Mol Neurobiol 14 (1) 59-69.
- ICHINOSE, M.; SAWADA, M.; MAENO, T. (1994): **Suppression of phagocytosis by adrenocorticotrophic hormone in murine peritoneal macrophages.**
Immunol Lett 42 (3) 161-5.
- ISHIKAWA, T.; TAKANO, K.; YASUFUKU-TAKANO, J.; FUJITA, T.; IGARASHI, T.; MIURA, M.; HATA, K. (2001): **Estrogenic impurities in labware.**
Nat Biotechnol 19 (9) 812.

- JACKSON, C.L. (2000): **Brefeldin A. Revealing the fundamental principles governing membrane dynamics and protein transport.**
Subcell Biochem 34 233-72.
- JACOB, M.C.; FAVRE, M.; BENZA, J.C. (1991): **Membrane cell permeabilization with saponin and multiparametric analysis by flow cytometry.**
Cytometry 12 (6) 550-8.
- JACQUIER-SARLIN, M.R.; JORNOT, L.; POLLA, B.S. (1995): **Differential expression and regulation of hsp70 and hsp90 by phorbol esters and heat shock.**
J Biol Chem 270 (23) 14094-9.
- JESSOP, D.S. (1999): **Central non-glucocorticoid inhibitors of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis.**
J Endocrinol 160 (2) 169-80.
- JOHNSON, E.W.; KLIMPEL G.R.; SMITH, E.M. (1987): **Adrenocorticotropin (ACTH) receptors on murine leukocytes: expression and association with cell-mediated cytotoxicity.**
Fed Proc 46 (4) 1221
- JOHNSON, E.W.; BLALOCK, J.E.; SMITH, E.M. (1988): **ACTH receptor-mediated induction of leukocyte cyclic AMP.**
Biochem Biophys Res Commun 157 (3) 1205-11.
- JOHNSON, H.M.; SMITH, E.M.; TORRES, B.A.; BLALOCK, J.E. (1982): **Regulation of the in vitro antibody response by neuroendocrine hormones.**
Proc Natl Acad Sci U S A 79 (13) 4171-4.
- JOHNSON, H.M.; TORRES, B.A.; SMITH, E.M.; DION, L.D.; BLALOCK, J.E. (1984): **Regulation of lymphokine (gamma-interferon) production by corticotropin.**
J Immunol 132 (1) 246-50.
- JOSHI, M.S.; FERGUSON JR., T.B.; HAN, T.H.; HYDUKE, D.R.; LIAO, J.C.; RASSAF, T.; BRYAN, N.; FEELISCH, M.; LANCASTER JR., J.R. (2002): **Nitric oxide is consumed, rather than conserved, by reaction with oxyhemoglobin under physiological conditions.**
Proc Natl Acad Sci U S A 99 (16) 10341-6.
- JOSLIN, G.; HAFEEZ, W.; PERLMUTTER, D.H. (1991): **Expression of stress proteins in human mononuclear phagocytes.**
J Immunol 147 (5) 1614-20.
- JUNG, T.; SCHAUER, U.; HEUSSER, C.; NEUMANN, C.; RIEGER, C. (1993): **Detection of intracellular cytokines by flow cytometry.**
J Immunol Methods 159 (1-2) 197-207.
- KAKIDANI, H.; FURUTANI, Y.; TAKAHASHI, H.; NODA, M.; MORIMOTO, Y.; HIROSE, T.; ASAI, M.; INAYAMA, S.; NAKANISHI, S.; NUMA, S. (1982): **Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neo-endorphin/dynorphin precursor.**
Nature 298 (5871) 245-9.
- KARANTH, S.; MCCANN, S.M. (1991): **Anterior pituitary hormone control by interleukin 2.**
Proc Natl Acad Sci U S A 88 (7) 2961-5.
- KARKMANN, U.; RADBRUCH, A.; HOLZEL, V.; SCHEFFOLD, A. (1999): **Enzymatic signal amplification for sensitive detection of intracellular antigens by flow cytometry.**
J Immunol Methods 230 (1-2) 113-20.

- KOESTER, S.K.; BOLTON, W.E. (2001): **Strategies for cell permeabilization and fixation in detecting surface and intracellular antigens.**
Methods Cell Biol 63 253-68.
- KOESTER, S.K.; BOLTON, W.E. (2001): **Cytometry of caspases.**
Methods Cell Biol 63 487-504.
- KOFF, W.C.; DUNEGAN, M.A. (1985): **Modulation of macrophage-mediated tumoricidal activity by neuropeptides and neurohormones.**
J Immunol 135 (1) 350-4.
- KOGA, T.; MEYDANI, M. (2001): **Effect of plasma metabolites of (+)-catechin and quercetin on monocyte adhesion to human aortic endothelial cells.**
Am J Clin Nutr 73 (5) 941-8.
- KRAVCHENCO, I.V.; FURALEV, V.A. (1994): **Secretion of immunoreactive corticotropin releasing factor and adrenocorticotrophic hormone by T- and B-lymphocytes in response to cellular stress factors.**
Biochem Biophys Res Commun 204 (2) 828-34.
- KURITA-OCHIAI, T.; FUKUSHIMA, K.; OCHIAI, K. (1999): **Lipopolysaccharide stimulates butyric acid-induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells.**
Infect Immun 67 (1) 22-9.
- LACAZE-MASMONTEIL, T.; DE KEYZER, Y.; LUTON, J.P.; KAHN, A.; BERTAGNA, X. (1987): **Characterization of proopiomelanocortin transcripts in human nonpituitary tissues.**
Proc Natl Acad Sci U S A 84 (20) 7261-5.
- LANDMANN, R.; KNOPE, H.P.; LINK, S.; SANSANO, S.; SCHUMANN, R.; ZIMMERLI, W. (1996): **Human monocyte CD14 is upregulated by lipopolysaccharide.**
Infect Immun 64 (5) 1762-9.
- LI, C.H.; GESCHWIND, I.I.; COLE, R.D.; RAACKE, I.D.; HARRIS, J.I.; DIXON, J.S. (1955): **Amino acid sequence of alpha-corticotropin.**
Nature 176 687-9
- LI, C.H.; CHUNG, D.; OELOFSEN, W.; NAUDE, R.J. (1978): **Adrenocorticotropin 53. The amino acid sequence of the hormone from the ostrich pituitary gland.**
Biochem Biophys Res Commun 81 (3) 900-6.
- LINCOLN, C.K.; GABRIDGE, M.G. (1998): **Cell culture contamination: sources, consequences, prevention, and elimination.**
Methods Cell Biol 57 49-65.
- LINDL, T.; BAUER, J. (1994): **Zell- und Gewebekultur.**
3. Aufl., *Gustav Fischer*, Stuttgart, Jena, New York,
- LOH, Y.P.; PARISH, D.C. (1987): **Processing of neuropeptide precursors.**
In: TURNER, A.J. (Hrsg.): *Neuropeptides and Their Peptidases. VCH*, Weinheim, New York, S. 65-84
- LONG, L.H.; CLEMENT, M.V.; HALLIWELL, B. (2000): **Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media.**
Biochem Biophys Res Commun 273 (1) 50-3.

- LYONS, P.D.; BLALOCK, J.E. (1995): **The kinetics of ACTH expression in rat leukocyte subpopulations.**
J Neuroimmunol 63 (2) 103-12.
- MAINS, R.E.; EIPPER, B.A.; LING, N. (1977): **Common precursor to corticotropins and endorphins.**
Proc Natl Acad Sci U S A 74 (7) 3014-8.
- MALISZEWSKI, C.R. (1991): **CD14 and immune response to lipopolysaccharide.**
Science 252 (5010) 1321-2.
- MARCHANT, A.; DUCHOW, J.; DELVILLE, J.P.; GOLDMAN, M. (1992): **Lipopolysaccharide induces up-regulation of CD14 molecule on monocytes in human whole blood.**
Eur J Immunol 22 (6) 1663-5.
- MCCANN, S.M.; KIMURA, M.; KARANTH, S.; YU, W.H.; MASTRONARDI, C.A.; RETTORI, V. (2000): **The mechanism of action of cytokines to control the release of hypothalamic and pituitary hormones in infection.**
Ann N Y Acad Sci 917 4-18.
- MCCOY JR., J.P. (2001): **Preparation of cells from blood.**
Methods Cell Biol 63 207-16.
- MENDES, R.; BROMELOW, K.V.; WESTBY, M.; GALEA-LAURI, J.; SMITH, I.E.; O'BRIEN, M.E.; SOUBERBIELLE, B.E. (2000): **Flow cytometric visualisation of cytokine production by CD3-CD56+ NK cells and CD3+CD56+ NK-T cells in whole blood.**
Cytometry 39 (1) 72-8.
- MERALI, Z.; KENT, P.; ANISMAN, H. (2002): **Role of bombesin-related peptides in the mediation or integration of the stress response.**
Cell Mol Life Sci 59 (2) 272-87.
- MILLARD, I.; DEGRAVE, E.; PHILIPPE, M.; GALA, J.L. (1998): **Detection of intracellular antigens by flow cytometry: comparison of two chemical methods and microwave heating.**
Clin Chem 44 (11) 2320-30.
- MISUMI, Y.; MISUMI, Y.; MIKI, K.; TAKATSUKI, A.; TAMURA, G.; IKEHARA, Y. (1986): **Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes.**
J Biol Chem 261 (24) 11398-403.
- MISUMI, Y.; MISUMI, Y.; MIKI, K.; TAKATSUKI, A.; TAMURA, G.; IKEHARA, Y. (1986): **Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes.**
J Biol Chem 261 (24) 11398-403.
- MOL, J.A.; VAN MANSFELD, A.D.; KWANT, M.M.; VAN WOLFEREN, M.; ROTHUIZEN, J. (1991): **The gene encoding proopiomelanocortin in the dog.**
Acta Endocrinol (Copenh) 125 Suppl 1 77-83.
- MOSMANN, T. (1983): **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.**
J Immunol Methods 65 (1-2) 55-63.
- MOSMANN, T.R.; SAD, S. (1996): **The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more.**
Immunol Today 17 (3) 138-46.

- MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. (1986): **Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.**
J Immunol 136 (7) 2348-57.
- MULAY, S.; BENNETT, H.P.; ROUTHIER, R.; SOLOMON, S. (1986): **Isolation, characterization, and corticotropic activity of rabbit adrenocorticotropin.**
Endocrinology 119 (1) 70-6.
- MUNN, N.A.; LUM, L.G. (1989): **Immunoregulatory effects of alpha-endorphin, beta-endorphin, methionine-enkephalin, and adrenocorticotropic hormone on anti-tetanus toxoid antibody synthesis by human lymphocytes.**
Clin Immunol Immunopathol 52 (3) 376-85.
- NAKANISHI, S.; INOUE, A.; KITA, T.; NUMA, S.; CHANG, A.C.; COHEN, S.N.; NUNBERG, J.; SCHIMKE, R.T. (1978): **Construction of bacterial plasmids that contain the nucleotide sequence for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor.**
Proc Natl Acad Sci U S A 75 (12) 6021-5.
- NAKANISHI, S.; INOUE, A.; KITA, T.; NAKAMURA, M.; CHANG, A.C.; COHEN, S.N.; NUMA, S. (1979): **Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor.**
Nature 278 (5703) 423-7.
- NAKANISHI, S.; TERANISHI, Y.; WATANABE, Y.; NOTAKE, M.; NODA, M.; KAKIDANI, H.; JINGAMI, H.; NUMA, S. (1981): **Isolation and characterization of the bovine corticotropin/beta-lipotropin precursor gene.**
Eur J Biochem 115 (3) 429-38.
- NAVOLOTSKAYA, E.V.; ZARGAROVA, T.A.; LEPIKHOVA, T.N.; NURIEVA, R.I.; LIPKIN, V.M.; ZAV'YALOV, V.P. (2000): **Influence of synthetic peptide corresponding to the ACTH-like sequence of human immunoglobulin G1 on activity of murine thymocytes and peritoneal macrophages.**
Immunol Lett 72 (2) 93-9.
- NOCKHER, W.A.; SCHERBERICH, J.E. (1997): **Expression and release of the monocyte lipopolysaccharide receptor antigen CD14 are suppressed by glucocorticoids in vivo and in vitro.**
J Immunol 158 (3) 1345-52.
- NODA, M.; FURUTANI, Y.; TAKAHASHI, H.; TOYOSATO, M.; HIROSE, T.; INAYAMA, S.; NAKANISHI, S.; NUMA, S. (1982): **Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin.**
Nature 295 (5846) 202-6.
- NODA, M.; TERANISHI, Y.; TAKAHASHI, H.; TOYOSATO, M.; NOTAKE, M.; NAKANISHI, S.; NUMA, S. (1982): **Isolation and structural organization of the human preproenkephalin gene.**
Nature 297 (5865) 431-4.
- NUMA, S.; NAKANISHI, S. (1981): **Corticotropin-beta-lipotropin precursor - a multi-hormone precursor - and its gene.**
Trends Biochem Sci 274
- OATES, E.L.; ALLAWAY, G.P.; ARMSTRONG, G.R.; BOYAJIAN, R.A.; KEHRL, J.H.; PRABHAKAR, B.S. (1988): **Human lymphocytes produce pro-opiomelanocortin gene-related transcripts. Effects of lymphotropic viruses.**
J Biol Chem 263 (21) 10041-4.

- OATES, E.L.; ALLAWAY, G.P.; PRABHAKAR, B.S. (1990): **A potential for mutual regulation of proopiomelanocortin gene and Epstein-Barr virus expression in human lymphocytes.**
Ann N Y Acad Sci 594 60-5.
- OTTAVIANI, E.; FRANCESCHI, C. (1997): **The invertebrate phagocytic immunocyte: clues to a common evolution of immune and neuroendocrine systems.**
Immunol Today 18 (4) 169-74.
- OTTAVIANI, E.; PETRAGLIA, F.; MONTAGNANI, G.; COSSARIZZA, A.; MONTI, D.; FRANCESCHI, C. (1990): **Presence of ACTH and beta-endorphin immunoreactive molecules in the freshwater snail *Planorbarius corneus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata) and their possible role in phagocytosis.**
Regul Pept 27 (1) 1-9.
- OTTAVIANI, E.; COSSARIZZA, A.; ORTOLANI, C.; MONTI, D.; FRANCESCHI, C. (1991): **ACTH-like molecules in gastropod molluscs: a possible role in ancestral immune response and stress.**
Proc R Soc Lond B Biol Sci 245 (1314) 215-8.
- OTTAVIANI, E.; FRANCHINI, A.; COSSARIZZA, A.; FRANCESCHI, C. (1992): **ACTH-like molecules in lymphocytes. A study in different vertebrate classes.**
Neuropeptides 23 (4) 215-9.
- OTTAVIANI, E.; TREVISAN, P.; PEDERZOLI, A. (1992): **Immunocytochemical evidence for ACTH- and beta-endorphin-like molecules in phagocytic blood cells of urodelan amphibians.**
Peptides 13 (2) 227-31.
- OTTAVIANI, E.; CAPRIGLIONE, T.; FRANCESCHI, C. (1995): **Invertebrate and vertebrate immune cells express pro-opiomelanocortin (POMC) mRNA.**
Brain Behav Immun 9 (1) 1-8.
- OTTAVIANI, E.; FRANCHINI, A.; FRANCESCHI, C. (1997): **Pro-opiomelanocortin-derived peptides, cytokines, and nitric oxide in immune responses and stress: an evolutionary approach.**
Int Rev Cytol 170 79-141.
- OTTAVIANI, E.; FRANCHINI, A.; HANUKOGLU, I. (1998): **In situ localization of ACTH receptor-like mRNA in molluscan and human immunocytes.**
Cell Mol Life Sci 54 (2) 139-42.
- OTTAWAY, C.A.; HUSBAND, A.J. (1994): **The influence of neuroendocrine pathways on lymphocyte migration.**
Immunol Today 15 (11) 511-7.
- PACAK, K.; PALKOVITS, M.; YADID, G.; KVETNANSKY, R.; KOPIN, I.J.; GOLDSTEIN, D.S. (1998): **Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity.**
Am J Physiol 275 (4 Pt 2) R1247-55.
- PANKOV, I.U.A.; PIKOLAEVA, O.P.; ELIZAROVA, G.P. (1977): **[Amino acid sequence of corticotropins from seiwhale (*Balaenoptera borealis*) and pinwhale (*Balaenoptera physalus*)].**
Biokhimiia 42 (11) 2044-50.
- PANKOV, Y.A.; NIKOLAEVA, O.P.; ELIZAROVA, G.P. (1976): **Primary structure of fin whale's (*Balaenoptera physalus*) corticotropin.**
Bioorg Khim 2 (6) 855-6

- PECK, R. (1987): **Neuropeptides modulating macrophage function.**
Ann N Y Acad Sci 496 264-70.
- PEDERSEN, B.K.; NIEMAN, D.C. (1998): **Exercise immunology: integration and regulation.**
Immunol Today 19 (5) 204-6.
- PENG, J.; JONES, G.L.; WATSON, K. (2000): **Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements.**
Free Radic Biol Med 28 (11) 1598-606.
- PETERSON, P.K.; SHARP, B.; GEKKER, G.; BRUMMITT, C.; KEANE, W.F. (1987): **Opioid-mediated suppression of interferon-gamma production by cultured peripheral blood mononuclear cells.**
J Clin Invest 80 (3) 824-31.
- PLOTNIKOFF, N.P.; MURGO, A.J.; MILLER, G.C.; CORDER, C.N.; FAITH, R.E. (1985): **Enkephalins: immunomodulators.**
Fed Proc 44 (1 Pt 1) 118-22.
- RAMACHANDRAN, J.; TSUBOKAWA, M.; GOHIL, K. (1987): **Corticotropin receptors.**
Ann N Y Acad Sci 512 415-25.
- RASSAF, T.; PREIK, M.; KLEINBONGARD, P.; LAUER, T.; HEISS, C.; STRAUER, B.E.; FEELISCH, M.; KELM, M. (2002): **Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma.**
J Clin Invest 109 (9) 1241-8.
- REDER, A.T. (1992): **Regulation of production of adrenocorticotropin-like proteins in human mononuclear cells.**
Immunology 77 (3) 436-42.
- REDER, A.T.; PINAMANENI, S.; SMYKA, W.; NUTTER, D. (1988): **ACTH production by human mononuclear cells.**
Ann N Y Acad Sci 540 589-91.
- RINIKER, B.; SIEBER, P.; RITTEL, W.; ZUBER, H. (1972): **Revised amino-acid sequences for porcine and human adrenocorticotrophic hormone.**
Nat New Biol 235 (56) 114-5.
- ROBERTS, J.L.; HERBERT, E. (1977): **Characterization of a common precursor to corticotropin and beta-lipotropin: identification of beta-lipotropin peptides and their arrangement relative to corticotropin in the precursor synthesized in a cell-free system.**
Proc Natl Acad Sci U S A 74 (12) 5300-4.
- ROSTAING, L.; TKACZUK, J.; DURAND, M.; PERES, C.; DURAND, D.; DE PREVAL, C.; OHAYON, E.; ABBAL, M. (1999): **Kinetics of intracytoplasmic Th1 and Th2 cytokine production assessed by flow cytometry following in vitro activation of peripheral blood mononuclear cells.**
Cytometry 35 (4) 318-28.
- SANDI, C.; CAMBRONERO, J.C.; BORRELL, J.; GUAZA, C. (1990): **Modulation of lymphocyte proliferation reactivity by hypothalamic-pituitary-adrenocortical hormones.**
Neuroendocrinology 52 (1) 63
- SCHAUER, U.; JUNG, T.; KRUG, N.; FREW, A. (1996): **Measurement of intracellular cytokines.**
Immunol Today 17 (7) 305-6.

- SCHROEDER, S.; WICHERS, M.; KLINGMULLER, D.; HOFER, M.; LEHMANN, L.E.; VON SPIEGEL, T.; HERING, R.; PUTENSEN, C.; HOEFT, A.; STUBER, F. (2001): **The hypothalamic-pituitary-adrenal axis of patients with severe sepsis: altered response to corticotropin-releasing hormone.**
Crit Care Med 29 (2) 310-6.
- SCHUERWEGH, A.J.; STEVENS, W.J.; BRIDTS, C.H.; DE CLERCK, L.S. (2001): **Evaluation of monensin and brefeldin A for flow cytometric determination of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in monocytes.**
Cytometry 46 (3) 172-6.
- SEAMER, L.; SKLAR, L.A. (2001): **Time as a flow cytometric parameter.**
Methods Cell Biol 63 169-83.
- SEAMER, L.C.; BAGWELL, C.B.; BARDEN, L.; REDELMAN, D.; SALZMAN, G.C.; WOOD, J.C.; MURPHY, R.F. (1997): **Proposed new data file standard for flow cytometry, version FCS 3.0.**
Cytometry 28 (2) 118-22.
- SHAPIRO, H.M. (2001): **Principles of data acquisition and display.**
Methods Cell Biol 63 149-67.
- SHAPIRO, L.; DINARELLO, C.A. (1995): **Osmotic regulation of cytokine synthesis in vitro.**
Proc Natl Acad Sci U S A 92 (26) 12230-4.
- SHAPIRO, L.; DINARELLO, C.A. (1997): **Hyperosmotic stress as a stimulant for proinflammatory cytokine production.**
Exp Cell Res 231 (2) 354-62.
- SHEPHERD, R.G.; WILLSON, S.D.; HOWARD, K.S.; BELL, P.H.; DAVIES, D.S.; DAVIS, S.B.; EIGNER, E.A.; SHAKESPEARE, N.E. (1956): **Studies with corticotropin. III. Determination of the structure of beta-corticotropin and its active degradation products.**
J Am Chem Soc 78 5067-76
- SMITH, E.M.; BLALOCK, J.E. (1981): **Human lymphocyte production of corticotropin and endorphin-like substances: association with leukocyte interferon.**
Proc Natl Acad Sci U S A 78 (12) 7530-4.
- SMITH, E.M.; MORRILL, A.C.; MEYER WJ, 3.r.d.; BLALOCK, J.E. (1986): **Corticotropin releasing factor induction of leukocyte-derived immunoreactive ACTH and endorphins.**
Nature 321 (6073) 881-2.
- SMITH, E.M.; BROSNAN, P.; MEYER, W.J.; BLALOCK, J.E. (1987): **An ACTH receptor on human mononuclear leukocytes. Relation to adrenal ACTH-receptor activity.**
N Engl J Med 317 (20) 1266-9.
- SMITH, E.M.; GALIN, F.S.; LEBOEUF, R.D.; COPPENHAVER, D.H.; HARBOUR, D.V.; BLALOCK, J.E. (1990): **Nucleotide and amino acid sequence of lymphocyte-derived corticotropin: endotoxin induction of a truncated peptide.**
Proc Natl Acad Sci U S A 87 (3) 1057-60.
- STADLER, B.M.; AEBISCHER, I.; STÄMPFLI, M.R.; MIESCHER, S.; VOGEL, M. (1994): **Neuroendocrine and autoimmune regulation of the allergic response.**
Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M (87) 293-9.

- SULLIVAN, K.E.; CUTILLI, J.; PILIERO, L.M.; GHAVIMI-ALAGHA, D.; STARR, S.E.; CAMPBELL, D.E.; DOUGLAS, S.D. (2000): **Measurement of cytokine secretion, intracellular protein expression, and mRNA in resting and stimulated peripheral blood mononuclear cells.**
Clin Diagn Lab Immunol 7 (6) 920-4.
- VITALE, M.; CARUSO, A.; LICENZIATI, S.; RODELLA, L.; FIORENTINI, S.; ZAULI, G.; CASTELLI, F.; MANZOLI, F.A.; TURANO, A. (2000): **Differential production of IFN-gamma, analyzed at the single-cell level, by specific subsets of human NK and T cells from healthy and HIV(+) subjects.**
Cytometry 39 (3) 189-94.
- WERNER, J. (1984): **Medizinische Statistik.**
Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, S. 172-6
- WESTLY, H.J.; KLEISS, A.J.; KELLEY, K.W.; WONG, P.K.; YUEN, P.H. (1986): **Newcastle disease virus-infected splenocytes express the proopiomelanocortin gene.**
J Exp Med 163 (6) 1589-94.
- WOLOSKI, B.M.; SMITH, E.M.; MEYER WJ, 3.r.d.; FULLER, G.M.; BLALOCK, J.E. (1985): **Corticotropin-releasing activity of monokines.**
Science 230 (4729) 1035-7.
- ZHU, X.; ZHOU, A.; DEY, A.; NORRBOM, C.; CARROLL, R.; ZHANG, C.; LAURENT, V.; LINDBERG, I.; UGLEHOLDT, R.; HOLST, J.J.; STEINER, D.F. (2002): **Disruption of PC1/3 expression in mice causes dwarfism and multiple neuroendocrine peptide processing defects.**
Proc Natl Acad Sci U S A 99 (16) 10293-8.

Mein Dank gilt ...

- ... Herrn Priv.-Doz. Dr. Roland Goerlich und Herrn Prof. Dr. Heinrich Enbergs für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung meiner Arbeit und den Zugang zu der Erkenntnis, wie wissenschaftliche Spezialisierung und die Erweiterung des fachlichen und persönlichen Horizonts vereinbar sind und sich gegenseitig fördern können;
- ... der Firma Biologische Heilmittel Heel GmbH, Baden-Baden, vertreten durch Herrn Dr. Erich Reinhart, für die großzügige finanzielle Unterstützung;
- ... dem Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin der Universität Bonn für die Bereitstellung der Buffy Coats;
- ... Frau Prof. Dr. Dr. Helga Sauerwein und Frau Prof. Dr. Brigitte Schmitz, Institut für Anatomie, Physiologie und Hygiene der Haustiere, jetzt Institut für Physiologie, Biochemie und Hygiene der Tiere (IAPH), Frau Prof. Dr. Heide Schnabl, Institut für Landwirtschaftliche Botanik (ILB), jetzt Institut für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen (IMBIO), sowie Herrn Prof. Dr. Hans Büning-Pfaue, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Lebensmittelchemie, alle Universität Bonn, für die freundliche Bereitstellung von Räumen und Geräten und ihren guten Zuspruch;
- ... den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilungen Anatomie und Physiologie sowie Biochemie des IAPH, und der Abteilung Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen des ILB, insbesondere Herrn Bernd Gehrig, Frau Claudia Müller, Frau Kathrin Peter und Frau Birgit Stimper für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Labor;
- ... Herrn Dr. Stefan Jahnecke aus der Abteilung von Herrn Prof. Enbergs sowie Herrn Dr. Torsten Klockenbring und Herrn Klaus Piepenbreier aus der Gruppe von Herrn Priv.-Doz. Goerlich für viele kritische und aufmunternde wissenschaftliche Diskussionen und persönliche Gespräche.

Mehr als an dieser Stelle eigentlich möglich danke ich meiner Familie, meiner Frau Andrea und meinen Kindern für alle Geduld und Unterstützung.