Universität Ulm
Institut für Allgemeine Zoologie und Endokrinologie

Einfluss von Steroidhormonen, Calcitriol und Retinolsäure auf die Sekretion proinflammatorischer Zytokine in humanen mononukleären Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.
der Fakultät für Naturwissenschaften der Universität Ulm

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Eva Roßknecht

geboren in Tettnang

Ulm 2007

Diese Arbeit wurde im Institut für Allgemeine Zoologie und Endokrinologie der Universität Ulm angefertigt.

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Dieter Spindler

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Weidemann
Zweitgutachter: Prof. Dr. Klaus-Dieter Spindler

Tag der Promotion: 18. Dezember 2007

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Weiterhin sind alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinne nach anderen Werken entnommen sind, durch Angabe der Quellen als Entlehnung kenntlich gemacht worden.

Ulm, 28. Oktober 2007

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1 Entzündung 1

1.1.1 Zytokine 2

1.2 Wichtige intrazelluläre Signalwege in der Entzündungsreaktion 5

1.2.1 NFκB 5

1.2.2 AP-1 5

1.2.3 MAP-Kinasen 6

1.3 Bildung und Funktion von Steroidhormonen, Calcitriol und Retinolsäure . 8

1.3.1 Sexualhormone 10

1.3.2 Glucocorticoide 10

1.3.3 Vitamin D 11

1.3.4 Retinoide 12

1.3.5 Wirkungsmechanismus von Liganden nukleärer Rezeptoren 12

1.4 Zielsetzung der Arbeit 14

2. Material und Methoden 15

2.1 Material 15

2.1.1 Isolierung humaner mononukleärer Zellen 15

2.1.2 Durchflußzytometrie 15

2.1.3 Zellkultur 15

2.1.4 ELISA 16

2.1.5 Zellvitalitätstest 16

2.1.6 Northern Blot 17

2.1.7 Western Blot 18

2.1.8 Geräte 20

2.1.9 Software 20

2.2 Methoden 21
2.2.1 Isolierung humaner mononukleärer Zellen 21
2.2.2 Durchflußzytometrie 22
2.2.3 Zellkultur 23
2.2.4 ELISA 24
2.2.5 Zellvitalitätstest 26
2.2.6 Northern Blot 26
2.2.7 Western Blot 29
2.2.8 Statistische Auswertung 32

3. Ergebnisse 33

3.1 Charakterisierung der verwendeten Zellmodellsysteme 33
3.1.1 Charakterisierung humaner mononukleärer Zellen 33
3.1.2 Charakterisierung humaner monozytärer Zelllinien 36
3.2 Untersuchungen zur Zytokinsekretion 38
3.2.1 Einfluss von Dexamethason 39
3.2.2 Einfluss von Sexualhormonen 40
3.2.3 Einfluss von Calcitriol 42
3.2.4 Einfluss von Retinolsäure 46
3.2.5 Vergleich von mononukleären Zellen und monozytären Zelllinien ... 50
3.3 Untersuchungen zur Zellvitalität 52
3.4 Untersuchungen zur Signaltransduktion 53
3.4.1 Einfluss von Retinolsäure auf die Transkriptmenge von TNF-α 53
3.4.2 Einfluss von Retinolsäure auf die Aktivität von MAP-Kinasen 57

4. Diskussion 61

4.1 Charakterisierung der verwendeten Zellmodellsysteme 62
4.2 Untersuchungen zur Zytokinsekretion 64
4.2.1 Einfluss von Dexamethason 65
4.2.2 Einfluss von Sexualhormonen 66

4.2.3 Einfluss von Calcitriol 68
4.2.4 Einfluss von Retinolsäure 71
4.3 Untersuchungen zur Signaltransduktion 75
4.3.1 Einfluss von Retinolsäure auf die Transkriptmenge von TNF-α 76
4.3.2 Einfluss von Retinolsäure auf die Aktivität von MAP-Kinasen 77

5. Zusammenfassung 84

6. Summary 86

7. Literaturverzeichnis 88

8. Publikationen 102

9. Lebenslauf 103

10. Danksagung 104

1. Einleitung

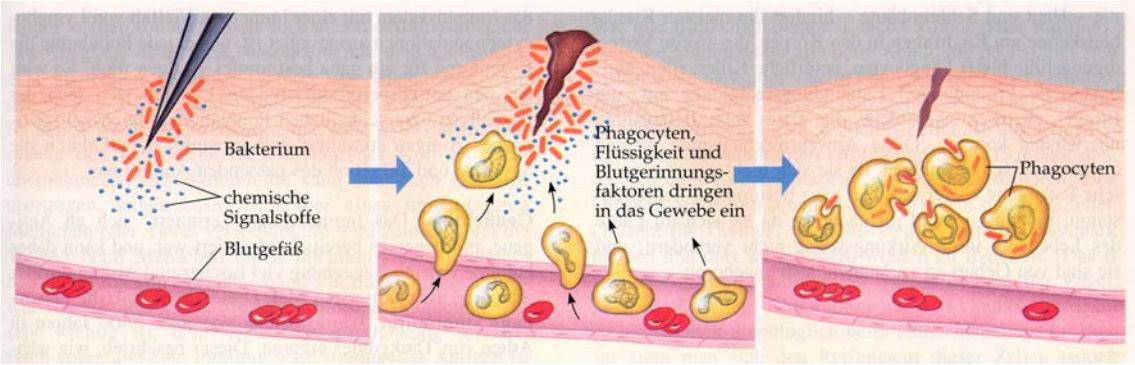
1.1 Entzündung

Eine Entzündung ist eine charakteristische Antwort auf einen äußeren oder innerlich ausgelösten Reiz. Auslösende Reize können Mikrooganismen (z.B. Bakterien, Viren oder Pilze) aber auch physikalische und chemische Reize (z.B. Verletzungen und Säuren) sein. Das Ziel der Entzündungsreaktion ist es, den Körper in erhöhte Abwehrbereitschaft zu versetzen, den schädigenden Reiz zu beseitigen und die reizbedingte Gewebeschädigung zu reparieren.

Blutgefäße, die das verletzte Gewebe umgeben, leiten die Entzündungsreaktion ein (Abb. 1). Es kommt zur Gefäßerweiterung, dies erhöht die Blutversorgung der betroffenen Region und verursacht die typische Rötung und Wärmeentwicklung. Die Permeabilität der Gefäßwände wird durch Gefäßmediatoren, darunter Histamin und Prostaglandin, gesteigert, so dass Plasmaproteine und Blut-Flüssigkeit aus dem Blut in das benachbarte Gewebe eindringen. Dies bewirkt die Schwellung, welche mit der Entzündung einhergeht.

Ein zentrales Ereignis stellt die Einwanderung von Leukozyten in das verletzte Gewebe dar. Mehrere Signalstoffe, einschließlich einiger Proteine des Komplementsystems, locken Phagozyten chemotaktisch zum geschädigten Gewebe. Neutrophile Granulozyten treffen in der Regel zuerst am Verletzungsort ein, gefolgt von Monozyten, die sich zu Makrophagen differenzieren. Neutrophile Granulozyten und Makrophagen beseitigen den Entzündungsreiz und phagozytieren geschädigte und nekrotische Zellen. Lymphozyten werden ebenfalls zum betroffenen Gewebe geleitet. Sie bilden spezifische Antikörper und sorgen dadurch für eine bleibende Immunität. Währenddessen setzen die erwähnten Leukozyten aber auch andere Immunzellen, wie z.B. Mastzellen, eine große Zahl an inflammatorischen Mediatoren frei, welche die Entzündungsreaktion steuern. Dazu gehören unter anderem Enzyme, reaktive Sauerstoffverbindungen, Eicosanoide, Wachstumsfaktoren und insbesondere Zytokine. Mediatoren der Entzündung dienen primär dazu, eingedrungene Schadstoffe zu neutralisieren und den Heilungsprozess einzuleiten. Enzyme degradieren Fremdstoffe, reaktive Sauerstoffverbindungen töten eingedrungene Infektionserreger ab, Prostaglandine und Leukotriene beschleunigen den Abtransport von Abbauprodukten, um nur einige Beispiele zu nennen.

Im Allgemeinen hat die Entzündung einen akuten Verlauf und ist innerhalb weniger Tage oder Wochen beendet. Allerdings werden Abweichungen von einer normalen Entzündungsreaktion mit vielen entzündungsbedingten Krankheiten und Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang gebracht, darunter rheumatoide Arthritis, Psoriasis und Morbus Crohn. Eine Übersicht zum Thema Entzündung und entzündungsbedingte Krankheiten findet sich u.a. bei Gemsa et al. [1] und Elenkov et al. [2].



A **B** **C**

Abbildung 1: Stark vereinfachtes Schema der Entzündungsreaktion. (**A**) Der auslösende Reiz einer Entzündungsreaktion kann eine Gewebeverletzung sein. Zellen des verletzten oder von Bakterien befallenen Gewebes setzen inflammatorische Mediatoren frei, darunter z.B. Histamin und Prostaglandine. (**B**) Diese Mediatoren erhöhen im betroffenen Areal die Permeabilität und Durchblutung der Kapillaren. Andere freigesetzte Signalstoffe locken Phagozyten und Lymphozyten an. (**C**) Neutrophile Granulozyten und Makrophagen phagozytieren Keime und Zellentrümmer. Der Heilungsprozess des Gewebes beginnt (aus [3]).

1.1.1 Zytokine

Zytokine sind kleine Signalmoleküle, die vorwiegend von Zellen des Immunsystems gebildet werden. Zytokine spielen eine wichtige Rolle in der Entzündung, indem sie die Richtung, Stärke und Dauer der Reaktion steuern.

Zytokine werden normalerweise in Interferone, Interleukine, Tumornekrosefaktoren, koloniestimulierende Faktoren und Wachstumsfaktoren eingeteilt. Obwohl sie eine heterogene Gruppe von Proteinen sind, haben sie eine Reihe von Eigenschaften gemeinsam: Ihre Synthese und Freisetzung werden hauptsächlich durch aktivierende

Stimuli gesteuert. Ihre Sekretion ist ein kurzer selbstlimitierender Vorgang, der nur solange andauert, wie die Produktionszelle aktiviert wird. Die Wirkung der Zytokine wird über membranständige Rezeptoren vermittelt und kann sowohl autokrin, parakrin oder endokrin sein. Zytokine können vielfältige, überlappende und manchmal auch entgegengesetzte Wirkungen haben. Diese sind abhängig von der Konzentration, dem Wirkungsort und dem Vorkommen anderer Mediatoren (zur Vertiefung siehe z.B. Abbas et al. [4]).
Nicht alle Zytokine haben das gleiche Entzündungs-auslösende Potential. An dieser Stelle soll auf zwei Zytokine näher eingegangen werden, die eine besondere Bedeutung für die Entzündungsreaktion haben und in dieser Arbeit untersucht wurden: Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) und Interleukin-6 (IL-6).

Tumornekrosefaktor-α

Die Bezeichnung „Tumornekrosefaktor“ hat historische Gründe und geht auf die Beobachtung zurück, dass die Injektion von Lipopolysacchariden einen löslichen Faktor aus Makrophagen freisetzt, der Tumorzellen zerstören kann.
TNF-α ist ein wichtiger multifunktionaler Signalstoff des Immunsystems, welcher in die lokale und systemische Entzündungen involviert ist. Seine wichtigste Funktion ist, die Kontrolle der Aktivität verschiedener Immunzellen. TNF-α wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen, aber auch von aktivierten T-Lymphozyten und anderen Zellen freigesetzt. Die wichtigsten Stimuli, welche die TNF-α-Sekretion bewirken, sind Lipopolysaccharide (LPS), andere bakterielle Produkte und Interleukin-1β. TNF-α wird als einer der wichtigsten Effektoren des humoralen Immunsystems angesehen. Allerdings werden auch einige chronische, entzündungsbedingte Krankheiten und Autoimmunerkrankungen mit TNF-α in Zusammenhang gebracht. Die positiven und negativen Effekte werden durch die proinflammatorische Wirkung von TNF-α vermittelt. Dazu zählen die Stimulation von Endothelzellen zur Bildung von Adhäsionsmolekülen, die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und die Stimulation von Monozyten zur Zytokinsekretion (Übersicht z.B. bei [5, 6]). TNF-α besitzt eine ähnliche Wirkung wie IL-1 und IL-6. Ein Vergleich ist in Tabelle 1 dargestellt.

Interleukin-6

Der Name der Interleukine ergibt sich aus ihrer Eigenschaft, von Leukozyten gebildet zu werden und auf andere Leukozyten zu wirken. IL-6 wird von vielen Zelltypen

gebildet, darunter Monozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und aktivierte T-Lymphozyten. Die Sekretion des Zytokins wird unter anderem induziert durch Verletzung, Stress und Infektionen. Zu den löslichen Faktoren, welche die IL-6-Sekretion stimulieren, gehören Zytokine (z.B. IL-1, TNF-α) und bakterielle Komponenten (z.B. LPS). IL-6 ist unter anderem beteiligt an der Regulierung der Immunantwort, der Akut-Phase-Reaktion und der Blutbildung. So stimuliert IL-6 zum Beispiel die Antikörperproduktion in aktivierten B-Zellen und die Synthese von Akut-Phase-Proteinen in der Leber. Eine übermäßige Expression von IL-6 wird mit vielen Krankheiten in Verbindung gebracht, dazu gehören Alzheimer, Bronchialasthma, Multiple Sklerose und Typ II Diabetes (Übersicht z.B. bei [5, 6]).

Tabelle 1: Vergleich der Wirkung von TNF-α, IL-1 und IL-6. (+) aktivierende Wirkung; (–) keine Wirkung (aus [5]).

	TNF-α	**IL-1**	**IL-6**
Endogenes pyrogenes Fieber	+	+	+
Hepatische Akut-Phase-Proteine	+	+	–
T-Zell-Aktivierung	+	+	+
B-Zell-Aktivierung	+	+	+
B-Zell-Antikörper-Synthese	–	–	+
Fibroblasten-Proliferation	+	+	–
Stammzell-Aktivierung (Hämopoetin 1)	–	+	+
Unspezifische Immunabwehr	+	+	+
Radioprotektion	+	+	–
Cyclooxygenase, PLA2-Genexpression	+	+	–
Synovialzell-Aktivierung	+	+	–
Endothelzell-Aktivierung	+	+	–
Schocksyndrom	+	+	–
Induktion von IL-1, IL-6, IL-8 und TNF-α	+	+	–

1.2 Wichtige intrazelluläre Signalwege in der Entzündungsreaktion

Die Aktivierung der Entzündungsreaktion wird in Immunzellen über verschiedene intrazelluläre Signalwege vermittelt. Von großer Bedeutung sind dabei der NFκB- und der AP-1-Signalweg. Außerdem wird in letzter Zeit eine wichtige Rolle der MAP-Kinase-Signalwege diskutiert. Die nächsten Kapitel sollen einen Einblick in die Funktion von NFκB, AP-1 und insbesondere der MAP-Kinasen geben.

1.2.1 NFκB

Der Nukleäre Faktor kappa B (NFκB) ist ein Dimer-bildender Transkriptionsfaktor, der sich aus Untereinheiten verwandter Proteine der Rel-Familie zusammensetzt.
NFκB wird in fast allen Zelltypen exprimiert und ist an vielen zellulären Prozessen beteiligt, die eine schnelle Aktivierung der Genexpression erfordern. In nicht stimulierten Zellen ist NFκB inaktiv und bildet einen Komplex mit Proteinen der Inhibitor-Familie IκB. Extrazelluläre Stimuli, darunter Zytokine, bakterielle Antigene und oxidativer Stress bewirken eine Degradation des Inhibitors und aktivieren NFκB, welcher im Zellkern die Expression diverser Zielgene moduliert. Eine besondere Bedeutung kommt NFκB in der Regulierung der Immunantwort zu. NFκB aktiviert eine Vielzahl immun- und entzündungsrelevanter Gene, darunter Zytokine, Zelladhäsionsmoleküle, antiapoptotische Faktoren und Immunrezeptoren (zur Übersicht siehe z.B. Karin et al. [7] und Hayden et al. [8]).

1.2.2 AP-1

Aktivator-Protein-1 (AP-1) ist eine kollektive Bezeichnung für dimerische Transkriptionsfaktoren, die aus Mitgliedern der Jun-, Fos- und ATF-Familie bestehen. Die meisten für AP-1-Komponenten kodierenden Gene gehören zu den *immediate-early-genes*. Wie der Name verrät wird die Transkription dieser Gene schnell induziert. Zu den Stimuli von AP-1 gehören unter anderem Wachstumsfaktoren, Zytokine und UV-Strahlung. Viele Mechanismen sind an der Induktion der AP-1-Aktivität beteiligt, darunter der MAP-Kinase Signalweg (siehe nächstes Kapitel). AP-1 wurde eine

wesentliche Bedeutung im Hinblick auf Zellwachstum, Differenzierung, Tumorentstehung und -entwicklung nachgewiesen (Übersicht u.a. bei Angel et al. [9]).

1.2.3 MAP-Kinasen

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) verbinden membranständige Rezeptoren mit intrazellulären Zielmolekülen. Sie werden durch extrazelluläre Stimuli (Mitogene) aktiviert und regulieren viele zelluläre Prozesse, darunter Genexpression, Mitose, Zelldifferenzierung und Apoptose. Ihre Aktivität wird durch eine dreistufige Kaskade reguliert, beginnend mit einer MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK), gefolgt von einer MAP-Kinase-Kinase (MAPKK) und einer MAP-Kinase (Abb. 2). Jede MAP-Kinase kann durch mehr als eine vorgeschaltete Kinase aktiviert werden, was die Komplexität des Signalwegs erhöht. Aktivierte MAP-Kinasen phosphorylieren Serin- und Threonin-Reste spezifischer Zielproteine, darunter andere Proteinkinasen, Phospholipasen, Transkriptionsfaktoren und Zytoskelettproteine. Die Dephosphorylierung und damit die Inaktivierung von MAP-Kinasen wird durch MAP-Kinase-Phosphatasen reguliert (zur Vertiefung siehe z.B. Roux et al. [10] und Zhang et al. [11]).
In Säugetierzellen wurden drei wichtige MAP-Kinase-Familien charakterisiert: *extracellular signal-related kinases* (ERK), p38-MAP-Kinasen (p38) und c-Jun-N-terminale Kinasen (JNK). Diese sollen in den nächsten Abschnitten kurz beschrieben werden.

ERK

Die *extracellular signal-related kinase* (ERK) wird auch als klassische MAP-Kinase bezeichnet. Ihre Isoformen ERK1 und ERK2 werden in unterschiedlichem Ausmaß in fast allen Geweben exprimiert. Wichtige extrazelluläre Stimuli sind Wachstumsfaktoren, Serum und Mitogene. Deren Signale werden über membranständige Rezeptoren (häufig Rezeptor-Tyrosinkinasen) und verschiedene Isoformen des kleinen GTP-bindenden Proteins Ras zu der Raf/MEK/ERK-Kaskade weitergeleitet. Die Aktivierung von ERK bewirkt ihre Translokalisation und Anreicherung im Zellkern, wodurch wiederum zahlreiche nukleäre Faktoren, darunter Elk-1 und c-Fos, phosphoryliert werden. Weitere Substrate von ERK sind Membranproteine, Zytoskelettproteine und andere Proteinkinasen. ERK übernimmt eine wichtige Funktion in der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung (siehe z.B. [10]).

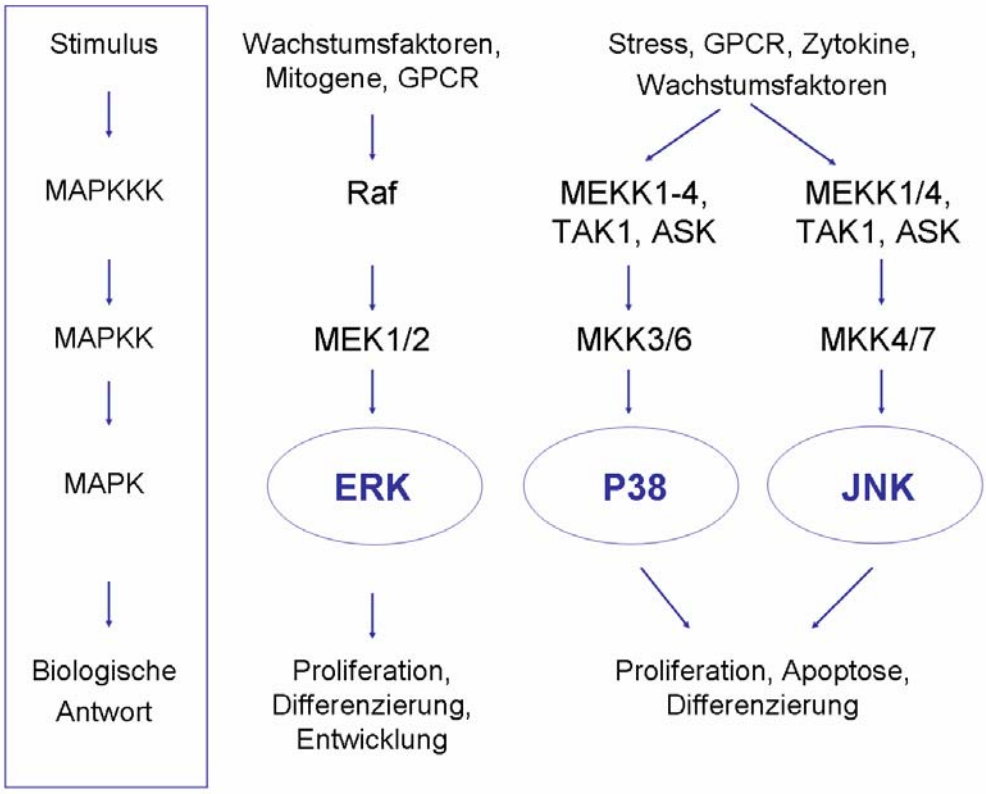


Abbildung 2: Wichtige MAP-Kinase Signalkaskaden in Säugetierzellen. (verändert nach [11]).

p38

Es gibt vier Isoformen der MAP-Kinase p38: α, β, γ und δ, wobei p38α am besten charakterisiert ist und in fast allen Zelltypen exprimiert wird. Wichtige extrazelluläre Stimuli für p38 sind Liganden G-Protein gekoppelter Rezeptoren, Zytokine sowie physikalische und chemische Stress-Stimuli. Wichtige vorgeschaltete Kinasen für p38 sind die MAPKKs MKK3 und MKK6. Die Aufklärung des Wirkungsmechanismus von p38 ist noch nicht weit fortgeschritten, doch einige Substratproteine konnten bereits nachgewiesen werden, darunter Phospholipase 2 und die Transkriptionsfaktoren ATF1, ATF2, Elk-1, NFκB und Ets-1.
p38 ist von Bedeutung für das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und die Apoptose. Außerdem deuten einige Studien auf eine wichtige Funktion von p38 in der Regulierung der Immunantwort hin. (siehe z.B. [10]).

JNK

Zu den c-Jun N-terminalen Kinasen gehören die Isomere JNK1, JNK2 und JNK3. Die Charakterisierung von JNK basiert auf der Erkenntnis, dass diese MAP-Kinase-Familie durch Stress-Stimuli, z.B. UV-Strahlung, stark aktiviert wird. Deshalb wird sie auch als Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK) bezeichnet. In Übereinstimmung mit p38, wird JNK durch Liganden G-Protein gekoppelter Rezeptoren und Zytokine stark aktiviert und ist wichtig für die Regulierung von Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose. JNK wird durch die MKKs MMK4 und MKK7 aktiviert. Ein gut erforschtes Substrat für JNK ist der Transkriptionsfaktor c-Jun, welcher zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren den Transkriptionskomplex AP-1 bildet. Eine besondere Bedeutung kommt JNK in der Regulierung der Apoptose zu (siehe z.B. [12]).

1.3 Bildung und Funktion von Steroidhormonen, Calcitriol und Retinolsäure

Für die Behandlung von entzündungsbedingten Krankheiten werden eine Vielzahl entzündungshemmender Wirkstoffe eingesetzt, darunter insbesondere Glucocorticoide. In den letzten Jahren sind auch andere Wirkstoffe mit potentiell immunmodulatorischem Einfluss in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Dazu zählen andere Steroidhormone, Calcitriol und Retinolsäure. Im Folgenden soll näher auf die Funktion und Wirkung dieser Hormone eingegangen werden.

Zu den Steroidhormonen gehören die Sexualhormone (Östrogene, Gestagene und Androgene) und die Nebennierenrindenhormone (Glucocorticoide und Mineralocorticoide). In der Biosynthese der Steroidhormone stellt Cholesterin eine zentrale Ausgangsverbindung dar. Steroidhormone haben vielfältige Funktionen in Säugetieren, sie kontrollieren u.a. das Wachstum, die Entwicklung und die Homöostase vieler Gewebe ([13]). In dieser Arbeit wurden die Sexualhormone 17β-Östradiol und Testosteron, das synthetische Glucocorticoid Dexamethason und das Secosteroid Calcitriol eingesetzt. Außerdem wurde das Terpen-Derivat Retinolsäure verwendet. In Übereinstimmung mit Steroidhormonen, wird die Wirkung von Calcitriol und Retinolsäure vorwiegend über die Bindung an nukleäre Rezeptoren vermittelt. Diese nukleären Rezeptoren stellen die größte, bekannte Familie von Transkriptionsfaktoren

in Eukaryoten dar. Zu den nukleären Rezeptoren gehören die Steroidhormon-Rezeptoren, wie der Androgen- und der Östrogen-Rezeptor, außerdem der Vitamin D-Rezeptor (VDR), der Retinolsäure-Rezeptor (RAR), der Retinoid X Rezeptor (RXR), der Thyroxin-Rezeptor (TR), der Ecdyson-Rezeptor (EcR) und viele andere metabolische Rezeptoren (zur Vertiefung siehe z.B. [14-16]). Abbildung 3 zeigt die Struktur von Liganden der Steroidhormonrezeptoren und der RXR-heterodimeren Rezeptoren.

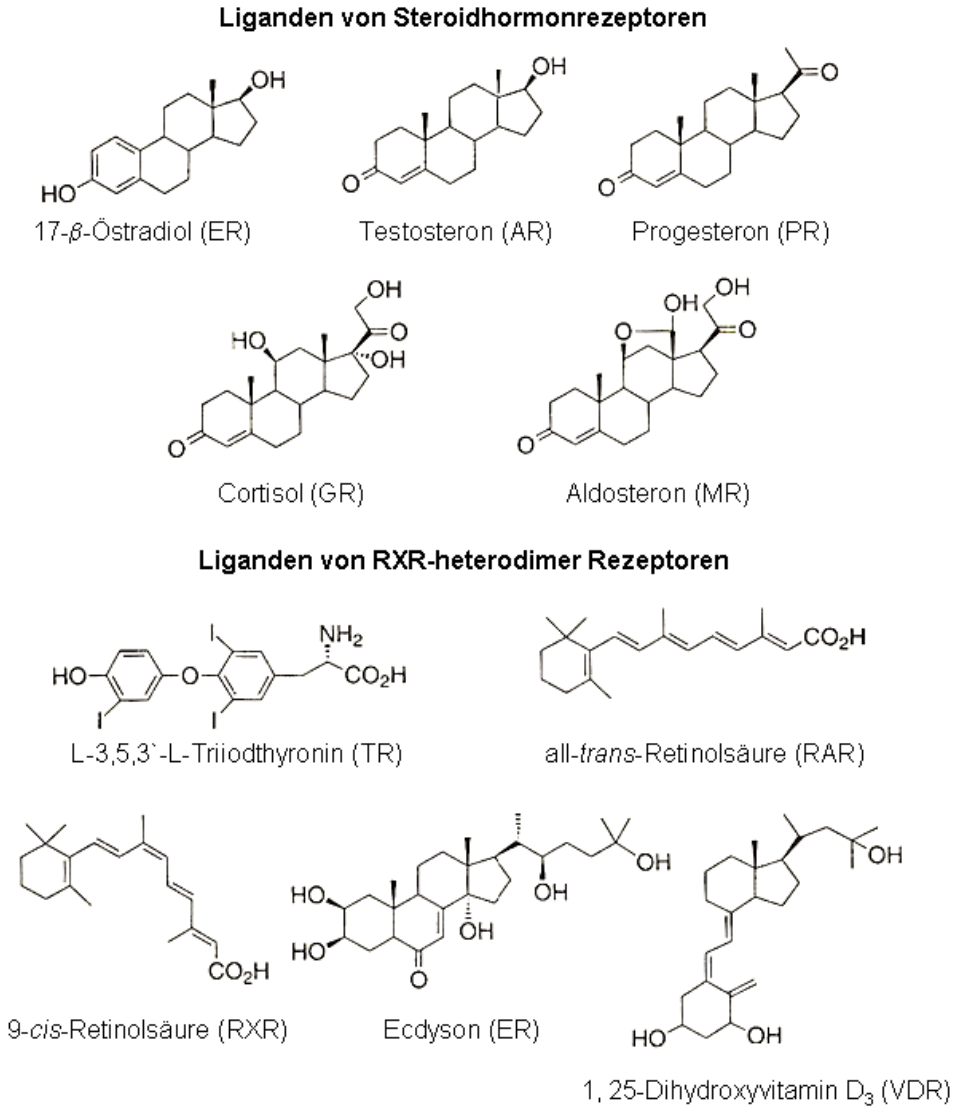


Abbildung 3: Liganden nukleärer Rezeptoren, eingeteilt nach ihrer Bindung an Steroidhormon-Rezeptoren und RXR-Heterodimer-Rezeptoren (verändert nach [17]).

1.3.1 Sexualhormone

Der wichtigste Vertreter der männlichen Sexualhormone (Androgene) ist das Testosteron, welches hauptsächlich in den Leydig-Zwischenzellen der Hoden gebildet wird. Die weiblichen Sexualhormone Östrogene und Gestagene werden hautsächlich in den Ovarien gebildet. Ihre wichtigsten Vertreter sind das 17β-Östradiol und das Progesteron. Männliche und weibliche Sexualhormone kommen in beiden Geschlechtern in unterschiedlichen Mengenverhältnissen vor. Beim Mann beträgt die Testosteron-Konzentration im Blut 10 nM bis 35 nM, bei der Frau weniger als 3,5 nM. Die Östradiol-Konzentration schwankt bei der Frau zyklusabhängig zwischen 70 und mehr als 740 pM, beim Mann beträgt sie weniger als 180 pM (siehe z.B. [18]).
Produktion und Freisetzung von Testosteron und Östradiol wird durch das Follikel-stimulierende Hormon (FSH) und das Luteotrope Hormon (LH) der Adenohypophyse kontrolliert. Deren Sekretion wiederum wird durch das Gonadotropin-Releasinghormon (GnRH) des Hypothalamus reguliert. Die Titer von FSH, LH und GnRH im Blut unterliegen einem komplexen negativen Rückkopplungsmechanismus (siehe z.B. [19]). Die wichtigste Funktion der Sexualhormone ist die Entwicklung und der Erhalt der männlichen bzw. weiblichen Fortpflanzungssysteme, die sexuelle Reifung während der Pubertät und die Steuerung der Sexualfunktionen. Darüber hinaus beeinflussen Sexualhormone viele andere physiologische Prozesse, wie Muskel- und Fett-Metabolismus, Knochenreifung, das Herz-Kreislaufsystem und das Immunsystem. Eine Übersicht zu Sexualhormonen findet sich z.B. bei Wilson et al. [18], Bhasin et al. [20] und Murphy et al. [21].

1.3.2 Glucocorticoide

Glucocorticoide werden zum größten Teil in der Nebennierenrinde gebildet. Ihr wichtigster Vertreter ist das Cortisol, welches in seiner Struktur den Sexualhormonen Testosteron, Östradiol und Progesteron ähnelt (siehe Abb. 3). Die Regulation der Cortisol-Freisetzung erfolgt über das Adrenocortiotrope Hormon (ACTH), das in der Adenohypophyse unter dem Einfluss des Corticotropin-Releasinghormons (CRH) des Hypothalamus gebildet wird. Auch hier liegt ein Fall von negativer Rückkopplung vor, indem erhöhte Konzentrationen von Cortisol die Sekretion von ACTH unterdrücken. Die Cortisol-Konzentration im Blut unterliegt einem tageszeitlichen Rhythmus und befindet sich zwischen 80 nM und 690 nM (siehe z.B. [22]).

Glucocorticoide wirken hauptsächlich auf den Kohlenhydrat-, Fett- und Protein-Stoffwechsel. Eine besondere Funktion übernehmen sie im Glucose-Metabolismus. Glucocorticoide erhöhen den Blutzuckerspiegel, indem sie die Aufnahme von Glucose in die Körperzellen verringern und den Glykogenabbau, sowie die Synthese von Glucose aus Nicht-Kohlenhydraten stimulieren. Außerdem beeinflussen Glucocorticoide die Skelettmuskulatur, indem sie den Abbau von Muskelproteinen induzieren, welche wiederum in Leber und Niere zu Glucose umgebaut werden.
Neben ihren vielfältigen metabolischen Funktionen sind Glucocorticoide gut bekannt für ihre starke immunsuppressive und entzündungshemmende Wirkung. Aufgrund dieser Eigenschaft ist der Einsatz von Glucocorticoiden in der Therapie von entzündungsbedingten Krankheiten und Autoimmunerkrankungen weit verbreitet. Neben Cortisol werden auch synthetische Glucocorticoide eingesetzt, die eine längere biologische Halbwertszeit und einen höheren Wirkungsgrad aufweisen. So wird z.B. dem in dieser Arbeit eingesetzten Dexamethason eine zehnfach längere Halbwertszeit und ein ca. vierfach höherer Wirkungsgrad zugesprochen [23] (zur Vertiefung siehe z.B. Adcock et al. [24]).

1.3.3 Vitamin D

Vitamin D wird aus historischen Gründen als Vitamin bezeichnet, ist laut Definition aber kein Vitamin, da es unter Einwirkung von Sonnenlicht vom Körper selbst synthetisiert werden kann. Vitamin D_3 ist das natürlich vorkommende Derivat von Vitamin D, es wird entweder mit der Nahrung aufgenommen oder aus der Vorstufe 7- Dehydrocholesterol mithilfe von UVB-Strahlen in der Haut gebildet. Vitamin D_3 hat selbst keine biologische Aktivität, es wird in der Leber und in der Niere in die biologisch aktive Form 1α, $25(OH)_2$Vitamin D_3 (Calcitriol) umgewandelt.
Die Calcitriol-Biosynthese wird durch Calcium- und Phosphat-Ionen gehemmt und durch Parathormon aktiviert. Die physiologische Konzentration von Calcitriol liegt zwischen 36 pM und 144 pM (siehe z.B. [18]).
Calcitriol wird als Secosteroid bezeichnet, weil es eine große, strukturelle Ähnlichkeit zu Steroidhormonen aufweist und wie Steroidhormone seine Wirkung über einen nukleären Rezeptor vermittelt. Calcitriol ist essentiell für die Kontrolle der Calcium- und Phosphat-Homöostase und für die Entwicklung und Aufrechterhaltung eines gesunden mineralisierten Skeletts. Daneben beeinflusst Calcitriol einige andere

biologische Prozesse, wie das Zellwachstum, die Apoptose, die Funktion der Haut und das Immunsystem. Eine Übersicht zu Vitamin D findet sich z.B. bei Dusso et al. [25].

1.3.4 Retinoide

Zu den Retinoiden gehört das Retinol, gut bekannt als Vitamin A, und dessen Derivate Retinal und Retinolsäure. Eingeteilt nach ihrer chemischen Struktur gehören die Retinoide zu den Diterpenen. Natürliche Vitamin A-Metabolite sind laut Definition Vitamine: sie werden nicht aus körpereigenen Strukturen synthetisiert, sondern müssen mit der Nahrung aufgenommen werden. Andererseits zeigen Retinoide Hormon-ähnliche Wirkungen, indem sie in Form von Retinolsäure an spezifische nukleäre Rezeptoren binden und diese aktivieren.
Das mit der Nahrung aufgenommene β-Carotin wird in Retinol umgewandelt, welches im Blut zirkuliert. Im Zielgewebe wird Retinol zum Aldehyd Retinal metabolisiert, welches irreversibel zu Retinolsäure oxidiert werden kann. Die Konzentrationen von Retinol und Retinolsäure im Blut beträgt ca. 1 µM bzw. 10 nM (siehe z.B. [26]).
Retinoide übernehmen eine wichtige Rolle in vielen biologischen Funktionen, dazu gehören der Sehvorgang, epidermales Zellwachstum und Zelldifferenzierung, die Spermatogenese und die embryonale Entwicklung. Außerdem sind Retinoide von Bedeutung für die optimale Funktion des Immunsystems (zur Vertiefung siehe z.B. Hansen et al. [26] und Reichrath et al. [27]).

1.3.5 Wirkungsmechanismus von Liganden nukleärer Rezeptoren

Liganden nukleärer Rezeptoren gelangen aus dem Blutkreislauf in die Zielzelle und binden dort an spezifische nukleäre Rezeptoren. Inaktive nukleäre Rezeptoren bilden einen Komplex mit Hitzeschockproteinen, die z.B. den Rezeptor stabilisieren und ihn so vor Denaturierung schützen. Die Bindung des Liganden an seinen nukleären Rezeptor bewirkt die Abdissoziation von Hitzeschockproteinen und die Aktivierung des Rezeptors. Bei einigen Steroidhormon-Rezeptoren, wie dem Glucocorticoid-Rezeptor (GR) und dem Androgen-Rezeptor (AR), findet die Ligandenbindung im Zytoplasma statt, welche eine Translokation in den Zellkern auslöst. Andere nukleäre Rezeptoren wie der Östrogen-Rezeptor (ER) und der Vitamin D Rezeptor (VDR) befinden sich auch ohne Stimulus hauptsächlich im Zellkern. Dort erfolgen die Dimerisierung von

Hormon-Rezeptor-Komplexen und die Bindung an spezifische Abschnitte der DNA, sogenannte hormonresponsive Elemente (HRE), welche zur Regulation der Transkription hormonabhängiger Gene führt (Abb. 4, zur Übersicht siehe z.B. Rasenick et al. [28]).

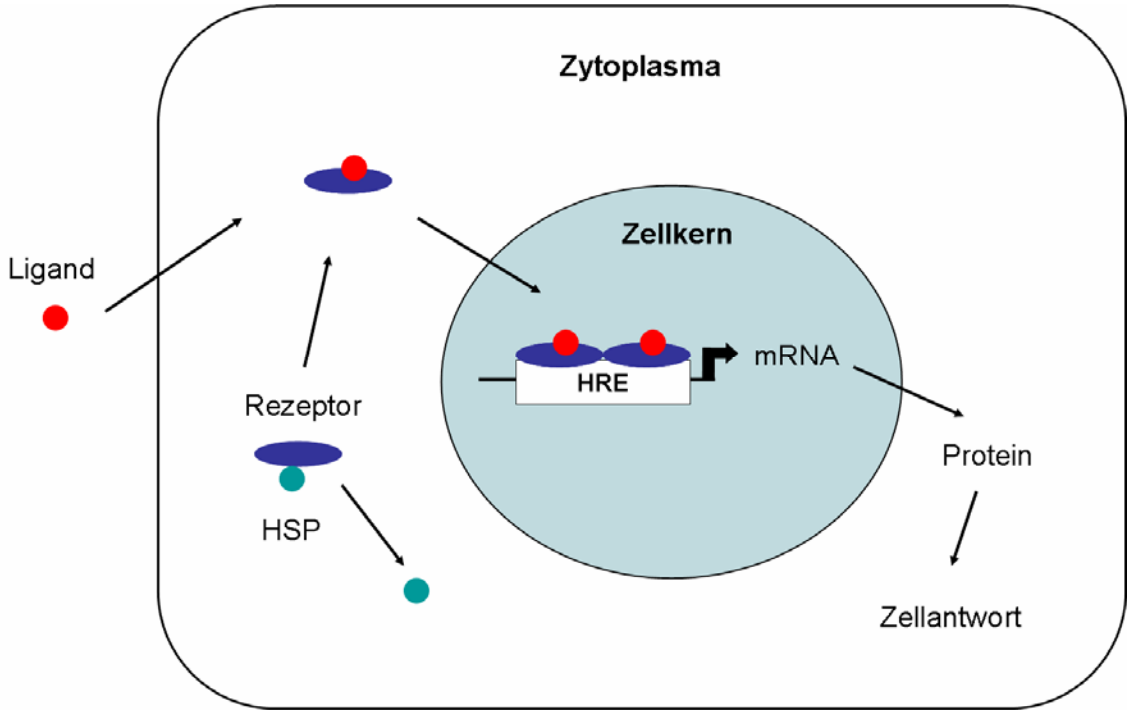


Abbildung 4: Schema des Wirkungsmechanismus von Liganden nukleärer Rezeptoren. Liganden nukleärer Rezeptoren diffundieren in die Zelle und binden dort an spezifische nukleäre Rezeptoren. Die Bindung des Liganden an seinen nukleären Rezeptor bewirkt die Abdissoziation von Hitzeschockproteinen und die Aktivierung des Rezeptors. Nach der Translokation in den Zellkern, binden nukleäre Rezeptoren an hormonresponsive Elemente (HRE) und regulieren die Genexpression.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Glucocorticoide sind gut bekannt für ihre immunsuppressive und antiinflammatorische Wirkung. In den letzten Jahren sind auch andere Wirkstoffe mit potentiell immunmodulatorischem Einfluss in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Dazu zählen andere Steroidhormone, das Secosteroid Calcitriol und das Terpenoid Retinolsäure. Allerdings ist erst wenig über die Funktion und die molekularen Mechanismen dieser Hormone in der Entzündungsreaktion bekannt.

In der vorliegenden Arbeit sollte anhand humaner mononukleärer Zellen der Einfluss von Steroidhormonen, Calcitriol und Retinolsäure auf die Sekretion der proinflammatorischer Zytokine TNF-α und IL-6 untersucht werden. Um einen eventuellen, geschlechtsspezifischen Unterschied in der Zytokinsekretion aufzuklären, wurden sowohl monozytäre Zellen männlicher als auch weiblicher Spender eingesetzt. Darüber hinaus bestand die Aufgabe darin, den Einfluss von Retinolsäure auf die Signaltransduktion in LPS-stimulierten, humanen monozytäre Zellen aufzuklären.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Isolierung humaner mononukleärer Zellen

Buffy coat, DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg, Ulm
Hank's balanced salt solution (HBSS), Sigma, Deisenhofen
Leucosep Zentrifugenröhrchen, Greiner, Frickenhausen
Lymphozytentrennmedium LSM 1077, PAA, Cölbe
PBS, Invitrogen, Karlsruhe
Percoll, Sigma, Deisenhofen

2.1.2 Durchflußzytometrie

CD14-PE, Becton Dickinson, USA
CD3-FITC Becton Dickinson, USA
FACS-Röhrchen, Falcon, Franklin Lakes, NY, USA
FACS Calibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY, USA
Paraformaldehyd, Merck, Deutschland
PBS, Invitrogen, Karlsruhe

2.1.3 Zellkultur

Humanes Serum AB, PAA, Cölbe
PBS, Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin, Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640 ohne Phenolrot, PAA, Cölbe
FCS standardisiert, Invitrogen, Karlsruhe
Zellkulturflaschen 75 cm2, Costar, New York, USA

2.1.4 ELISA

Duoset ELISA Kit human IL-6, R & D Systems, Minneapolis, MN, USA
Duoset ELISA Kit human TNF-α, R & D Systems, Minneapolis, MN, USA
Immulon 2HB (ELISA 96-*well* Platten), Merck, Darmstadt
Reagent Pack (ELISA Standard), R & D Systems, Minneapolis, MN, USA
Schwefelsäure, Sigma, Deisenhofen

Puffer und Lösungen

Block buffer:
1 % BSA
5 % Sucorse
0,05 % Natriumnitrit
in PBS

Reagent diluent:
0,1 % BSA
0,05 % Tween 20
in Tris-buffered saline
0,2 µm steril filtriert
250 µl Tween 20

Tris-buffered saline (pH: 7,3):
20 mM Trizma base
150 mM NaCl (M: 58,44)

Wash buffer:
0,05 % Tween 20
in PBS, pH: 7,4

2.1.5 Zellvitalitätstest

CellTiter 96 Aqueous (MTS-Test), Promega, Madison, WI, USA

2.1.6 Northern Blot

^{32}P-α-dCTP, Arbeitsbereich Isotopenanwendung, Abteilung VI-3, Dezernat IV, Universitätsklinikum Ulm
Bio Max M-Film, Kodak, Stuttgart
Hybond-N Nylon-Membran, Amersham, Freiburg
TNF-α-cDNA-Fragment, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Marx, Innere Medizin II, Universitätsklinikum Ulm
Rediprime Kit II, Amersham, Freiburg
RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden

Puffer und Lösungen

6 x Ladepuffer:
0,25 % Bromphenolblau
0,25 % Xylenecyanol FF
30 % Glycerol

10 x Laufpuffer (1 l):
41,2 g MOPS (4-Morpholinepropanesulfonic acid)
3,28 g Natriumacetat
auf pH 7,0 eingestellt
10 ml 0,5 M EDTA, pH 8
autoklaviert

20x Salt Sodiumcitrate (SSC) (1 l; pH: 7,0):
175,3 g Natriumchlorid
88,2 g Natriumcitrat

Deionisiertes Formamid:
5 g Resin in 100 ml Formamid
1 Stunde bei 4°C gerührt und anschließend filtriert

Hybridisierungspuffer (100 ml):
50 % Formamid (deionisiert)
5x Denhardts
5 x SSC
0,5 % SDS
steril filtriert
10 mg Salmon Sperm DNA (10 Minuten gekocht)

Mastermix (23,6 µl pro Probe):
5 µl DEPC-Wasser
15 µl Northern Probenpuffer
3,5 µl 6 x Ladepuffer
0,1 µl Etidium Bromid

Northern Probenpuffer:
200 µl deioniesiertes Formamid
70 µl 37 % Formaldehyd
40 µl 5 x Laufpuffer

Waschlösung 1:
2x SSC in 0,1 % SDS

Waschlösung 2:
0,1x SSC in 0,1 % SDS

2.1.7 Western Blot

BCA Protein Assay Reagent A and B, Pierce, Rockford, USA
Blocking solution, Candor Biosciences, Münster
ECL, Amersham, Freiburg
HoeferTMMiniVE Blotter, Amersham, Freiburg
Hyperfilm, Amersham, Freiburg
Low Cross™- Puffer, Candor Biosciences, Münster
Nitrocellulose-Membran, Serva, Heidelberg

Puffer und Lösungen

12 % Acrylamidgel (14 ml):
3,5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH: 8,8
140 µl 10 % SDS
5,6 ml 30 % Acrylamid
70 µl 40 % APS
5,8 µl TEMED

2x RIPA-Puffer (pH 7,2):
50 mM Tris-HCL, pH: 7,2
150 mM NaCl
0,1 % SDS
0,5 % Natriumdeoxycholat
1 % Triton X-100

Probenpuffer:
100 mM Tris-HCl
3 % SDS
10 % Glycerin
1 Spatelspitze Bromphenolblau
2 % β-Mercaptoethanol

RIPA-Lysispuffer:
10 mM Natriumpyrophosphat
25 mM Natriumglycerophosphat
2 mM Natriumorthovanadat
1,9 µg/ml Aprotinin
1 µM Leupeptin
1x RIPA-Puffer

TBS (pH: 7,6):
20 mM Tris-HCl
137 mM NaCl

TBST (pH: 7,6):
20 mM Tris-HCl
137 mM NaCl
0,1 % Tween 20

Transferpuffer (pH: 8,3):
25 mM Tris
192 mM Glycin
20 % Methanol

2.1.8 Geräte

ELISA-Reader Spectra Max 250, MWG-Biotech, Ebersberg
FACScalibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY, USA
Image MasterVDS, Fuji Film, Düsseldorf
Megafuge 1.0R, Thermo, Waltham, MA, USA
Sorvall RC-5B Zentrifuge, Du Pont Instruments
Milenia Kinetic Analyser (*96-well-plate-reader*), Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA
Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg

2.1.9 Software

Analyse-it (für Excel); Analyse-It, Ltd., Leeds, England
CellQuest Software, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY, USA
Microsoft Office 2003; Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Pro-Soft-max 3.1, MWG-Biotech, Molecular devices, Ebersberg
MultiAnalyst 1.1, Biorad, Hercules, CA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung humaner mononukleärer Zellen

In der Abteilung Blutproduktion des Universitätsklinikums Ulm werden Blutspenden durch Zentrifugation in drei Fraktionen aufgeteilt: ein Erythrozyten-Konzentrat, ein Frischplasmapräparat und die Zwischenschicht, *buffy coat* genannt. Der *buffy coat*, ein Konzentrat von etwa 30 - 50 ml, setzt sich zusammen aus Leukozyten, Thrombozyten und einem Rest Erythrozyten und Plasma.
In dieser Arbeit wurden humane mononukleäre Zellen aus diesen *buffy coats* mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Für die Ficoll-Hypaque Technik wurden pro *buffy coat* vier Leucosept-Röhrchen mit Filter verwendet. Zuerst wurde jedes Leucosept-Röhrchen mit 15 ml Lymphozyten-Trennmedium (Ficoll) gefüllt und dieses für 30 Sekunden bei 1.000 g abzentrifugiert. Anschließend wurde der *buffy coat* 1:1 mit PBS verdünnt, auf die Leucosept-Röhrchen verteilt und für 15 Minuten bei 1.500 g zentrifugiert. Durch die Dichte-Eigenschaften des Ficoll trennte sich der *buffy coat* in seine Bestandteile auf (Abb. 5). Während die leichten Thrombozyten in der Plasmaphase verblieben, reicherten sich die Lymphozyten und Monozyten in der weißlich erscheinenden Phase zwischen Plasma und Ficoll an. Die Granulozyten und Erythrozyten diffundierten durch die Ficollphase und bildeten ein Pellet. Die Interphase aus Lymphozyten und Monozyten wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und zweimal mit PBS gewaschen. In einem neuen Zentrifugenröhrchen wurde pro *buffy coat* 15 ml Percoll mit 2,5 ml 10x HBSS gemischt und auf einen pH von 7,2 eingestellt. Anschließend wurde zu 7 ml Percoll/HBSS-Lösung 3 ml Zelllösung pipettiert und für 30 Minuten bei 2.000 rpm in der Sorvall-Zentrifuge mit Festwinkelrotor ohne Bremse zentrifugiert. Die Monozyten sammelten sich als zähflüssige Schicht im oberen Bereich der Percoll/HBSS-Lösung. Diese Schicht wurde vorsichtig abpipettiert. Da sich direkt darunter die Lymphozyten-Schicht befand, wurden diese zum Teil ebenfalls mit abpipettiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Zellen bei 37°C und 5 % CO_2 in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert.

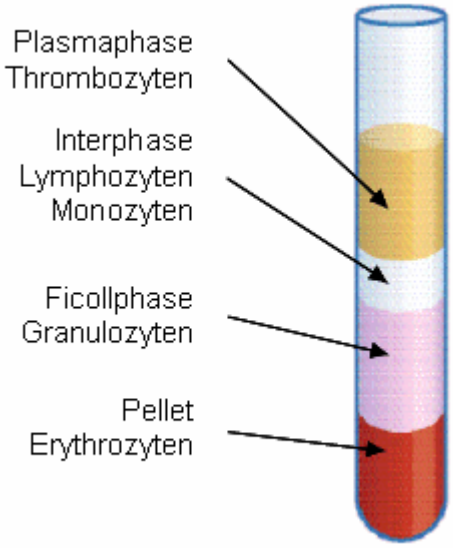


Abbildung 5: Auftrennung der *buffy coat*-Bestandteile nach Zentrifugation mit Ficoll. Während die leichten Thrombozyten in der Plasmaphase verblieben, reicherten sich die Lymphozyten und Monozyten in der weißlich erscheinenden Phase zwischen Plasma und Ficoll an. Die Granulozyten und Erythrozyten diffundierten durch die Ficollphase und bildeten ein Pellet.

2.2.2 Durchflußzytometrie

In der isolierten Zelllösung wurden, mithilfe von spezifischen Antikörpern, CD14-positive Monozyten und CD3-positive T-Lymphozyten nachgewiesen.
Frisch isolierte Zellen ($1x10^6$) wurden mit 1 ml PBS gewaschen und in 50 µl PBS resuspendiert. Die Zellen wurden mit 10 µl anit-CD14-PE oder anti-CD3-FITC für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 50 µl 1 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Nach einem weiteren Waschschritt wurden die Zellen in 300 µl PBS resuspendiert, in ein FACS-Röhrchen pipettiert und im Durchflußzytometer ausgewertet. Als Software diente CellQuest.

2.2.3 Zellkultur

Humane mononukleäre Zellen

Frisch isolierte humane mononukleäre Zellen wurden in RPMI-Medium ohne Phenolrot mit 0,5 % humanem, hitzeinaktiviertem Serum und 1 % Penicilin/Streptomycin (Pen/Strep) kultiviert. Da die Zellen maximal 2 Tage kultiviert wurden, war ein Mediumwechsel oder eine Subkultivierung nicht notwendig.
Monozyten befinden sich im Blut normalerweise in einem passiven, nicht sekretorischen Zustand. Durch die Blutentnahme und den anschließenden Isolierungsprozess wurden die Zellen bereits leicht aktiviert. Um die Zellen in ihrem inaktiven Zustand zu erhalten, wurden sie in einem Serum-armen Medium kultiviert. Außerdem wurde auf die Zugabe von Phenolrot verzichtet, da dieses östrogenähnliche Wirkung zeigt.

Monozytäre Zelllinien

U937
U937 ist eine monozytäre Zelllinie, gewonnen aus einem Gewebemakrophagen-Lymphom eines 37-jährigen Patienten. Die Zellen wurden in RPMI-Medium ohne Phenolrot mit 10 % standardisiertem fötalem Kälberserum (hitzeinaktiviert und kohlebehandelt) und 1 % Pen/Strep kultiviert.

THP-1
THP-1 ist eine monozytäre Zelllinie, die zurück geht auf einen einjährigen Jungen mit akuter myeloischer Leukämie. Die Zellen wurden in RPMI-Medium ohne Phenolrot mit 10 % standardisiertem fötalem Kälberserum (hitzeinaktiviert und kohlebehandelt), 1 % Pen/Strep und 14 % β-Mercapto-Ethanol kultiviert.

U937 und THP-1 Zellen wurden in einer Dichte von $5x10^5$ Zellen pro ml Medium in 75 cm^2 Zellkulturflaschen kultiviert und nach 2 bis 3 Tagen aus einer 10^6 Zellen pro ml Medium Lösung 1:2 bis 1:5 gesplittet. Dazu wurden die Zellen für fünf Minuten bei 353 g zentrifugiert.

Hitzeinaktivierung und Kohlebehandlung

Zur Hitzeinaktivierung wurde das Serum aufgetaut und bei 56°C für 30 Minuten inkubiert. Diese Behandlung inaktiviert schädliche Bestandteile im Serum.
Die Behandlung mit Aktivkohle ermöglicht die Entfernung von Hormonen aus dem Serum. Dazu wurden 20 g Aktivkohle und 2 g Dextran in 60 ml Puffer (10 mM Hepes, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) über Nacht bei 4°C unter Rühren gelöst. Am nächsten Tag wurde das Aktivkohlegemisch und hitzeinaktiviertes Serum im Verhältnis 1:5 gemischt und auf Eis für fünf Minuten inkubiert. Um die Aktivkohle zu entfernen, wurde das Gemisch mehrmals bei 14.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Die Aktivkohlereste wurden über einen Faltenpapierfilter vorfiltriert und über einen Vakuumfilter (Porengröße 0,22 µm) fast vollständig entfernt. Vor Gebrauch wurde das Serum mit einem 0,2 µm Einmalfilter sterilfiltriert.

2.2.4 ELISA

Behandlung der Zellen

Mononukleäre Zellen männlicher bzw. weiblicher Spender wurden isoliert und in einer Zellzahl von 10^6 Zellen pro ml Medium in 24-*well*-Platten ausgesät. Nach einer Ruhephase von einer Stunde wurden die Zellen folgendermaßen behandelt:

1. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit paralleler bzw. ohne LPS-Stimulierung und mit 100 nM Dexamethason, 100 pM, 1, 10, 100 nM und 1 µM Testosteron, 17β-Östradiol, Calcitriol, all-*trans*-Retinolsäure bzw. 9-*cis*-Retinolsäure behandelt.
2. Die Zellen wurden für 16 Stunden mit 100 nM Dexamethason, 100 pM, 1, 10, 100 nM und 1 µM Testosteron, 17β-Östradiol, Calcitriol, all-*trans*-Retinolsäure bzw. 9-*cis*-Retinolsäure vorbehandelt und anschließend zusätzlich für acht Stunden mit LPS stimuliert.

THP-1 und U937 wurden in einer Konzentration von 10^6 Zellen pro ml Medium in 24-*well*-Platten ausgesät. Es folgte eine Behandlung für 24 Stunden mit 100 nM Dexamethason, 1, 10, 100 und 1.000 nM Testosteron, 17β-Östradiol, Calcitriol bzw. all-

trans-Retinolsäure. Parallel dazu wurden THP-1 mit 1 µg/ml LPS und U937 mit 10 µg/ml LPS kombiniert mit 10 ng/ml *phorbol-myristate-acetate* (PMA) stimuliert.

ELISA

Die Konzentration der Zytokine TNF-α und IL-6 wurde im Zellüberstand anhand eines *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) bestimmt. Dazu wurden zwei Duoset ELISA Kits von R & D Systems verwendet. Die Konzentrationen und Lösungsmittel der Antikörper und Standards sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die 96-*well*-ELISA-Platten wurden mit 100 µl/*well capture antibody* (TNF-α: 4 µg/ml; IL-6: 2 µg/ml) über Nacht inkubiert. Es folgten drei Waschschritte mit 290 µl Waschpuffer pro *well*. Dieses dreimalige Waschen wurde zwischen jedem der nachfolgenden Inkubationsschritte, außer nach der Substratlösung, durchgeführt. Die Platten wurden mit 300 µl/*well* Blockpuffer für mindestens eine Stunde inkubiert. Dies diente der Absättigung freier bzw. nicht antikörpergebundener Stellen. Anschließend wurde in Doppelbestimmung 100 µl/*well* des jeweiligen Standards bzw. Zellüberstände pipettiert und für zwei Stunden inkubiert. Der Standard für TNF-α lag zwischen 1 ng/ml und 10 pg/ml, für IL-6 zwischen 600 pg/ml und 9 pg/ml. Die Zellüberstände wurden von 1:2 bis 1:100 mit Medium verdünnt, damit die Zytokin-Konzentration im Standardbereich lag. Anschließend wurde mit 100 µl/*well detection antibody* (TNF-α: 75 ng/ml; IL-6: 200 ng/ml) für zwei Stunden inkubiert. Es folgten zwei Inkubationsschritte mit je 100 µl/*well* für 20 Minuten im Dunkeln: zuerst eine Streptavidin-gebundene Phosphatase und dann die Substratlösung. Aufgrund einer enzymatischen Reaktion entwickelte sich eine Gelbfärbung. Die Reaktion wurde mit 50 µl/*well* 2 normaler Schwefelsäure gestoppt, wodurch die Farbe von gelb nach blau wechselte. Die optische Dichte wurde bei 450 nM im *96-well-plate-reader* bestimmt und mit der Pro-Soft-max 3.1 Software ausgewertet.

Tabelle 2: Lösungsmittel und Konzentration der Antikörper und Standards.

	TNF-α		**IL-6**	
	Lösungsmittel	Konzentration	Lösungsmittel	Konzentration
Capture antibody	PBS	4 µg/ml	PBS	2 µg/ml
Detection antibody	Reagent diluent	75 ng/ml	Reagent diluent	200 ng/ml
Standard	Reagent diluent	1 ng/ml	H_2O	600 pg/ml

2.2.5 Zellvitalitätstest

Behandlung der Zellen

Mononukleäre Zellen männlicher und weiblicher Spender wurden isoliert und in einer Zellzahl von 250.000 Zellen pro 100 µl Medium in 96-*well*-Platten ausgesät. Nach einer Ruhephase von eine Stunde wurden die Zellen für 24 Stunden mit 100 nM Dexamethason, 100 pM, 1, 10, 100 nM und 1 µM Calcitriol, all-*trans*-Retinolsäure bzw. 9-*cis*-Retinolsäure behandelt und mit LPS stimuliert.

MTS-Test

Der MTS-Test ist eine colorimetrische Methode zur Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen. Die MTS-Tetrazolium-Komponente wird durch eine Dehydrogenase, welche in vitalen Zellen gebildet wird, in ein farbiges Formazan-Produkt umgesetzt.
20 µl MTS-Lösung wurde pro *well* in 100 µl Zellkulturlösung pipettiert. Nach zwei Stunden Inkubation wurde die optische Dichte bei 490 nM im *96-well-plate-reader* bestimmt und mit der Excel Software ausgewertet.

2.2.6 Northern Blot

Behandlung der Zellen

Mononukleäre Zellen männlicher Spender wurden isoliert, in einer Zellzahl von $10x10^6$ Zellen pro 3 ml Medium in 6-*well*-Platten ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen für sechs Stunden mit 100 ng/ml LPS stimuliert und mit 100 nM Dexamethason bzw. 1, 10, 100 und 1.000 nM all-*trans*-Retinolsäure behandelt. Für Untersuchungen zur TNF-α-mRNA-Stabilität wurden die Zellen zuerst für zwei Stunden mit 100 ng/ml LPS stimuliert, um die TNF-α-Transkription zu aktivieren. Es folgte eine Inkubation mit 2,5 µg/ml Aktinomycin D allein oder in Kombination mit 1 µM all-*trans*-Retinolsäure für 10, 30, 60 und 120 Minuten.

RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy kit von Qiagen isoliert. Dazu wurden sowohl Zellen in Suspension als auch adherente Zellen verwendet. Die adherenten Zellen wurden vom 6-*well*-Plattenboden abgeschabt und zusammen mit den Zellen in Suspension mit 9 ml PBS bei 4°C gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 600 µl RLT-Puffer (inkl. 1 % β-Mercaptoethanol) resuspendiert. Das Guanidin-isothiocyanat (GITC), enthalten im RLT-Puffer, wirkt stark denaturierend und inaktiviert RNasen, es lysiert und homogenisiert die Zellen. Das Zelllysat wurde aufgeschlossen, indem es auf eine *QIAshredder spin column* pipettiert und für zwei Minuten bei 20.817 g zentrifugiert wurde. Zu dem homogenisierten Lysat wurde 600 µl 70 % Ethanol gegeben. Während der Zentrifugation für 15 Sekunden bei 10.621 g in der *mini spin colum* bindet die RNA an die Membran der Säule und wird vom restlichen Zelllysat getrennt. Verunreinigungen wurden mit den folgenden vier Waschschritten beseitigt: Auf die Membran wurden erst 700 µl, dann 350 µl RW1-Puffer pipettiert, für 15 Sekunden bei 10.621 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurde zweimal mit 500 µl RPE-Puffer auf die Membran pipettiert, bei 10.621 g erst 15 Sekunden, dann zwei Minuten zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Membran wurde für eine Minute bei 20.817 g getrocknet und die RNA zum Schluss mit 50 µl RNase freiem Wasser eluiert. Die RNA-Konzentration wurde bei 260 nm gemessen.

Elektrophoretische Auftrennung

Die RNA wurde mittels Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Dazu wurde zunächst ein 1,2 %-iges Agarose-Gel hergestellt: 1,2 g Agarose und 72 ml steriles Wasser wurden aufgekocht und 10 ml 10x Laufpuffer und 18 ml 37 %-iges Formaledehyd zugegeben. Die Lösung wurde in eine Elektrophorese-Gelkammer gegeben und ca. eine Stunde inkubiert.
Das entsprechende Volumen an Wasser für 5 µg RNA wurde in der *Speed Vac* Zentrifuge eingetrocknet und in 23,6 µl Mastermix resuspendiert. Nach Inkubation für 10 Minuten bei 55°C wurden die Proben auf das Agarose-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in einer mit 1x Laufpuffer gefüllten Kammer für ca. vier Stunden bei 75 V durchgeführt. Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert (Image Master VDS) und die 28S und 18S rRNA-Banden markiert. Die 28S

rRNA Banden wurden mit der Software MultiAnalyst 1.1 densitometrisch ausgewertet und als Abgleich der RNA-Menge verwendet.

Northern Blot

Während dem Blotten wurde die RNA auf eine Nylonmembran (Hybond-N) übertragen. Aufbau der Blot-Apparatur von unten nach oben:

- Drei Lagen Filterpapier (die Enden schwimmen in 20x SSC)
- Gel (Oberfläche nach unten)
- Nylonmembran
- Drei Lagen Filterpapier (Gelgröße)
- Zellstoff (10 cm)
- Gewicht (500 g)

Nach Inkubation über Nacht wurde die RNA durch Bestrahlung mit UV-Licht für 30 Sekunden kovalent an die Membran gebunden. Die 28S und 18S rRNA Banden wurden zum Größenvergleich markiert.

Hybridisierung und Markierung mit radioaktiver cDNA

Die Membran wurde über Nacht mit 10 ml Hybridisierungspuffer in einer Hybridisierungsröhre bei 42°C prähybridisiert. Die Detektion der TNF-α mRNA erfolgte mittels einer radioaktiv markierten Sonde. Zur Herstellung dieser Sonde wurde das *random priming* Verfahren angewandt, wobei ein TNF-α-cDNA-Fragment mit 353 bp als Template diente und die Markierung mit ^{32}P-α-dCTP erfolgte.
3 µg cDNA wurde in 45 µl Tris-EDTA gelöst, für 10 Minuten bei 95°C denaturiert und für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Die denaturierte cDNA und 50 µCi ^{32}P-α-dCTP wurden in das Reaktiongefäß Rediprime II gegeben und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Während diesem Schritt wurde die radioaktiv-markierte Hybrid-cDNA (Sonde) synthetisiert (*Annealing*). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl 0,2 M EDTA gestoppt und für fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Die Sonde wurde in die Hybridisierungsröhre zu dem Hybridisierungspuffer und der Membran gegeben und über Nacht bei 42°C unter ständiger Rotation inkubiert. Dabei hybridisiert die Sonde mit der entsprechenden Stelle auf der Membran. Anschließend wurde die Membran zweimal für 15 Minuten bei 42°C mit Waschlösung I und zweimal für fünf Minuten bei

60°C mit Waschlösung II auf dem Schüttler gewaschen. Dann wurde die Membran für mehrere Tage mit einem lichtempfindlichen Film (Bio Max M-Film) in einer Schutzkassette bei -20°C inkubiert. Der Film wurde entwickelt, eingescannt und mit der Software MultiAnalyst 1.1 densitometrisch ausgewertet. Als Abgleich diente die 28S rRNA-Bande.

2.2.7 Western Blot

Behandlung der Zellen

Mononukleäre Zellen männlicher Spender wurden isoliert, in einer Zellzahl von $10x10^6$ Zellen pro 3 ml Medium in 6-*well*-Platten ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen für 15 bzw. 30 Minuten mit 100 ng/ml LPS stimuliert und mit 100 nM Dexamethason, 1 µM all-*trans*- bzw. 9-*cis*-Retinolsäure behandelt. Außerdem wurde eine Retinolsäure-Vorbehandlung für 16 Stunden mit anschließender LPS-Stimulierung für 30 Minuten durchgeführt.

Zell-Lyse und Proteinextraktion

Die adherenten Zellen wurden vom 6-*well*-Plattenboden abgeschabt und zusammen mit den Zellen in Suspension mit 9 ml PBS bei 4°C gewaschen. Nach einer Zentrifugation für fünf Minuten bei 353 g und 10°C wurde das Zellpellet in 200 µl RIPA-Lysispuffer aufgenommen und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die lysierten Zellen wurden mithilfe von Injektions-Kanülen homogenisiert. Zuerst mit einer Kanüle mit 9 mm Durchmesser, anschließend mit einer Kanüle mit 0,45 mm Durchmesser. Durch die Zentrifugation für 15 Minuten bei 14.000 g und 4°C wurden Zelltrümmer und Zellorganellen pelletiert. Der Überstand, welcher die cytoplasmatischen Proteine enthielt, wurde in ein neues Gefäß überführt.

Proteinkonzentrationsbestimmung und Proteinaufreinigung

Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde der Bicinchoninsäure-Test (BCA-Test) verwendet. Nach der Konzentrationsbestimmung wurden die Proteine gefällt, aufgereinigt und in entsprechendem Volumen Probenpuffer aufgenommen. Dazu wurden die Proben zuerst mit 15 % Trichloressigsäure (TCA) für eine Stunde bei -20°C und dann über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Proben

für 15 Minuten bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert und anschließend einmal mit 1 ml und sechsmal mit 500 µl 80 % Aceton gewaschen. Dazu wurde jedes Mal für fünf Minuten bei 8.000 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Proben unter dem Abzug getrocknet und in Probenpuffer für ca. 20 Minuten bei 60°C erwärmt, um die Proteine zu lösen. Die Proben wurden schließlich bei -80°C aufbewahrt.

Gelelektrophorese

Die denaturierten Proteine wurden mittels diskontinuierlicher Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Dazu wurde das entsprechende Probenvolumen für 30 µg Protein in ein neues Gefäß überführt, für fünf Minuten bei 95°C aufgekocht und auf ein 12 % Acrylamidgel aufgetragen. Der Gelllauf wurde für eine Stunde bei 25 mA und anschließend für zwei Stunden bei 30 mA durchgeführt.

Elektro-Blot

Die Proteine wurden mittels Elektro-Blot für 2,5 Stunden bei 48 V (für 2 Gele) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Nach dem Gelllauf wurde das Gel und die Membran für 15 Minuten in Transferpuffer äquilibriert und der Blot nach folgendem Schema aufgebaut (Kathode zu Anode):

- Schwamm
- 6 Lagen Filterpapier
- Gel
- Membran
- 6 Lagen Filterpapier
- Schwamm

Ponceaurot-Färbung und Blocken

Zur Überprüfung der Blot-Effizienz und zur Fixierung der Proteine auf der Membran wurde die Membran für einige Minuten in Ponceaurot inkubiert. Der entsprechende Bereich auf der Membran wurde ausgeschnitten und die Membran mit Wasser komplett entfärbt. Es folgte die Inkubation mit 5 ml *blocking solution* für eine Stunde auf dem Schüttler.

Proteinnachweis durch spezifische Antikörper

Die Membran wurde zuerst mit einem Primärantikörper über Nacht bei 4°C und anschließend mit einem Peroxidase-markierten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Die Verdünnungen der verwendeten Antikörper sind in Tabelle 3 aufgeführt. Für die Verdünnung wurde der *Low Cross*™- Puffer verwendet. Zwischen und nach der Inkubation mit den Antikörpern wurde die Membran einmal für 10 Minuten mit TBST und zweimal für 10 Minuten mit TBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran für eine Minute mit einer *enhanced chemiluminescence*-Lösung (ECL) inkubiert und die Chemolumineszenz über einen Film detektiert. Der entwickelte Film wurde eingescannt und die Banden mit der Software MultiAnalyst 1.1 densitometrisch ausgewertet. Als Abgleich diente die nicht phosphorylierte Form des Proteins.

Tabelle 3: Verdünnung der verwendeten Antikörper

unter-suchtes Protein	Primäranti-körper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Phospho-ERK1/2	Anti-Phospho-ERK1/2, Cell Signalling, Danvers, MA, USA	1:2.000	Ziege-anti-Kaninchen-HRP, Pierce, Rockford, USA	1:5.000
ERK2	Anti-ERK2, Santa Cruz, CA, USA	1:2.000	Ziege-anti-Kaninchen-HRP, Pierce, Rockford, USA	1:5.000
Phospho-p38	Anti-Phospho-p38, Cell Signalling, Danvers, MA, USA	1:1.000	Ziege-anti-Kaninchen-HRP, Pierce, Rockford, USA	1:3.000
p38	Anti-p38, Cell Signalling, Danvers, MA, USA	1:1.000	Ziege-anti-Kaninchen-HRP, Pierce, Rockford, USA	1:3.000

2.2.8 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Versuche wurden als Mittelwert und Standardfehler angegeben. Bei den analysierten Daten handelte es sich um normalverteilte Werte, die mit der 1-way-ANOVA-Methode ausgewertet wurden. Dazu wurde das Statistikprogramm Analyse-it verwendet. Ein Signifikanzniveau $P < 0,05$ und $P < 0,01$ wies auf ein statistisch „signifikantes“ Ergebnis hin.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der verwendeten Zellmodellsysteme

3.1.1 Charakterisierung humaner mononukleärer Zellen

Als Modellsystem dieser Arbeit dienten mononukleäre Zellen aus peripervenösem Blut gesunder männlicher und weiblicher Spender. Zu den mononukleären Zellen gehören Monozyten und Lymphozyten, welche den polymorphkernigen Granulozyten gegenübergestellt werden.

Zunächst wurde die Morphologie der Zellen mikroskopisch untersucht. Direkt nach der Isolierung lagen die Zellen vereinzelt und in Suspension vor. Sie waren kugelig und schimmerten weiß (Abb. 6). Eine Stunde nach Isolierung befand sich die Mehrzahl der Zellen (ca. 90 Prozent) in Suspension. Ein kleiner Anteil der Monozyten hatte sich auf dem Gefäßboden angeheftet und ausgebreitet. Diese Zellen erscheinen in Abbildung 6 in einem dunklen Farbton. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um Monozyten in einem Makrophagen-ähnlichen Zustand. Die Mehrzahl der Zellen in Suspension waren Monozyten. Einen kleineren Anteil bildeten die Lymphozyten, welche sich in ihrer Größe von Monozyten unterscheiden (siehe z.B. [22]). Im Laufe der folgenden Stunden der Kultivierung bildeten die Zellen in Suspension eine netzartige Formation, die mit den adherenten Zellen in Verbindung stand. Das Verhältnis der Anzahl Zellen in Suspension und der Anzahl adherenter Zellen änderte sich während der Kultivierung über 48 Stunden nicht.

Als weiteren Schritt zur Charakterisierung der isolierten Zellen wurden FACs-Analysen mit einem Monozyten-spezifischen und einem Lymphozyten-spezifischen Antikörper durchgeführt. Die FACs-Analyse ergab einen Monozyten-Anteil von ca. 55 Prozent (Abb. 7) und einen Lymphozyten-Anteil von ca. 35 Prozent. Der normale Anteil von Monozyten innerhalb der Blut-Lymphozyten beträgt vier bis acht Prozent (siehe z.B. [29]). Somit erzielte die angewandte Methode zur Isolierung eine mit Monozyten angereicherte Kultur mononukleärer Zellen.

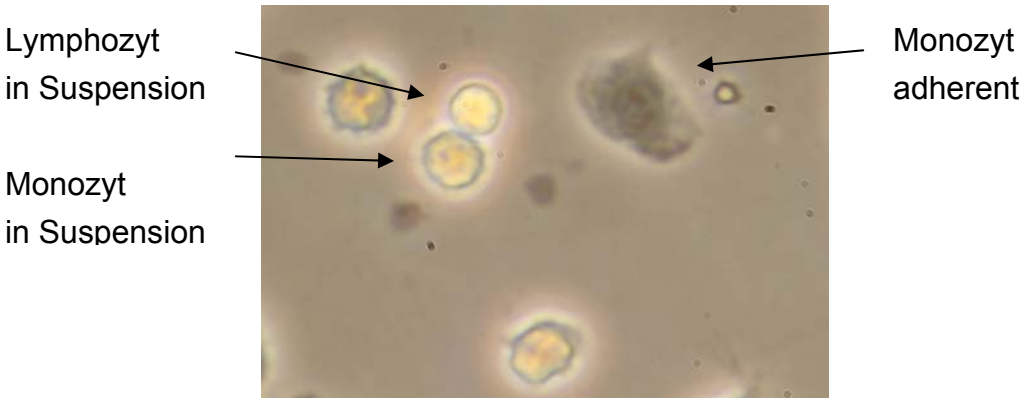


Abbildung 6: Mikroskopische Aufnahme humaner mononukleärer Zellen eine Stunde nach Isolierung. Monozyten und Lymphozyten in Suspension waren rund und schimmerten weiß. Lymphozyten waren etwa ein Drittel kleiner als Monozyten und ließen sich dadurch von Monozyten unterscheiden. Ein kleiner Anteil der Monozyten adherierte am Gefäßboden und breitete sich aus. Neben Monozyten und Lymphozyten waren kleinere Partikel zu sehen, bei welchen es sich wahrscheinlich um Zellreste handelte. 320-fache Vergrößerung.

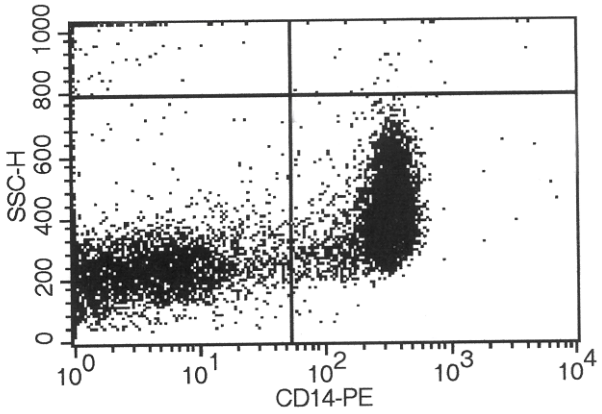


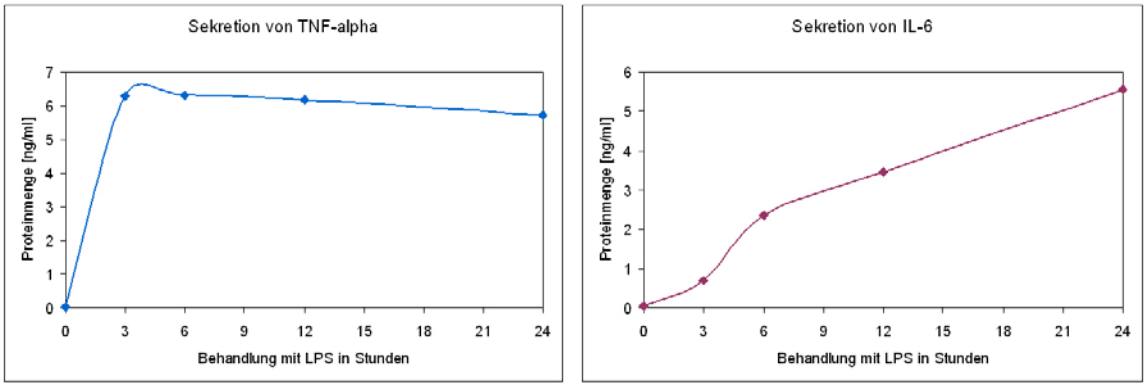
Abbildung 7: Anreicherung von CD14-positiven Monozyten. Frisch isolierte humane mononukleäre Zellen wurden mit dem Monozyten-spezifischen Antikörper CD14-PE markiert und im Durchflußzytometer ausgewertet. Der rechte, untere Quadrant zeigt die CD14-positive Monozytenpopulation.

Stimulierung der Zytokinsekretion

Um die Zytokinsekretion zu stimulieren, wurden humane mononukleäre Zellen mit LPS behandelt. Zunächst sollte die Sekretion von TNF-α und IL-6 im zeitlichen Verlauf untersucht werden.

Mononukleäre Zellen männlicher Spender wurden über Nacht kultiviert und am nächsten Morgen mit 100 ng/ml LPS für 3, 6, 12 und 24 Stunden behandelt. Die Zytokin-Konzentration wurde im Zellüberstand mithilfe von ELISAs bestimmt.

Zellen, die als Negativkontrolle nicht behandelt wurden, zeigten eine geringe Zytokinsekretion (50 pg bis 100 pg pro 10^6 Zellen). Die Behandlung der humanen mononukleären Zellen mit LPS führte zu einer starken Stimulation der Zytokinsekretion. Dabei erreichte die Sekretion von TNF-α nach spätestens drei Stunden Behandlung ihr Maximum und ging anschließend in eine Plateauphase über (Abb. 8 A). Die Sekretion von IL-6 hingegen stieg stetig mit der Zeit an und hatte nach 24 Stunden noch keine Plateauphase erreicht (Abb. 8 B). Nach LPS-Stimulierung für 24 Stunden lag die gemessene TNF-α-Konzentration im Zellüberstand zwischen 1 ng und 10 ng pro 10^6 Zellen und die IL-6-Konzentration zwischen 5 ng und 50 ng pro 10^6 Zellen. Es konnte kein geschlechtsspezifischer Unterschied in der TNF-α- bzw. IL-6-Sekretion festgestellt werden, sowohl mit als auch ohne LPS-Stimulierung.



A **B**

Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf der TNF-α- und IL-6-Sekretion in LPS stimulierten, mononukleären Zellen männlicher Spender. Die Zellen wurden über Nacht kultiviert und am nächsten Morgen mit 100 ng/ml LPS für 3, 6, 12 und 24 Stunden behandelt. Im Zellüberstand wurde die Zytokinsekretion mithilfe von ELISAs bestimmt. Dargestellt ist die Proteinmenge von TNF-α (**A**) und IL-6 (**B**) eines repräsentativen Versuchs.

3.1.2 Charakterisierung humaner monozytärer Zelllinien

Neben humanen mononukleären Zellen wurden die humanen monozytären Zelllinien THP-1 und U937 verwendet.

THP-1

THP-1 ist eine humane monozytäre Zelllinie, die zurück geht auf einen einjährigen Jungen mit akuter myeloischer Leukämie. Die Zellen sind rund und in Suspension. Vereinzelt bilden sich Zellverbände (Abb. 9 A).

U937

U937 ist eine humane monozytäre Zelllinie, gewonnen aus einem Gewebe-makrophagen-Lymphom eines 37-jährigen Patienten. Die Zellen sind ebenfalls rund und in Suspension (Abb. 9 C).

Stimulierung der Zytokinsekretion

Die Stimulierung der monozytären Zelllinien THP-1 und U937 mit 100 ng/ml LPS für 24 Stunden zeigte nahezu keine Steigerung der TNF-α- und IL-6-Sekretion. Daraufhin wurde die LPS-Konzentration erhöht.
Die Stimulierung der THP-1 Zelllinie für 24 Stunden mit 1 µg/ml LPS bewirkte eine starke Sekretion beider Zytokine. Die TNF-α-Sekretion lag bei ca. 15 ng pro 10^6 Zellen, die IL-6-Sekretion bei ca. 3 ng pro 10^6 Zellen (Abb. 10). Die THP-1 Zellen waren auch nach der Stimulierung noch zum großen Teil vereinzelt und zeigten teilweise kleine stabförmige Auswüchse (Abb. 9 B).
Die Zelllinie U937 wurde auch durch höhere LPS-Konzentrationen (bis 100 µg/ml) nicht aktiviert. Erst eine Kombination aus 10 µg/ml LPS und 10 ng/ml PMA bewirkte eine erhöhte Sekretion beider Zytokine. Die TNF-α-Sekretion lag bei ca. 6 ng pro 10^6 Zellen, die IL-6-Sekretion bei ca. 2 ng pro 10^6 Zellen (Abb. 10). Die stimulierten Zellen bildeten Zellverbände mit stabförmigen Auswüchsen (Abb. 9 D).

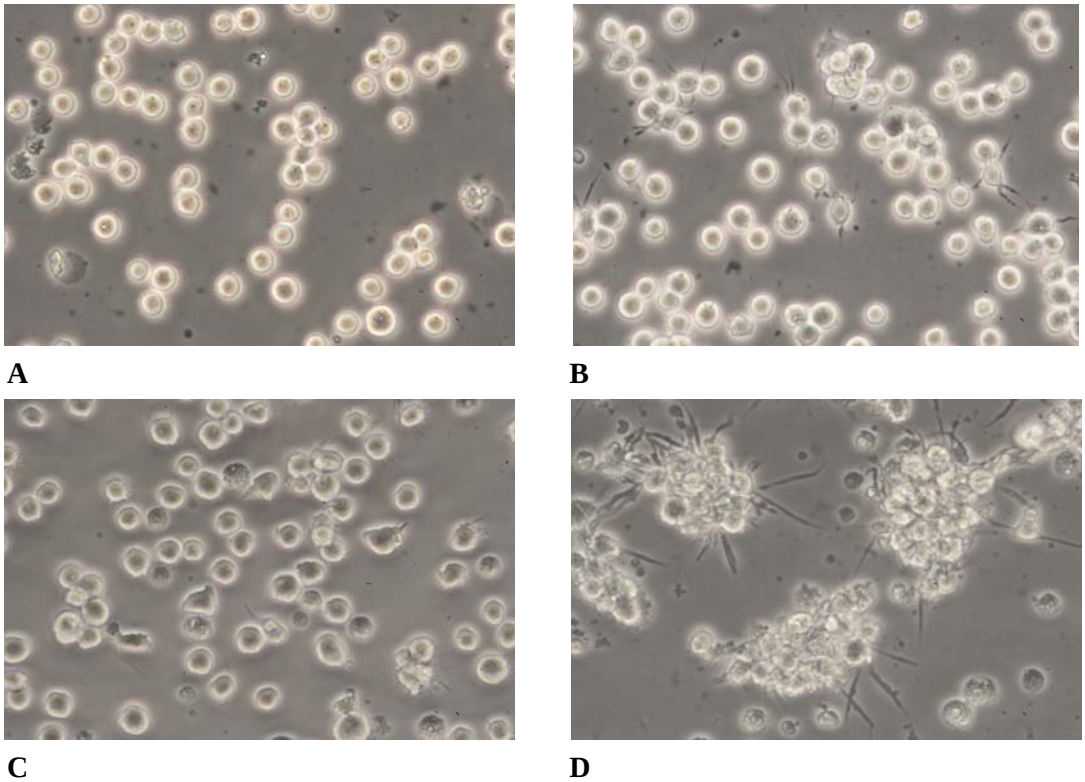


Abbildung 9: Mikroskopische Aufnahme humaner monozytärer Zelllinien. (**A**) THP-1 Zellen ohne Stimulierung. (**B**) THP-1 Zellen nach Stimulierung mit 1 µg/ml LPS für 24 Stunden. (**C**) U937 Zellen ohne Stimulierung. (**D**) U937 Zellen nach Stimulierung mit 10 µg/ml LPS und 10 ng/ml PMA.

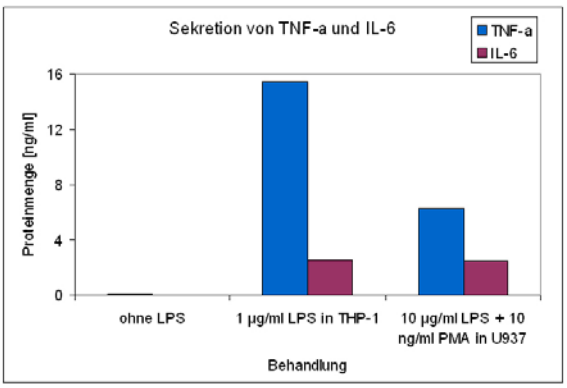


Abbildung 10: Sekretion von TNF-α- und IL-6 in den stimulierten, humanen monozytären Zelllinien THP-1 und U937. THP-1 Zellen wurden mit 1 µg/ml LPS stimuliert. U937 Zellen wurden mit 10 µg/ml LPS und 10 ng/ml PMA stimuliert. Dargestellt ist die Proteinmenge von TNF-α (blau) und IL-6 (rot) eines repräsentativen Versuches.

3.2 Untersuchungen zur Zytokinsekretion

In den folgenden Versuchen wurde anhand humaner mononukleärer Zellen der Einfluss von Steroidhormonen, Calcitriol und Retinolsäure auf die Sekretion von TNF-α und IL-6 untersucht. Dazu wurden mononukleäre Zellen männlicher und weiblicher Spender isoliert und kultiviert. Nach einer einstündigen Ruhephase wurden zwei verschiedene Versuchsansätze durchgeführt (Abb. 11):

1. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit paralleler bzw. ohne LPS-Stimulierung und mit 100 nM Dexamethason, 100 pM, 1, 10, 100 nM und 1 µM Testosteron, 17β-Östradiol, Calcitriol, all-*trans*-Retinolsäure bzw. 9-*cis*-Retinolsäure behandelt.
2. Die Zellen wurden für 16 Stunden mit 100 nM Dexamethason, 100 pM, 1, 10, 100 nM und 1 µM Testosteron, 17β-Östradiol, Calcitriol, all-*trans*-Retinolsäure bzw. 9-*cis*-Retinolsäure vorbehandelt und anschließend zusätzlich für acht Stunden mit LPS stimuliert.

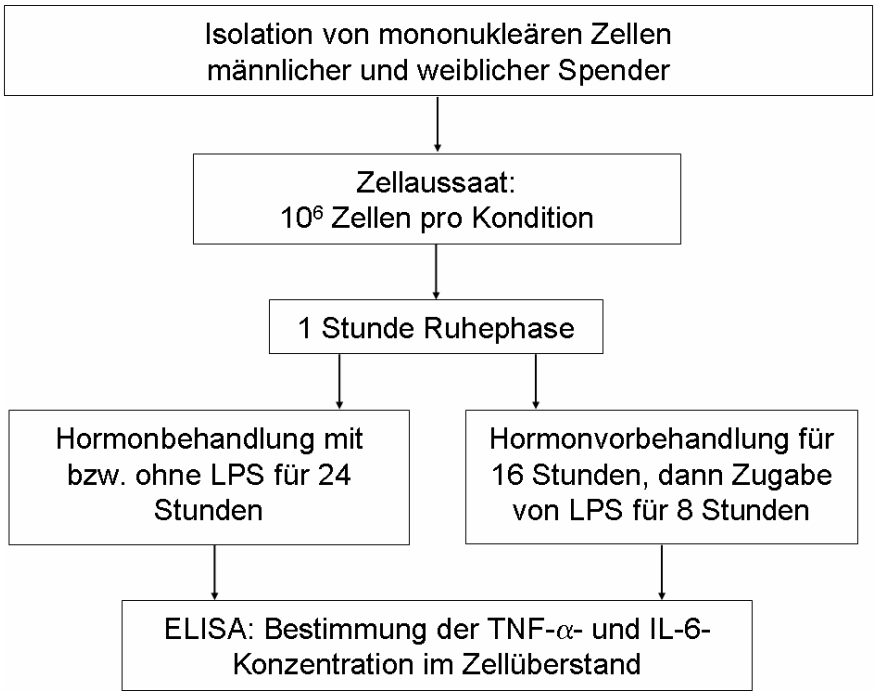
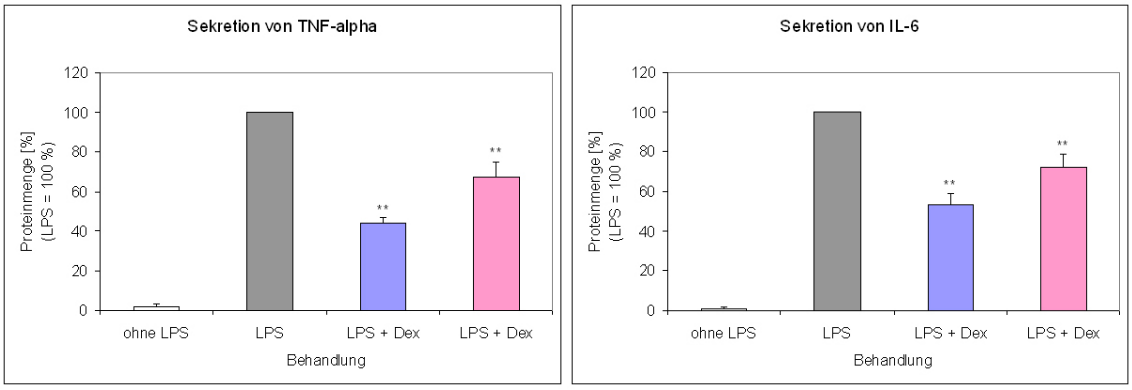


Abbildung 11: Schema des Versuchsablaufs zur Untersuchung der Zytokinsekretion.

3.2.1 Einfluss von Dexamethason

Die Behandlung mononukleärer Zellen männlicher und weiblicher Spender mit 100 nM Dexamethason bewirkte in allen Versuchen eine starke signifikante Reduktion der TNF-α- und IL-6-Sekretion und bestätigte so die Validität von Modellsystem und Methodik. Durch die Behandlung mit Dexamethason konnte ein geschlechtsspezifischer Unterschied im Ausmaß der Zytokinsekretion festgestellt werden. In mononukleären Zellen männlicher Spender wurde die TNF-α- und IL-6-Sekretion stärker reduziert als in mononukleären Zellen weiblicher Spender (Abb. 12). Der Unterschied in der Zytokinsekretion konnte mit und ohne LPS-Stimulierung gezeigt werden und war signifikant ($P < 0,05$).



A **B**

Abbildung 12: Dexamethason hemmt die Zytokinsekretion in humanen mononukleären Zellen. Dieser Effekt war in Zellen männlicher Spender (blau) stärker ausgeprägt als in Zellen weiblicher Spender (rot). Die Zellen wurden für 24 Stunden mit 100 nM Dexamethason (Dex) behandelt und mit 100 ng/ml LPS stimuliert. Dargestellt ist die relative Proteinmenge von TNF-α (**A**) und IL-6 (**B**) ermittelt durch ELISA. Als Kontrolle dienten LPS-stimulierte Zellen. Mittelwert und Standardfehler neun unabhängiger Versuche. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ verglichen mit LPS-stimulierten Zellen.

3.2.2 Einfluss von Sexualhormonen

Die Behandlung mononukleärer Zellen männlicher und weiblicher Spender mit 100 nM Testosteron bzw. 100 nM Östradiol hatte keinen signifikanten Einfluss auf die TNF-α- und IL-6-Sekretion (Abb. 13). Weder eine Behandlung mit Testosteron bzw. Östradiol für 24 Stunden mit LPS-Stimulierung oder ohne LPS-Stimulierung, noch eine Hormon-Vorbehandlung für 16 Stunden mit anschließender LPS-Stimulierung für acht Stunden, zeigte ein signifikant verändertes Sekretionsverhalten der Zellen.
Darüber hinaus wurden weitere Versuche mit abgeänderten Versuchsbedingungen durchgeführt: Die Hormon-Behandlung mit LPS-Stimulierung und ohne LPS-Stimulierung wurde von 24 Stunden auf 48 Stunden verlängert. Außerdem wurden die Bedingungen für die Hormon-Vorbehandlung variiert: Die eingesetzte Konzentration von Testosteron und Östradiol wurde von 100 nM erweitert auf 1, 10, 100 und 1.000 nM. Die Hormon-Vorbehandlung wurde für zwei, sechs und 14 Stunden durchgeführt, gefolgt von einer LPS-Stimulierung, welche die Behandlungszeit auf 24 Stunden ergänzte. Außerdem wurde eine Hormon-Vorbehandlung für 24 Stunden mit anschließender LPS-Stimulierung für 12 Stunden durchgeführt. Für alle Versuche wurden mononukleäre Zellen männlicher und weiblicher Spender eingesetzt. Allerdings konnte auch bei diesen variierten Versuchsbedingungen kein signifikanter Einfluss von Testosteron bzw. Östradiol auf die Zytokinsekretion festgestellt werden (ohne Abb.).

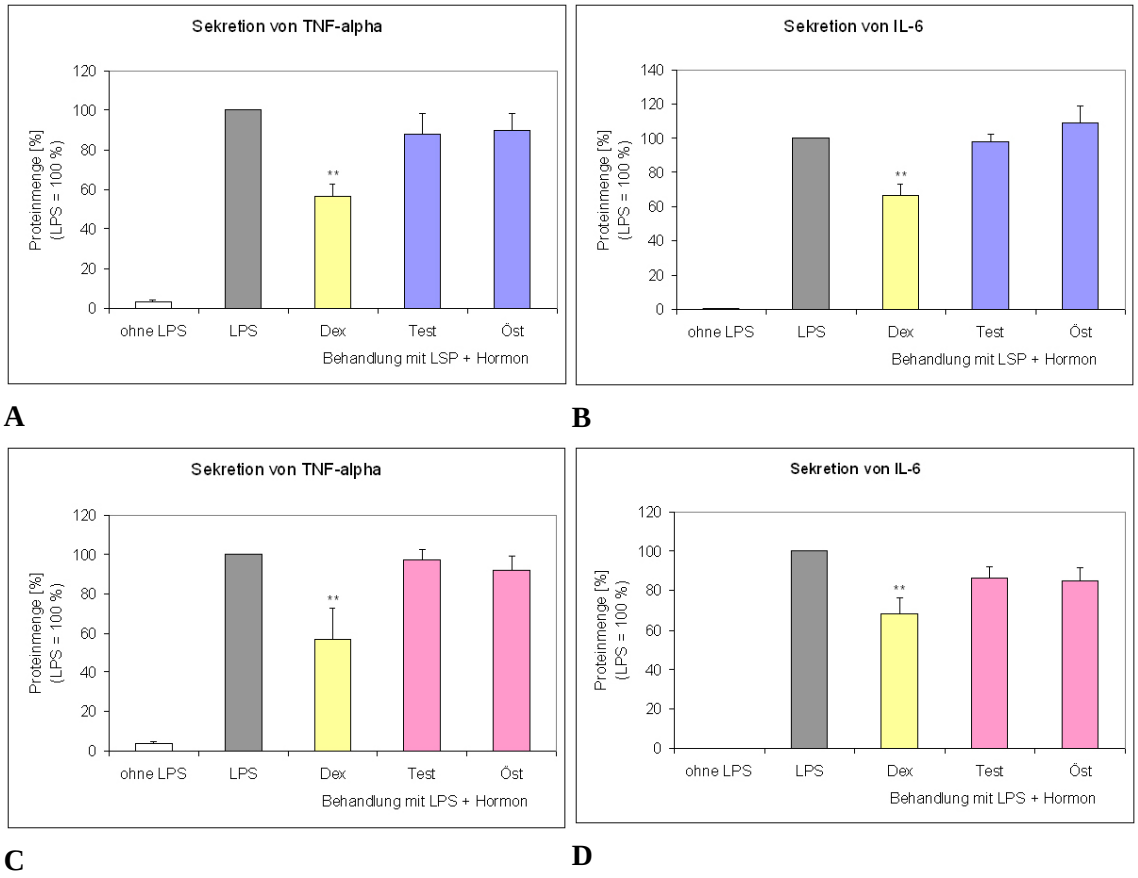


Abbildung 13: Testosteron und Östradiol hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Zytokinsekretion in mononukleären Zellen männlicher (A, B) und weiblicher (C, D) Spender. Die Zellen wurden mit 100 nM Dexamethason (Dex), 100 nM Testosteron (Test) bzw. 100 nM 17β-Östradiol (Öst) für 24 Stunden behandelt. Parallel dazu wurde eine Stimulierung mit 100 ng/ml LPS durchgeführt. Dargestellt ist die relative Proteinmenge von TNF-α (**A, C**) und IL-6 (**B, D**) ermittelt durch ELISA. Mittelwert und Standardfehler sechs (Zellen männlicher Spender) bzw. drei (Zellen weiblicher Spender) unabhängiger Versuche. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ verglichen mit LPS-stimulierten Zellen.

3.2.3 Einfluss von Calcitriol

Die Behandlung humaner mononukleärer Zellen mit Calcitriol ergab uneinheitliche Effekte auf die TNF-α und IL-6-Sekretion. Eine Behandlung mononukleärer Zellen männlicher Spender mit Calcitriol und LPS für 24 Stunden bewirkte eine leichte, aber signifikante Reduktion der Zytokinsekretion (Abb. 14 A, B). Ohne LPS-Stimulierung hatte Calcitriol keinen Einfluss auf die Zytokinsekretion (Abb. 14 C, D). Außerdem wurde anhand mononukleärer Zellen männlicher Spender eine Behandlung mit 0,1 nM und 10 nM Calcitriol und 100 ng/ml LPS für 3, 6 und 24 Stunden durchgeführt. Diese Versuche zeigten, dass die reduzierende Wirkung von Calcitriol auf die TNF-α- und IL-6-Sekretion nach ca. sechs Stunden einsetzte und nach 24 Stunden am stärksten ausgeprägt war (ohne Abb.).

In mononukleären Zellen weiblicher Spender wurde die LPS-stimulierte TNF-α-Sekretion durch Retinolsäure uneinheitlich reguliert: 100 pM und 1 nM Calcitriol hatten keinen Effekt, 10 nM und 100 nM Calcitriol reduzierten und 1 µM Calcitriol aktivierte die TNF-α-Sekretion (Abb. 15 A). Die LPS-stimulierte IL-6-Sekretion wurde in Zellen weiblicher Spender nicht signifikant beeinflusst (Abb. 15 B). Ohne LPS-Stimulierung hatte Calcitriol in Zellen weiblicher Spender keinen signifikanten Einfluss auf die TNF-α-Sekretion (Abb. 15 C) und reduzierte die IL-6-Sekretion (signifikant bei 10 nM und 100 nM) (Abb. 15 D).

Die Calcitriol-Vorbehandlung für 16 Stunden mit anschließender LPS-Stimulierung für acht Stunden ergab in Zellen männlicher Spender keinen signifikanten Einfluss auf die TNF-α-Sekretion (Abb. 16 A) und reduzierte die TNF-α-Sekretion in Zellen weiblicher Spender (Abb. 16 C). Die IL-6-Sekretion wurde in Zellen männlicher und weiblicher Spender aktiviert (Abb. 16 B, D).

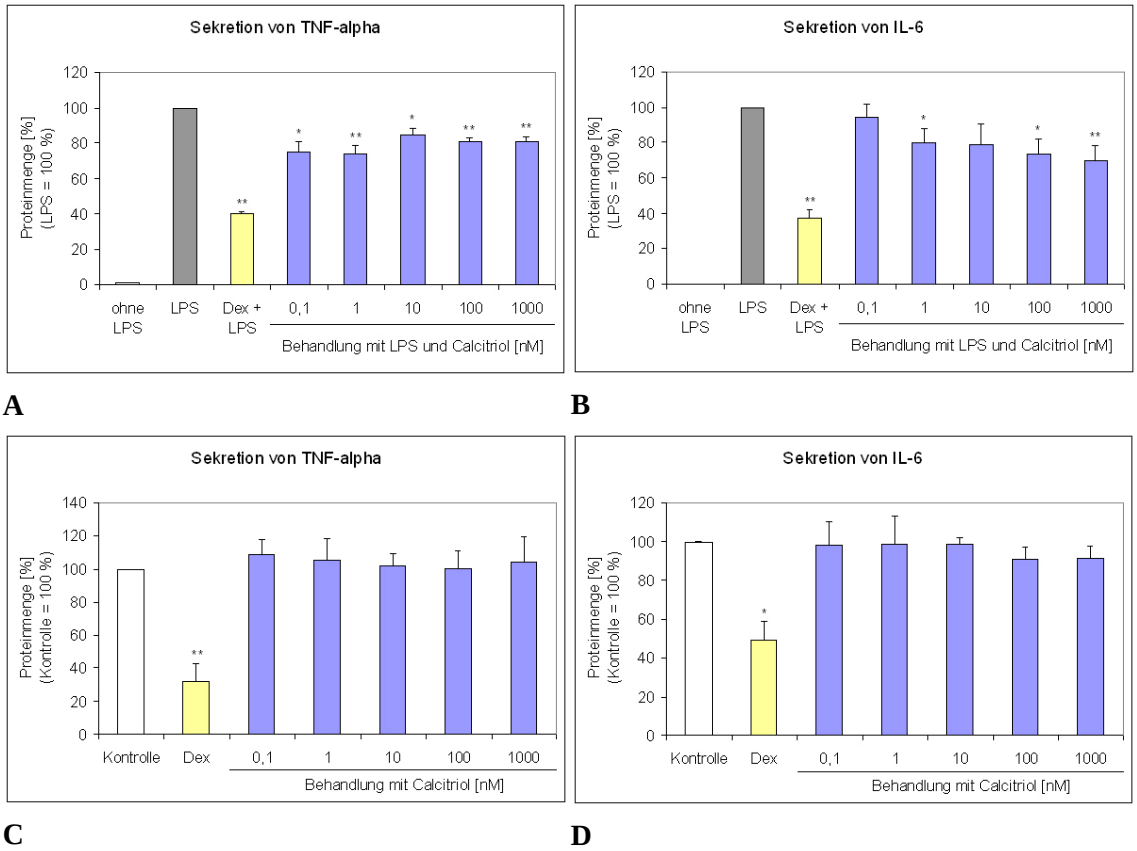


Abbildung 14: Einfluss von Calcitriol auf die Zytokinsekretion in mononukleären Zellen männlicher Spender. Die Zellen wurden mit 100 nM Dexamethason (Dex) bzw. 0,1 nM bis 1 µM Calcitriol für 24 Stunden behandelt. (**A, B**) Mit paralleler LPS-Stimulierung (100 ng/ml). (**C, D**) Ohne LPS-Stimulierung. Dargestellt ist die relative Proteinmenge von TNF-α (**A, C**) und IL-6 (**B, D**) ermittelt durch ELISA. Mittelwert und Standardfehler fünf unabhängiger Versuche. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ verglichen mit LPS-stimulierten bzw. nicht stimulierten Zellen.

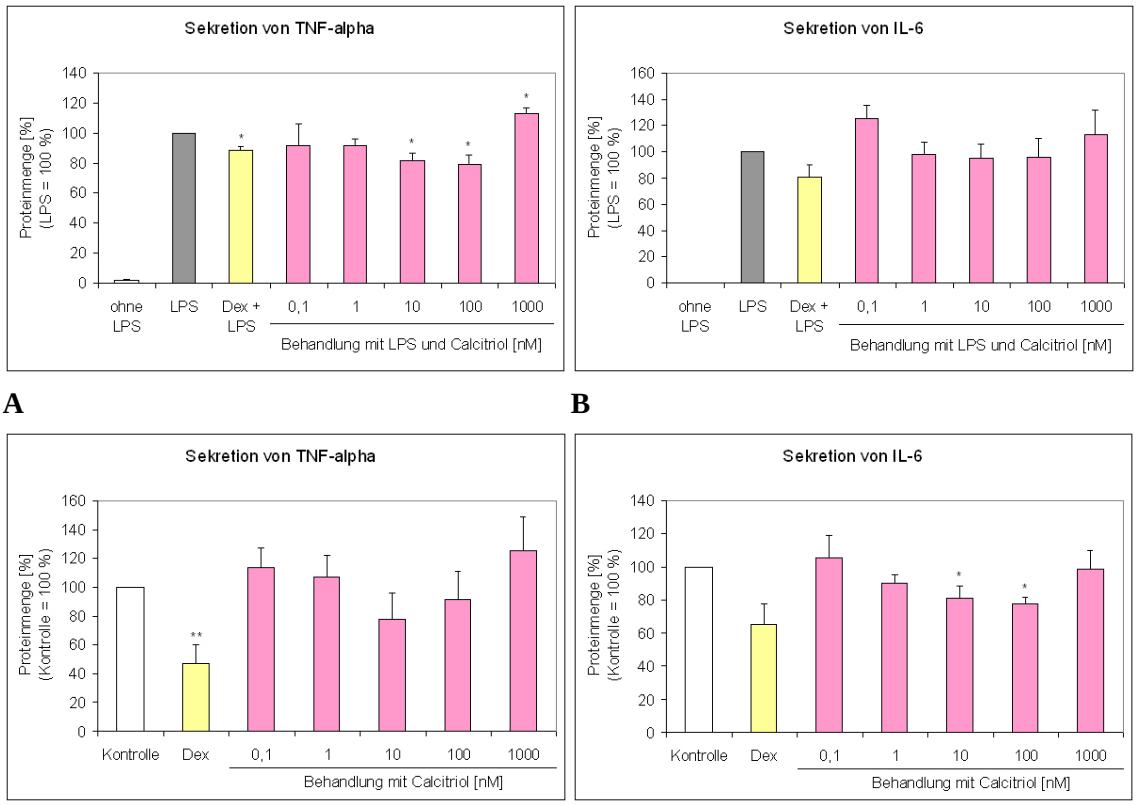


Abbildung 15: Einfluss von Calcitriol auf die Zytokinsekretion in mononukleären Zellen weiblicher Spender. Die Zellen wurden mit 100 nM Dexamethason (Dex) bzw. 0,1 nM bis 1 µM Calcitriol für 24 Stunden behandelt. (**A, B**) Mit paralleler LPS-Stimulierung (100 ng/ml). (**C, D**) Ohne LPS-Stimulierung. Dargestellt ist die relative Proteinmenge von TNF-α (**A, C**) und IL-6 (**B, D**) ermittelt durch ELISA. Mittelwert und Standardfehler vier (mit LPS-Stimulierung) bzw. fünf (ohne LPS-Stimulierung) unabhängiger Versuche. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ verglichen mit LPS-stimulierten bzw. nicht stimulierten Zellen.

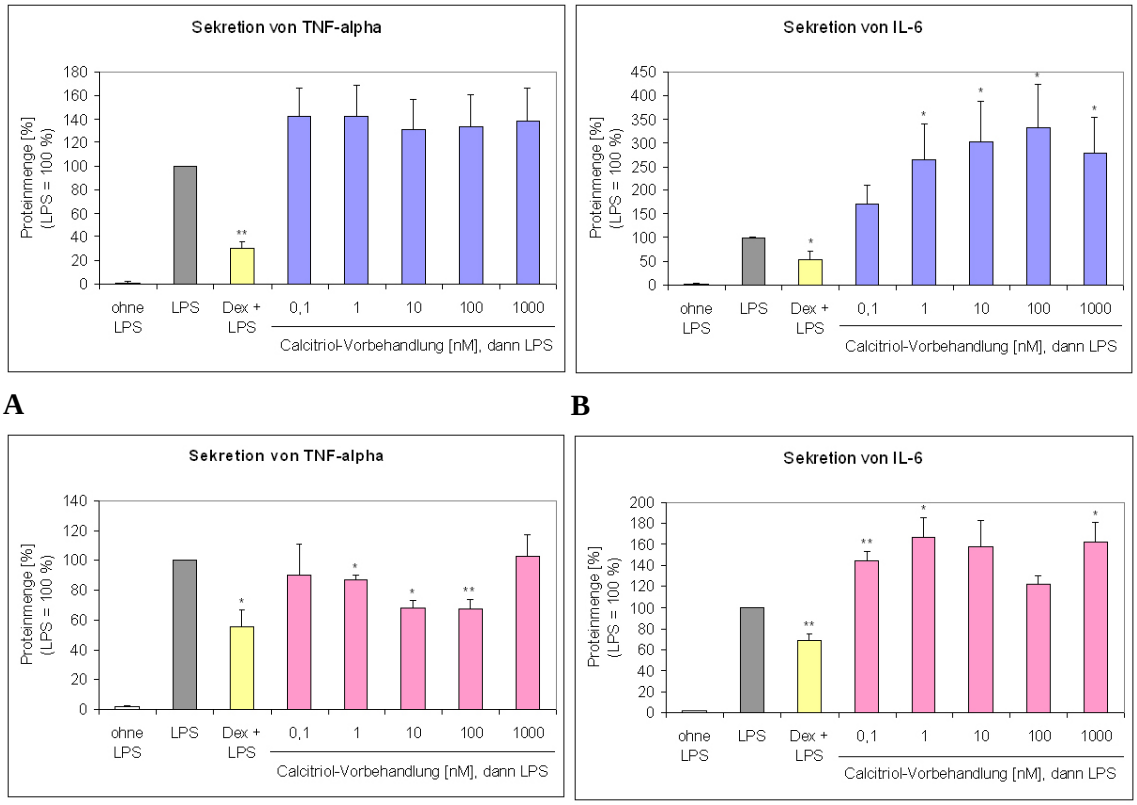


Abbildung 16: Einfluss der Calcitriol-Vorbehandlung auf die Zytokinsekretion in mononukleären Zellen männlicher (A, B) und weiblicher (C, D) Spender. Die Zellen wurden mit 100 nM Dexamethason (Dex) bzw. 0,1 nM bis 1.000 nM Calcitriol für 16 Stunden vorbehandelt und anschließend für 8 Stunden mit 100 ng/ml LPS stimuliert. Dargestellt ist die relative Proteinmenge von TNF-α (**A, C**) und IL-6 (**B, D**) ermittelt durch ELISA. Mittelwert und Standardfehler sieben (Zellen männlicher Spender) bzw. drei (Zellen weiblicher Spender) unabhängiger Versuche. * $P < 0{,}01$; ** $P < 0{,}001$ verglichen mit LPS-stimulierten Zellen.

3.2.4 Einfluss von Retinolsäure

Die Behandlung mononukleärer Zellen männlicher und weiblicher Spender mit all-*trans*- bzw. 9-*cis*-Retinolsäure für 24 Stunden bewirkte eine konzentrationsabhängige Reduktion der TNF-α- und IL-6-Sekretion (Abb. 17 und 18). Dieser Effekt konnte sowohl mit LPS-Stimulierung als auch ohne LPS-Stimulierung gezeigt werden. Der Retinolsäure-Effekt war bei der großen Mehrzahl der Versuchsbedingungen signifikant. Eine Ausnahme stellte der Einfluss von Retinolsäure und LPS auf die IL-6-Sekretion dar, welche nur bei einer Konzentration von 1 µM all-*trans*- und 9-*cis*-Retinolsäure (Zellen männlicher Spender) bzw. 100 nM 9-*cis*-Retinolsäure (Zellen weiblicher Spender) signifikant war.
Außerdem wurde in mononukleären Zellen männlicher Spender eine Behandlung mit 100 nM all-*trans*- bzw. 9-*cis*-Retinolsäure und 100 ng/ml LPS für drei, sechs, 12 und 24 Stunden durchgeführt. Diese Versuche zeigten, dass die reduzierende Wirkung von Retinolsäure auf die TNF-α und IL-6-Sekretion bereits beim ersten Messpunkt, nach drei Stunden Behandlung, maximal ausgeprägt war.
Die Retinolsäure-Vorbehandlung für 16 Stunden mit anschließender LPS-Stimulierung für acht Stunden bewirkte in mononukleären Zellen männlicher und weiblicher Spender eine konzentrationsabhängige signifikante Reduktion der TNF-α-Sekretion (Abb. 19 A, C). Die IL-6-Sekretion wurde in Zellen männlicher Spender durch Retinolsäure-Vorbehandlung aktiviert (signifikant bei 1 nM und 10 nM all-*trans*-Retinolsäure) und in Zellen weiblicher Spender konzentrationsabhängig reduziert (signifikant bei 100 pM 9-*cis*-Retinolsäure) bzw. aktiviert (signifikant bei 1 µM all-*trans*- und 9-*cis*-Retinolsäure) (Abb. 19 B, D).

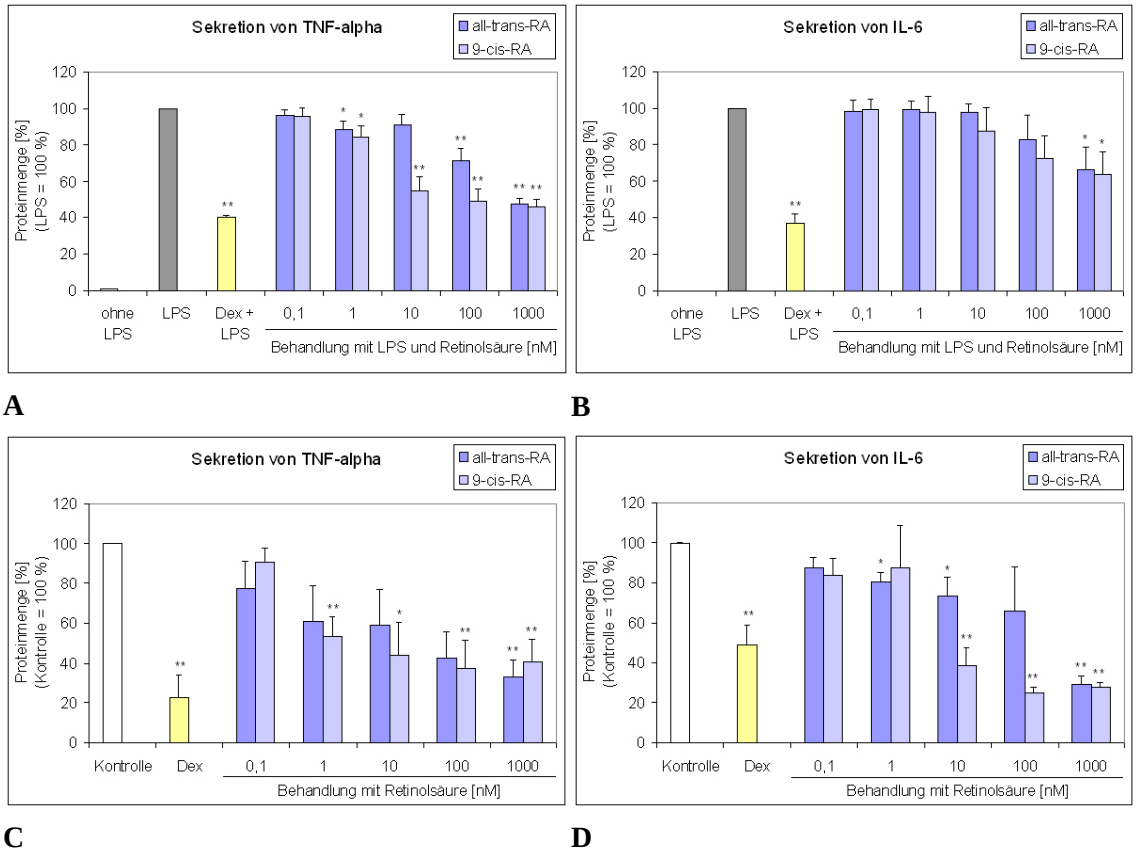


Abbildung 17: Retinolsäure reduzierte die Zytokinsekretion in mononukleären Zellen männlicher Spender. Die Zellen wurden mit 100 nM Dexamethason (Dex), 0,1 nM bis 1.000 nM all-*trans*-Retinolsäure (all-trans-RA) bzw. 9-*cis*-Retinolsäure (9-cis-RA) für 24 Stunden behandelt. (**A, B**) Mit paralleler LPS-Stimulierung (100 ng/ml). (**C, D**) Ohne LPS-Stimulierung. Dargestellt ist die relative Proteinmenge von TNF-α (**A, C**) und IL-6 (**B, D**) ermittelt durch ELISA. Mittelwert und Standardfehler fünf unabhängiger Versuche. * $P < 0{,}05$; ** $P < 0{,}01$ verglichen mit LPS-stimulierten bzw. nicht stimulierten Zellen.

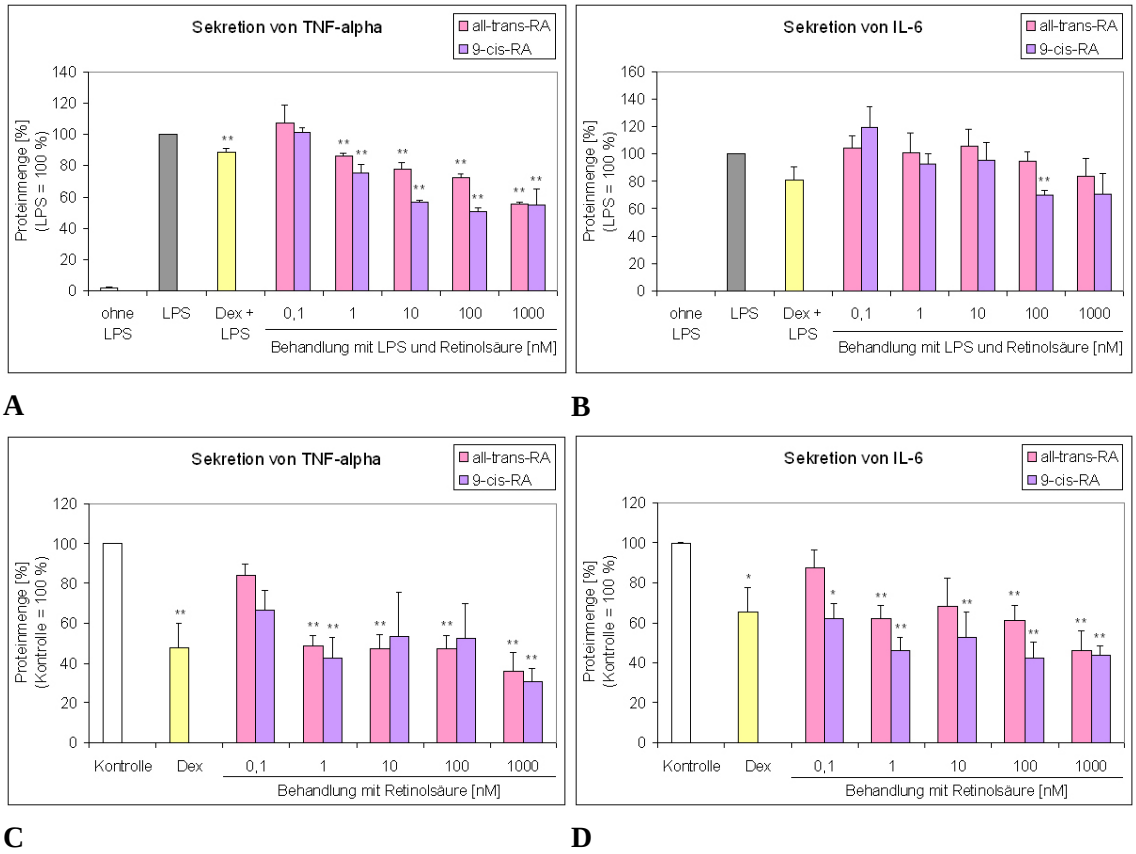


Abbildung 18: Retinolsäure reduzierte die Zytokinsekretion in mononukleären Zellen weiblicher Spender. Die Zellen wurden mit 100 nM Dexamethason (Dex), 0,1 nM bis 1.000 nM all-*trans*-Retinolsäure (all-trans-RA) bzw. 9-*cis*-Retinolsäure (9-cis-RA) für 24 Stunden behandelt. (**A, B**) Mit paralleler LPS-Stimulierung (100 ng/ml). (**C, D**) Ohne LPS-Stimulierung. Dargestellt ist die relative Proteinmenge von TNF-α (**A, C**) und IL-6 (**B, D**) ermittelt durch ELISA. Mittelwert und Standardfehler vier (mit LPS-Stimulierung) bzw. drei (ohne LPS-Stimulierung) unabhängiger Versuche. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ verglichen mit LPS-stimulierten bzw. nicht stimulierten Zellen.

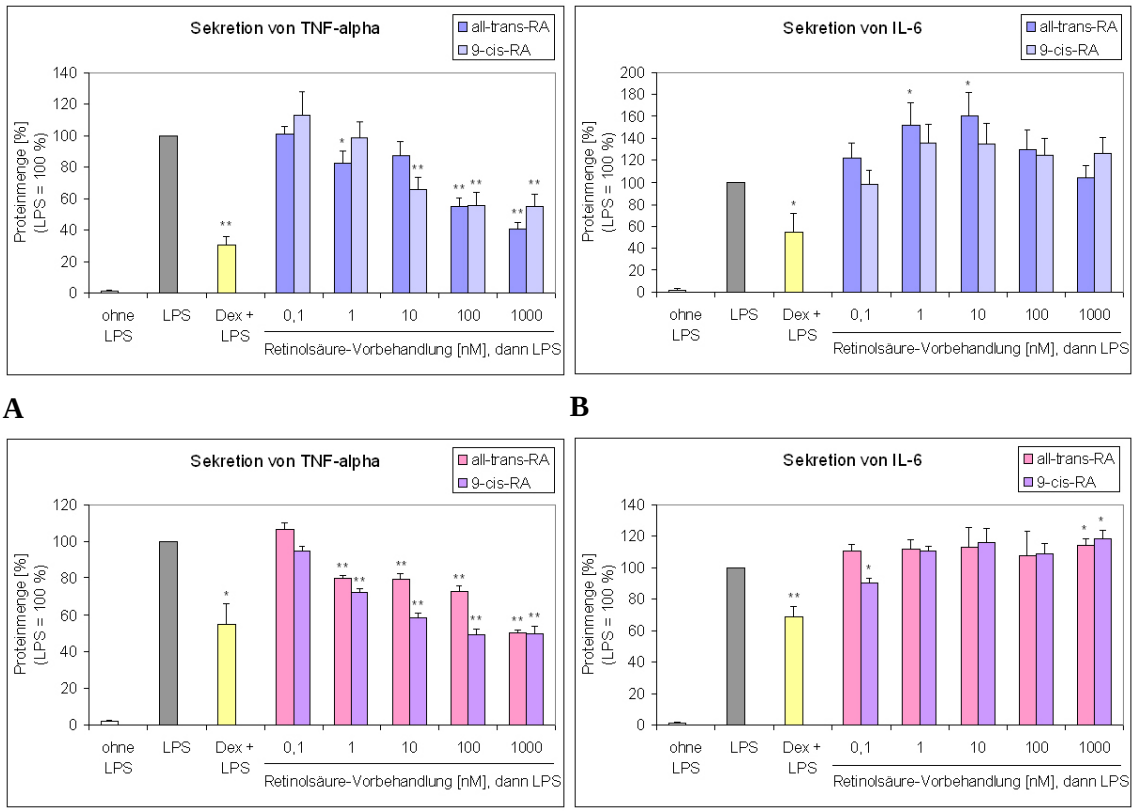


Abbildung 19: Einfluss der Retinolsäure-Vorbehandlung auf die Zytokinsekretion in mononukleären Zellen männlicher (A, B) und weiblicher (C, D) Spender. Die Zellen wurden mit 100 nM Dexamethason (Dex), 0,1 nM bis 1.000 nM all-*trans*-Retinolsäure (all-trans-RA) bzw. 9-*cis*-Retinolsäure (9-cis-RA) für 16 Stunden vorbehandelt und anschließend für 8 Stunden mit 100 ng/ml LPS stimuliert. Dargestellt ist die relative Proteinmenge von TNF-α (**A, C**) und IL-6 (**B, D**) ermittelt durch ELISA. Mittelwert und Standardfehler sieben (Zellen männlicher Spender) bzw. drei (Zellen weiblicher Spender) unabhängiger Versuche. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ verglichen mit LPS-stimulierten Zellen.

3.2.5 Vergleich von mononukleären Zellen und monozytären Zelllinien

Eine weitere Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, das Sekretionsverhalten frisch isolierter humaner mononukleärer Zellen und humaner monozytärer Zelllinien zu vergleichen. Die Zellen wurden typgerecht für 24 Stunden stimuliert: humane mononukleäre Zellen wurden mit 100 ng/ml LPS, THP-1 mit 1 µg/ml LPS und U937 mit 10 µg/ml LPS kombiniert mit 10 ng/ml PMA stimuliert. Parallel dazu wurden die Zellen mit 1, 10, 100 und 1.000 nM Dexamethason, Testosteron, Östradiol, Calcitriol und all-*trans*-Retinolsäure behandelt und anschließend die Sekretion von TNF-α und IL-6 bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst.
Eine übereinstimmende Wirkung dieser Hormone auf die Zytokinsekretion in humanen mononukleären Zellen und in den humanen monozytären Zelllinien konnte nur bei Behandlung mit Dexamethason und Retinolsäure im Falle der IL-6-Sekretion gezeigt werden. Die Behandlung von THP-1 und U937 mit Testosteron, Östradiol, Calcitriol bzw. Retinolsäure hatte unterschiedliche Wirkungen auf die Zytokinsekretion, die meistens nicht mit der Wirkung auf humane mononukleäre Zellen übereinstimmte. So wurde z.B. die IL-6-Sekretion durch Östradiol in humanen mononukleären Zellen nicht beeinflusst, in THP-1 aktiviert und in U937 gehemmt.

Tabelle 4: Der Einfluss von Testosteron, Östradiol, Calcitriol und Retinolsäure auf die Sekretion von TNF-α (A) und IL-6 (B) in mononukleären Zellen und humanen monozytären Zelllinien. Mononukleäre Zellen wurden mit 100 ng/ml LPS, THP-1 mit 1 µg/ml LPS und U937 mit 10 µg/ml LPS, kombiniert mit 10 ng/ml PMA, stimuliert. Parallel dazu wurden die Zellen mit 100 nM Dexamethason, 1, 10, 100 und 1.000 nM Testosteron, Östradiol, Calcitriol bzw. all-*trans*-Retinolsäure für 24 Stunden behandelt. Anschließend wurde die Zytokinsekretion mithilfe von ELISAs ermittelt. Dargestellt ist der Einfluss auf die Zytokinsekretion von mindestens drei unabhängigen Versuchen. (↔) ohne Effekt; (↑) signifikant aktiviert; (↓) signifikant gehemmt, (↑↓) konzentrationsabhängig aktiviert oder gehemmt. * $P < 0,05$ verglichen mit LPS-stimulierten Zellen.

A

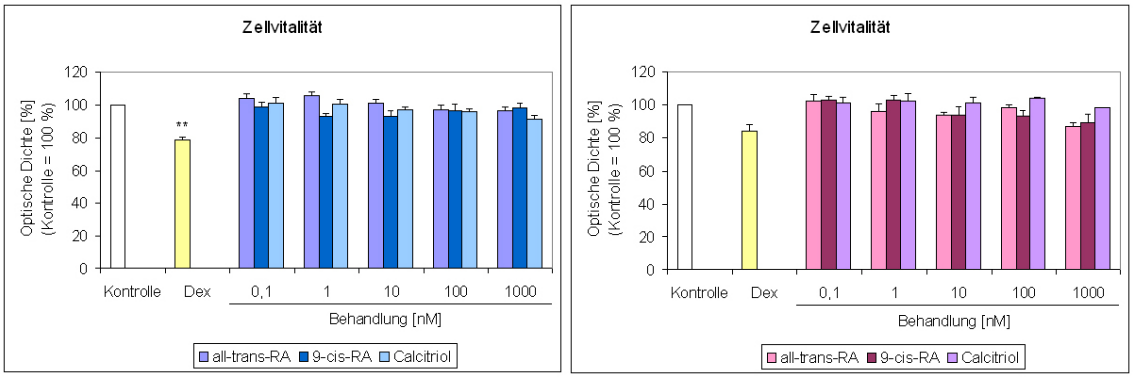
	Dexamethason	Testosteron	Östradiol	Calcitriol	Retinolsäure
Mononukleäre Zellen	↓	↔	↔	↓	↓
THP-1	↓	↔	↔	↔	↔
U937	↓	↓	↓	↑	↑

B

	Dexamethason	Testosteron	Östradiol	Calcitriol	Retinolsäure
Mononukleäre Zellen	↓	↔	↔	↓	↓
THP-1	↓	↔	↑	↑↓	↓
U937	↓	↓	↓	↑	↓

3.3 Untersuchungen zur Zellvitalität

Um einen eventuellen toxischen Einfluss der Hormone auf die Vitalität von humanen mononukleären Zellen auszuschließen, wurden MTS-Tests durchgeführt.
Mononukleäre Zellen männlicher und weiblicher Spender wurden für 24 Stunden mit Dexamethason, Calcitriol bzw. Retinolsäure behandelt und für zwei Stunden mit MTS-Substrat inkubiert. Calcitriol und beide Retinolsäure-Derivate hatten, in den zuvor im ELISA eingesetzten Konzentrationen, keinen Einfluss auf die Zellvitalität.
100 nM Dexamethason reduzierte die Zellvitalität leicht (signifikant in mononukleären Zellen männlicher Spender) (Abb. 20).



A **B**

Abbildung 20: Retinolsäure und Calcitriol hatten keinen Einfluss auf die Zellvitalität in mononukleären Zellen männlicher (A) und weiblicher (B) Spender. Dexamethason senkte die Zellvitalität leicht. Die Zellen wurden mit 100 nM Dexamethason (Dex), 0,1 nM bis 1.000 nM all-*trans*-Retinolsäure (all-trans-RA), 9-*cis*-Retinolsäure (9-cis-RA) bzw. Calcitriol für 24 Stunden behandelt. Dargestellt ist die relative optische Dichte gemessen im MTS-Test. Mittelwert und Standardfehler vier (Zellen männlicher Spender) bzw. zwei (Zellen weiblicher Spender) unabhängiger Versuche. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ verglichen mit nicht behandelten Zellen.

3.4 Untersuchungen zur Signaltransduktion

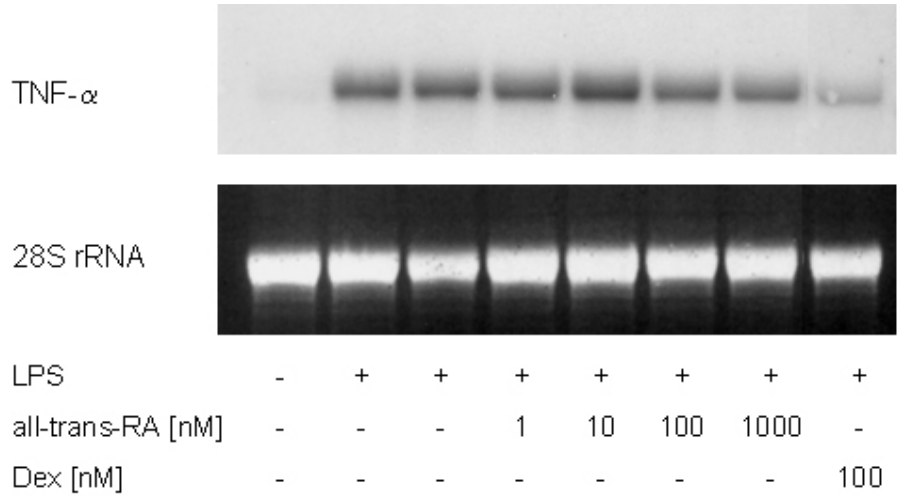
Im weiteren Verlauf der Arbeit stand der Einfluss von Retinolsäure auf die Signaltransduktion im Vordergrund. Die Aufgabe bestand darin, den Einfluss von Retinolsäure auf die TNF-α-Transkription und vorgeschaltete Signalwege aufzuklären.

3.4.1 Einfluss von Retinolsäure auf die Transkriptmenge von TNF-α

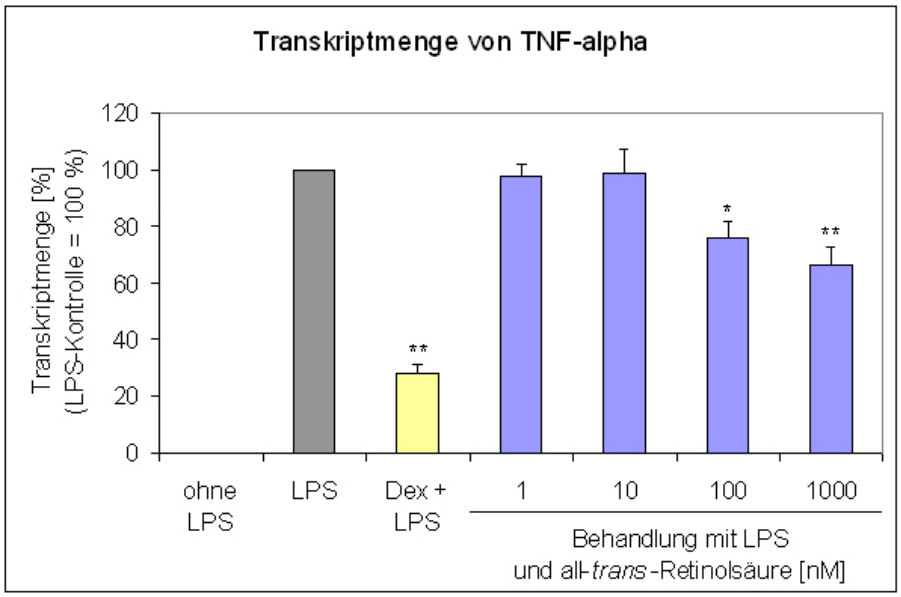
Wie in Kapitel 3.2.4 gezeigt werden konnte, reduziert Retinolsäure die LPS-stimulierte TNF-α-Sekretion in humanen mononukleären Zellen. In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob der Retinolsäure-Effekt bereits auf Transkriptebene nachweisbar ist. Dazu wurden mononukleäre Zellen männlicher Spender isoliert und über Nacht kultiviert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen für sechs Stunden mit LPS stimuliert und mit 100 nM Dexamethason bzw. 1, 10, 100 und 1.000 nM all-*trans*-Retinolsäure behandelt. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert und Northern Blot-Analysen durchgeführt.

In nicht stimulierten Zellen ließ sich kein TNF-α-Transkript nachweisen. Die Stimulierung mit 100 ng/ml LPS aktivierte die TNF-α-Transkription. Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit 1 nM und 10 nM all-*trans*-Retinolsäure hatte keinen Einfluss auf die TNF-α-Transkriptmenge. Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit 100 nM und 1 µM Retinolsäure hingegen, reduzierte die TNF-α-Transkriptmenge signifikant (Abb. 21). Auch die Behandlung mit LPS und 100 nM Dexamethason bewirkte eine reduzierte Transkriptmenge.

Zusätzlich wurde eine Behandlung mit 1, 10 und 100 nM Calcitriol durchgeführt, welche die TNF-α-Transkriptmenge nicht signifikant beeinflusste (ohne Abb.).



A

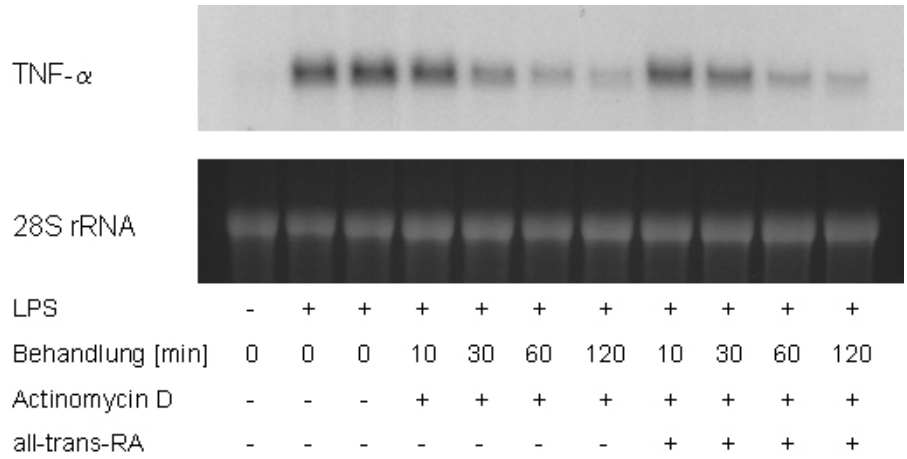


B

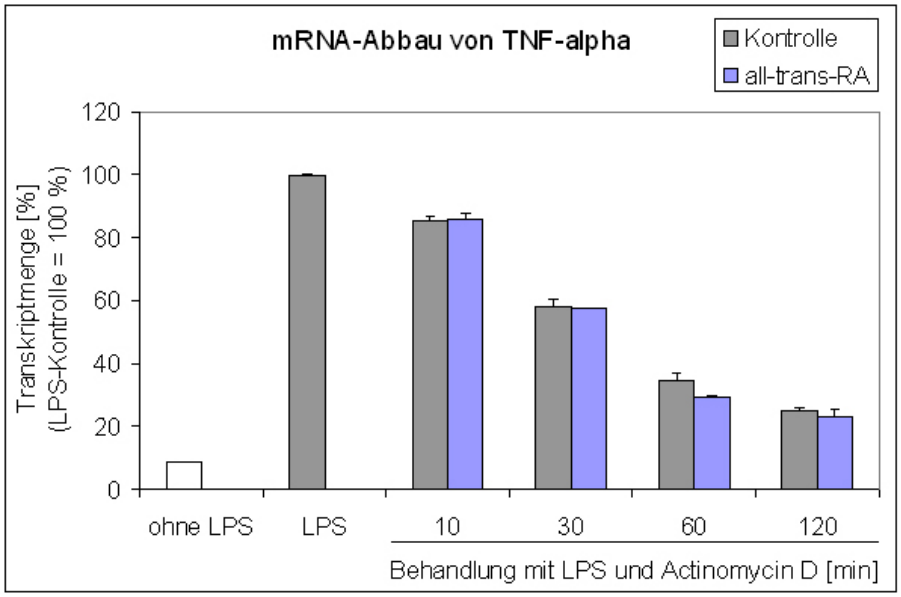
Abbildung 21: Retinolsäure reduzierte die TNF-α-Transkriptmenge in mononukleären Zellen männlicher Spender. Die Zellen wurden für sechs Stunden mit 100 ng/ml LPS stimuliert und 100 nM Dexamethason (Dex) bzw. 0,1 nM bis 1.000 nM all-*trans*-Retinolsäure (all-trans-RA) behandelt. Es folgten Northern Blot-Analysen. Als Kontrolle diente die Transkriptmenge der 28S rRNA. (**A**) Exemplarischer Northern Blot-Film. Die erwartete Größe des TNF-α-Transkripts liegt bei 2.000 bp. Es wurden 5 µg RNA verwendet. Als Ladungskontrolle diente die 28S rRNA Bande. (**B**) Graphische Darstellung der relativen Transkriptmenge von TNF-α. Mittelwert und Standardfehler dreier unabhängiger Versuche. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ verglichen mit LPS-stimulierten Zellen.

Einfluss von Retinolsäure auf die mRNA-Stabilität von TNF-α

Die Transkriptmenge wird durch zwei Prozesse beeinflusst: zum einen durch die RNA-Neusynthese und zum anderen durch den RNA-Abbau. Um den Einfluss von Retinolsäure auf den TNF-α-mRNA-Abbau zu untersuchen, wurde das Antibiotikum Actinomycin D eingesetzt, welches die RNA-Neusynthese unterbindet und so die Beobachtung des mRNA-Abbaus ermöglicht.
Mononukleäre Zellen männlicher Spender wurden für drei Stunden mit LPS stimuliert, um die TNF-α-Transkription zu aktivieren. Es folgte eine Inkubation mit 2,5 µg/ml Actinomycin D allein oder in Kombination mit 1 µM all-*trans*-Retinolsäure für 10, 30, 60 und 120 Minuten. Die Auswertung erfolgte mithilfe von Northern Blot-Analysen.
Die Behandlung mononukleärer Zellen männlicher Spender mit Actinomycin D bewirkte einen kontinuierlichen Abbau der TNF-α-mRNA. Nach Behandlung für zwei Stunden konnten noch ca. 20 % der ursprünglich vorhandenen RNA nachgewiesen werden. Die zusätzliche Behandlung mit all-*trans*-Retinolsäure hatte keinen Einfluss auf den mRNA-Abbau und folglich ebenfalls keinen Einfluss auf die TNF-α-mRNA-Stabilität (Abb. 22).



A



B

Abbildung 22: Retinolsäure hatte keinen Einfluss auf den TNF-α-RNA-Abbau in mononukleären Zellen männlicher Spender. Die Zellen wurden für drei Stunden mit 100 ng/ml LPS stimuliert, anschließend für 10 bis 120 Minuten mit 2,5 µg/ml Actinomycin D allein oder parallel mit 1 µM all-*trans*-Retinolsäure (all-trans-RA) behandelt. Es folgten Northern Blot-Analysen. (**A**) Exemplarischer Northern Blot-Film. Es wurden 5 µg RNA verwendet. Als Ladungskontrolle diente die 28S rRNA Bande. (**B**) Graphische Darstellung der relativen Transkriptmenge von TNF-α. Mittelwert und Standardfehler zwei unabhängiger Versuche.
* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ verglichen mit LPS- und Actinomycin D behandelten Zellen.

3.4.2 Einfluss von Retinolsäure auf die Aktivität von MAP-Kinasen

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) spielen eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung extrazellulärer Signale, indem sie membranständige Rezeptoren mit intrazellulären Zielmolekülen verbinden.
In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Retinolsäure die Aktivität der MAP-Kinasen p38 und ERK in humanen mononukleären Zellen beeinflusst. Dazu wurden zunächst mononukleäre Zellen männlicher Spender mit LPS für 15, 30 und 60 Minuten stimuliert und mithilfe von Western Blot-Analysen die MAP-Kinase-Proteinmenge bestimmt. Als Maß für die Aktivität der MAP-Kinasen diente die phosphorylierte Form, welche mit der nicht phosphorylierten Form verglichen wurde.
Die LPS-Stimulierung von mononukleären Zellen für 15 und 30 Minuten bewirkte eine starke Induktion der ERK- und p38-Aktivität (Abb. 23). Nach LPS-Stimulierung für 60 Minuten kehrte die MAP-Kinase Aktivität wieder in etwa auf das Niveau unstimulierter Zellen zurück.

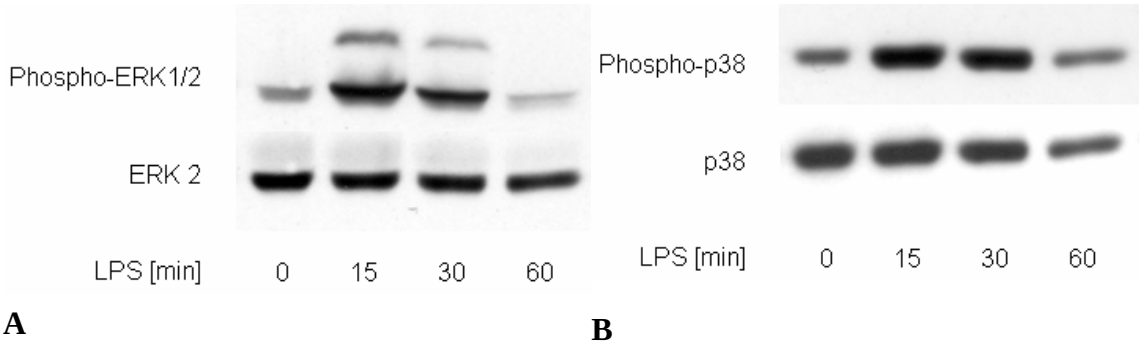


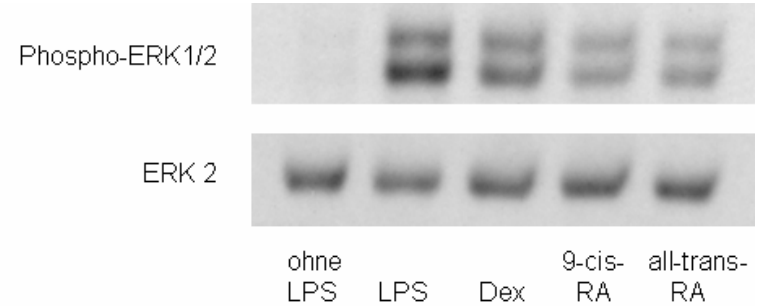
Abbildung 23: LPS aktivierte die MAP-Kinasen ERK und p38 in mononukleären Zellen männlicher Spender. Die Zellen wurden mit 100 ng/ml LPS für 15, 30 und 60 Minuten stimuliert. Dargestellt sind exemplarische Western Blot-Filme mit Antikörpern gegen Phospho-ERK 1/2 (**A**) und Phospho-p38 (**B**) und einer erwarteten Größe von 44/42 kDa bzw. 43 kDa. Als Ladungskontrolle diente die nicht phosphorylierte Form ERK2 (42 kDa) und p38 (43 kDa). Es wurden 75 µg Protein eingesetzt.

Einfluss von Retinolsäure auf die ERK-Aktivität

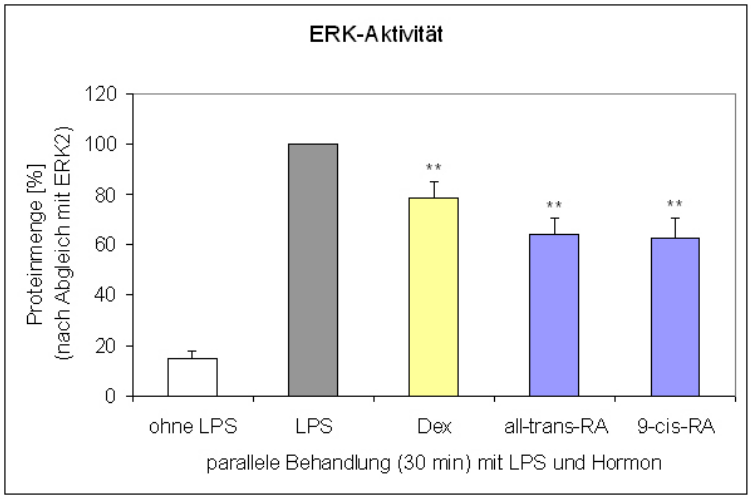
Die Behandlung von mononukleären Zellen männlicher Spender für 15 Minuten parallel mit 1 µM all-*trans*-Retinolsäure bzw. 9-*cis*-Retinolsäure und 100 ng/ml LPS hatte keinen signifikanten Einfluss auf die ERK-Aktivität (ohne Abb.).
Allerdings zeigte die Behandlung für 30 Minuten mit beiden Retinolsäure-Derivaten und LPS eine signifikante Reduktion der ERK-Aktivität (Abb. 24).
Die Dexamethason-Behandlung reduzierte die ERK-Aktivität ebenfalls signifikant.
Außerdem wurde eine Retinolsäure-Vorbehandlung für 16 Stunden mit anschließender LPS-Stimulierung für 30 Minuten durchgeführt. Diese Behandlung hatte keinen signifikanten Einfluss auf die ERK-Aktivität (ohne Abb.).

Einfluss von Retinolsäure auf die p38-Aktivität

Die Behandlung von mononukleären Zellen männlicher Spender für 30 Minuten mit 1 µM all-*trans*-Retinolsäure bzw. 9-*cis*-Retinolsäure und 100 ng/ml LPS, sowie die Retinolsäure-Vorbehandlung für 16 Stunden mit anschließender LPS-Stimulierung für 30 Minuten hatten keinen signifikanten Einfluss auf die p38-Aktivität. Auch die Behandlung mit 100 nM Dexamethason und 100 ng/ml LPS zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die p38-Aktivität (Abb. 25).

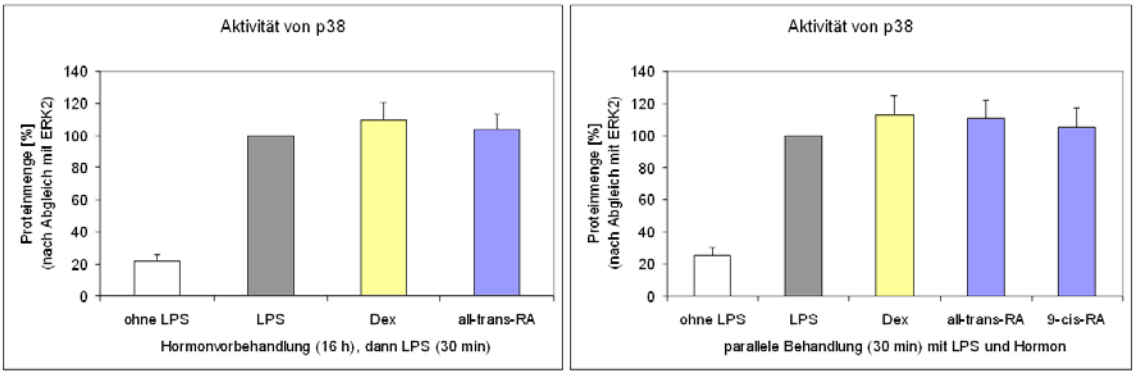


A



B

Abbildung 24: Retinolsäure reduzierte die Aktivität von ERK1/2 in mononukleären Zellen männlicher Spender. Die Zellen wurden für 30 Minuten parallel mit 100 ng/ml LPS und 100 nM Dexamethason (Dex), 1 µM all-*trans*-Retinolsäure (all-trans-RA) bzw. 9-*cis*-Retinolsäure (9-cis-RA) behandelt. Die Proteinmene von ERK wurde in Western Blot-Analysen nachgewiesen. (**A**) Exemplarischer Western Blot-Film mit einem Antikörper gegen Phospho-ERK 1/2 und einer erwarteten Größe von 44/42 kDa. Als Ladungskontrolle diente die nicht phosphorylierte Form ERK2 mit einer erwarteten Größe von 42 kDa. Es wurden 30 µg Protein eingesetzt. (**B**) Relative Proteinmenge von Phospho-ERK 1/2, Mittelwert und Standardfehler vier unabhängiger Versuche. * $P < 0{,}01$; ** $P < 0{,}001$ verglichen mit LPS-stimulierten Zellen.



A **B**

Abbildung 25: Retinolsäure hatte keinen signifikanten Einfluss auf die p38-Aktivität in mononukleären Zellen männlicher Spender. Die Zellen wurden mit 100 ng/ml LPS und 100 nM Dexamethason (Dex), 1 µM all-*trans*-Retinolsäure (all-trans-RA) bzw. 9-*cis*-Retinolsäure (9-cis-RA) bzw. behandelt. Die Proteinmene von ERK wurde in Western Blot-Analysen nachgewiesen. **(A)** Hormon-Vorbehandlung für 16 Stunden mit anschließender LPS-Stimulierung für 30 Minuten. (**B**) Parallele Behandlung mit LPS und Hormon für 30 Minuten. Dargestellt ist die relative Proteinmenge, Mittelwert und Standardfehler drei bzw. zwei unabhängiger Versuche. * $P < 0{,}01$; ** $P < 0{,}001$ verglichen mit LPS-stimulierten Zellen.

4. Diskussion

Monozyten und Makrophagen spielen eine wichtige Rolle in der Regulierung der Immunantwort und der Entzündungsreaktion. Nach Stimulierung sezernieren sie proinflammatorische Zytokine, darunter Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor-α (TNF-α), welche u.a. wichtig sind für die Aktivierung der Immunantwort bei Infektionen und für die Gewebeheilung. Allerdings können diese Zytokine neben ihrem positiven auch einen negativen Einfluss nehmen. So kann eine massive Stimulation von Makrophagen zu einer überhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine führen, darunter insbesondere TNF-α. Diese löst möglicherweise einen septischen Schock aus, charakterisiert durch Fieber, intravaskuläre Gerinnung und multiples Organversagen. Trotz großer Bemühungen gibt es noch keine erfolgreiche Therapie für dieses Krankheitsbild. Es wird vermutet, dass in den USA jedes Jahr ca. 50.000 Menschen an einem septischen Schock sterben (siehe z.B. [30]). Außerdem sind hohe Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine von Bedeutung für chronische, entzündungsbedingte Krankheiten, darunter rheumatoide Arthritis, Psoriasis und Morbus Crohn (Übersicht z.B. bei Elenkov et al. [2], O'Shea et al. [31] und Hildebrand et al. [32]).

Glucocorticoide wie das Cortisol sind schon seit einigen Jahrzehnten gut bekannt für ihre immunsuppressive und antiinflammatorische Wirkung (siehe z.B. [33]). Natürliche und synthetische Glucocorticoide werden für therapeutische Zwecke eingesetzt und sind auch heutzutage noch immer die Standardtherapie für immun- und entzündungsbedingte Krankheiten (Überblick z.B. bei Miner et al. [34] und Belvisi et al. [35]). Allerdings kann eine Glucocorticoid-Behandlung über längeren Zeitraum zu schwerwiegenden Nebenwirkungen führen, darunter Osteoporose und Diabetes (siehe z.B. [36, 37]), deshalb besteht ein hoher medizinischer Bedarf an antiinflammatorischen Wirkstoffen mit einem besseren Kosten-Nutzen-Verhältnis. Außerdem sind experimentelle und klinische Studien, welche sich mit der Regulierung der Entzündungsreaktion beschäftigen, nach wie vor von Bedeutung für die Entwicklung neuer antiinflammatorischer Wirkstoffe.

In den letzten Jahren sind auch andere Wirkstoffe, mit potentiell immunmodulatorischem Einfluss, in den Mittelpunkt des Interesses gerückt, dazu zählen andere Steroidhormone, das Secosteroid Calcitriol und das Terpen-Derivat Retinolsäure

(zur Vertiefung siehe z.B. [38-40]). Allerdings ist erst wenig über die molekularen Mechanismen dieser Hormone in der Entzündungsreaktion bekannt.
In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von Steroidhormonen, Calcitriol und Retinolsäure auf die Sekretion proinflammatorischer Zytokine in humanen mononukleären Zellen untersucht werden. Um eventuelle geschlechtsspezifische Unterschiede in der Zytokinsekretion festzustellen, wurden sowohl Zellen männlicher als auch weiblicher Spender verwendet. Außerdem bestand die Aufgabe darin, den Einfluss von Retinolsäure auf die Signaltransduktion in LPS-stimulierten, humanen mononukleären Zellen aufzuklären.

4.1 Charakterisierung der verwendeten Zellmodellsysteme

Zu den mononukleären Zellen gehören Monozyten und Lymphozyten, welche den polymorphkernigen Granulozyten gegenübergestellt werden. Monozyten und Lymphozyten sind interessante Modellsysteme zur Untersuchung inflammatorischer Prozesse, da sie vielfältige Aufgaben in der Entzündungsreaktion übernehmen. Eine wichtige Funktion der Monozyten und Lymphozyten ist die Sekretion von Zytokinen, welche die Stärke, Dauer und Richtung der Entzündungsreaktion steuern (Übersicht z.B. bei [5]). Die hier untersuchten proinflammatorischen Zytokine TNF-α und IL-6 werden hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen gebildet. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, den Anteil an Monozyten in der Zellkultur zu erhöhen. Der normale Anteil von Monozyten innerhalb der Blut-Lymphozyten beträgt vier bis acht Prozent (z.B. [29]). Die angewandte Methode zur Isolierung mononukleärer Zellen erzielte eine auf 55 Prozent Monozyten angereicherte Zellkultur. Daneben wurden T-Lymphozyten mit einem Anteil von ca. 35 Prozent nachgewiesen. T-Lymphozyten spielen allerdings in dieser Arbeit eine vernachlässigbar kleine Rolle, da sie nur unwesentlich zur Sekretion von TNF-α beitragen [41]. Außerdem wird TNF-α nur von aktivierten T-Lymphozyten gebildet (z.B. [5]). Der verwendete Stimulus LPS ist zwar ein wichtiger Stimulus für Monozyten, aber unbedeutend für die T-Zell-Aktiverung (z.B. [42]). So berichten z.B. Raga et al. [43], dass die TNF-α-Sekretion in T-Lymphozyten nach Stimulation mit einem bakteriellen Produkt mindestens 10 Tage erforderte. Darüber hinaus konnten Wang et al. [44] in LPS-stimulierten T-Lymphozyten keine messbare Sekretion von TNF-α feststellen. Diese Studien lassen vermuten, dass T-Lymphozyten eine vernachlässigbar kleine Rolle in der TNF-α-Sekretion spielen.

Demnach sind in erster Linie Monozyten und Makrophagen für die Freisetzung von TNF-α verantwortlich, welche auch die entscheidenden Zielzellen der Hormonwirkung sind.

Stimulierung der Zytokinsekretion

Monozyten befinden sich im Blut normalerweise in einem passiven, nicht sekretorischen Zustand. Durch die Blutentnahme und den anschließenden Isolierungsprozess wurden die Zellen leicht aktiviert. Dies machte sich bemerkbar an der netzartigen Formation der Zellen, dem Adherieren der Zellen am Gefäßboden und der geringen, aber messbaren Zytokinsekretion.
Einer der effektivsten Stimuli für Monozyten sind Lipopolysaccharide (LPS), welche ein wichtiger Bestandteil der Zellmembran Gram-negativer Bakterien sind. Monozyten reagieren auf eine LPS-Stimulierung mit der Expression einer Vielzahl proinflammatorischer Zytokine (z.B. [45]). Anhand der hier verwendeten humanen mononukleären Zellen sollte der LPS-stimulierte zeitliche Verlauf der TNF-α- und IL-6-Sekretion analysiert werden. Schon wenige Stunden nach der LPS-Stimulierung stieg die Sekretion von TNF-α stark an und ging in eine Plateauphase über. Die Sekretion von IL-6 hingegen stieg stetig mit der Zeit an und hatte nach 24 Stunden noch keine Plateauphase erreicht. Eventuell verläuft die Zytokin-Expression und -sekretion in LPS-stimulierten, humanen mononukleären Zellen über unterschiedliche, intrazelluläre Signalwege und führt so zu Differenzen im zeitlichen Verlauf.

Darüber hinaus wurde ein eventueller geschlechtsspezifischer Unterschied in der Zytokinsekretion untersucht. Die basale Zytokin-Konzentration lag nach Kultivierung für 24 Stunden zwischen 50 und 100 pg pro 10^6 Zellen. Nach LPS-Stimulierung für 24 Stunden betrug die TNF-α-Sekretion zwischen 1 und 10 ng pro 10^6 Zellen, die IL-6-Sekretion zwischen 5 und 50 ng pro 10^6 Zellen. Das Ergebnis der Untersuchungen zeigt, dass die Zytokinsekretion zwar in Abhängigkeit der verschiedenen Spender variierte, aber keine geschlechtsspezifischen Unterschiede aufwies, sowohl mit als auch ohne LPS-Stimulierung.
In Übereinstimmung mit dieser Arbeit konnte auch in LPS-stimulierten Maus-Makrophagen [46] und peritonealen Ratten-Makrophagen [47] kein geschlechtsspezifischer Unterschied in der TNF-α-Sekretion festgestellt werden. Die IL-1-Sekretion dagegen wurde in monozytären Zellen geschlechtsspezifisch moduliert. So

war die IL-1-Sekretion in LPS-stimulierten Makrophagen weiblicher Mäuse vierfach höher als in Makrophagen männlicher Mäuse [46]. Peritoneale Makrophagen weiblicher Ratten hatten eine höhere, nicht stimulierte IL-1-Sekretion als Zellen männlicher Ratten [47]. Außerdem berichten Lynch et al. [48], dass mononukleäre Zellen aus peripher-venösem Blut (*peripher blood mononuclear cells* = PBMCs) weiblicher Spender unter nicht stimulierten Bedingungen mehr IL-1 sezernieren als PBMCs männlicher Spender. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass nur bestimmte Zytokine geschlechtsspezifisch reguliert werden.

Um in den monozytären Zelllinien THP-1 und U937 eine deutliche Steigerung der Zytokinsekretion zu erreichen, musste die LPS-Konzentration erhöht und im Fall von U937 eine zusätzliche Behandlung mit *phorbol-myristate-acetate* (PMA) durchgeführt werden. THP-1 wurden mit 1 µg/ml LPS erfolgreich stimuliert, U937 mit einer Kombination aus 10 µg/ml LPS und 10 ng/ml PMA.
U937 lassen sich nicht durch LPS allein stimulieren, da sie den LPS-Rezeptor CD14 in undifferenziertem Zustand nicht exprimieren [49]. Die Arbeitsgruppe von Roberts et al. [50] zeigte, dass U937 Zellen durch Behandlung mit PMA sensitiv für die LPS-Stimulierung und die nachfolgende Zytokinsekretion werden. PMA allein bewirkte eine leichte Induktion von TNF-α. Eine zusätzliche Behandlung mit LPS steigerte die TNF-α-Expression und -Sekretion stark.

4.2 Untersuchungen zur Zytokinsekretion

Die folgenden Kapitel beschäftigen sich mit dem Einfluss der Steroidhormone Dexamethason, Testosteron, Östradiol, dem Secosteroid Calcitriol und dem Terpenoid Retinolsäure auf die Sekretion von TNF-α und IL-6. Dazu wurden mononukleäre Zellen männlicher und weiblicher Spender für 24 Stunden mit paralleler bzw. ohne LPS-Stimulierung und mit den oben aufgeführten Hormonen behandelt. Außerdem wurde eine Hormon-Vorbehandlung für 16 Stunden mit anschließender LPS-Stimulierung für acht Stunden durchgeführt, dies ermöglichte eine eventuelle Hormonwirkung, bevor die LPS-Stimulierung einsetzte (siehe Abb. 11).

4.2.1 Einfluss von Dexamethason

Glucocorticoide sind neben ihren vielfältigen metabolischen Funktionen gut bekannt für ihre starke immunsuppressive und entzündungshemmende Wirkung (Übersicht u.a. bei [51]). Sie senken die Aktivität und Bildung von Immunzellen und hemmen die Expression vieler Gene, die an der Entzündungsreaktion beteiligt sind, darunter Adhäsionsmoleküle, membranständige Rezeptoren und Zytokine (siehe z.B. [52]).

Der Erwartung entsprechend zeigte die Behandlung humaner mononukleärer Zellen mit Dexamethason in allen Versuchen eine starke signifikante Reduktion der Zytokinsekretion. Auch die Dexamethason-Behandlung der humanen monozytären Zelllinien THP-1 und U937 bewirkte eine signifikant reduzierte Zytokinsekretion.
In Übereinstimmung mit dieser Arbeit wurde in der Literatur eine Dexamethason-vermittelte reduzierte TNF-α- und IL-6-Sekretion in verschiedenen monozytären Zellen beschrieben (u.a. bei [53-57]).

Interessanterweise konnte in dieser Arbeit durch Dexamethason-Behandlung ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Zytokinsekretion nachgewiesen werden. Der Dexamethason-vermittelte reduzierende Einfluss auf die Sekretion von TNF-α und IL-6 war in mononukleären Zellen männlicher Spender stärker ausgeprägt als in mononukleären Zellen weiblicher Spender. Der Unterschied in der Zytokinsekretion konnte mit und ohne LPS-Stimulierung gezeigt werden und war signifikant ($P < 0,05$).
In der Literatur ist diese Problematik kaum untersucht. Eine Studie von Franchimont et al. [58] konnte, im Gegensatz zu dieser Arbeit, keinen geschlechtsspezifischen Unterschied in der Zytokinsekretion durch Dexamethason-Behandlung feststellen. Der entscheidende Unterschied lag hier wahrscheinlich im Modellsystem und in der Serum-Konzentration.

Zur Untersuchung eines eventuellen zelltoxischen Effekts wurde Dexamethason im MTS-Test eingesetzt. Dexamethason bewirkte in der verwendeten Konzentration von 100 nM eine leichte Reduktion der Zellvitalität (signifikant bei Zellen männlicher Spender), welche allerdings nicht im Verhältnis zu der stark ausgeprägten reduzierten Zytokinsekretion steht. Auch in Alveolar-Makrophagen [59] und U937 [60] beeinträchtigte Dexamethason die Zellvitalität. Dieser Effekt war allerdings erst ab einer Dexamethason-Konzentration von 2,5 µM [59] bzw. 20 µM [60] signifikant.

Das Ergebnis dieser Arbeit deutet darauf hin, dass die antiinflammatorische Wirkung von Dexamethason möglicherweise bei Männern stärker ausgeprägt ist als bei Frauen. Ob dieses Ergebnis relevant für die therapeutische Anwendung von Glucocorticoiden ist, müsste in weiteren Studien geklärt werden.

4.2.2 Einfluss von Sexualhormonen

Experimentelle und klinische Studien deuten darauf hin, dass die Immunantwort bei Frauen stärker ausgeprägt ist als bei Männern. So haben Frauen einen höheren Antikörperspiegel und bilden als Antwort auf Infektionen größere Antikörpermengen als Männer. Außerdem haben Frauen ein höheres Risiko für Autoimmunerkrankungen. So ist die Wahrscheinlichkeit z.B. an rheumatoider Arthritis zu erkranken bei Frauen viermal größer als bei Männern (siehe z.B. [61]). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Sexualhormone möglicherweise eine wichtige Rolle in der Regulierung der Immunantwort spielen (zur Vertiefung siehe z.B. Olsen et al. [38] und Ackerman et al. [62]).

Allerdings konnte in dieser Arbeit kein signifikanter Einfluss von Testosteron und Östradiol auf die Zytokinsekretion in mononukleären Zellen männlicher und weiblicher Spender festgestellt werden. Auch eine Variation der gewählten Versuchsbedingungen im zeitlichen Ablauf und in der Hormon-Konzentration zeigte keinen Einfluss der Sexualhormone auf die TNF-α- und IL-6-Sekretion.

In der Literatur wird der Einfluss von Androgenen auf die TNF-α-Sekretion in monozytären Zellen uneinheitlich beschrieben. In Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit zeigte Testosteron keinen Einfluss auf die TNF-α-Sekretion in nicht stimulierten Knochenmark-Makrophagen der Maus [63] und in einer nicht stimulierten Gesamtblut-Kultur weiblicher Spender [64]. Auch eine Testosteron-Vorbehandlung mit anschließender LPS-Stimulierung hatte keinen Einfluss auf die TNF-α-Sekretion in Knochenmark-Makrophagen der Maus [63]. Im Gegensatz dazu wurde in einigen anderen Studien eine Androgen-vermittelte reduzierte TNF-α-Sekretion beschrieben (Übersicht z.B. bei [65]). So ergab die Testosteron-Behandlung einen tendenziell reduzierenden Einfluss auf die TNF-α-Sekretion in Ratten-Makrophagen [66].

Dehydroepiandrosteron (DHEA) reduzierte die TNF-α-Sekretion in Maus-Makrophagen [67] und in einer *in vivo* Studie mit Mäusen [68].
Im Gegensatz zur Regulierung der TNF-α-Sekretion beschäftigen sich nur wenige Studien mit dem Einfluss von Sexualhormonen, Calcitriol und Retinolsäure auf die IL-6-Sekretion.
Die Testosteron-Behandlung hatte in Übereinstimmung mit dieser Arbeit keinen Einfluss auf die IL-6-Sekretion in LPS-stimulierten, humanen PBMCs [69]. Dagegen reduzierte Testosteron die IL-6-Sekretion in nicht stimulierten Monozyten männlicher Spender [70].

Auch der Einfluss von Östrogenen auf die TNF-α-Sekretion in monozytären Zellen wird kontrovers diskutiert. In Übereinstimmung mit dieser Arbeit hatte Östradiol keinen Einfluss auf die TNF-α-Sekretion in LPS-stimulierten Monozyten weiblicher und männlicher Spender [71], sowie auf die TNF-α-Sekretion in nicht stimulierten Monozyten weiblicher Spender [72]. Dagegen stimulierte Östradiol die TNF-α-Sekretion z.B. in LPS-stimulierten, humanen PBMCs [73] und in nicht stimulierten Monozyten weiblicher Spender (Kramer 2004). Auch eine Östradiol-vermittelte reduzierte TNF-α-Sekretion wurde in monozytären Zellen beschrieben. Dazu zählen z.B. die Arbeiten von Deshpande et al. [74] und Rogers et al. [72], die mit LPS-stimulierten Milz-Makrophagen aus Mäusen und mit nicht stimulierten, humanen Monozyten arbeiteten.
Studien, die sich mit dem Einfluss von Östradiol auf die IL-6-Sekretion beschäftigten, zeigten sowohl einen stimulierenden (z.B. [73] [69]) als auch einen reduzierenden (z.B. [74]) Einfluss.

In der hier eingesetzten humanen monozytären Zelllinie THP-1 hatte die Behandlung mit Testosteron und Östradiol keinen signifikanten Effekt auf die LPS-stimulierte Zytokinsekretion. Dagegen bewirkte die Testosteron- und Östradiol-Behandlung der humanen monozytären Zelllinie U937 eine signifikante Reduktion der LPS- und PMA-stimulierten Zytokinsekretion. In der Literatur wird anhand von PMA-stimulierten U937 eine Östradiol-vermittelte Aktivierung der TNF-α-Sekretion beschrieben, Testosteron dagegen hatte keinen Einfluss [75]. Die unterschiedliche Regulierung der U937 Zelllinie war vermutlich hauptsächlich vom eingesetzten Stimulus abhängig.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Wirkung von Sexualhormonen auf die TNF-α- und IL-6-Sekretion in monozytären Zellen kontrovers diskutiert wird. Zwar berichten die Mehrzahl der Studien über einen reduzierenden Einfluss von Testosteron und Östradiol auf die TNF-α-und IL-6-Sekretion (Übersicht u.a. bei [65, 76]), allerdings konnte dieser Effekt in den hier verwendeten humanen mononukleären Zellen nicht bestätigt werden. Daraus wird deutlich, dass die Regulierung der Zytokinsekretion durch Sexualhormone von verschiedenen Faktoren abhängt. Die oben aufgeführten Studien deuten darauf hin, dass das Modellsystem (z.B. Spezies, Zelltyp) und die Stimulierung (z.B. LPS-, PMA- oder nicht stimuliert) eine entscheidende Rolle spielen. Im Fall der Östradiol-Behandlung scheint insbesondere die eingesetzte Hormon-Konzentration von Bedeutung zu sein (siehe z.B. [77, 78]).

Über den Aspekt der Zytokinsekretion hinaus wird auch der Einfluss von Sexualhormonen auf das Immunsystem kontrovers diskutiert (siehe z.B. Straub et al. [76] und Bouman et al. [79]), wobei überwiegend die Meinung vertreten wird, das Östrogene immunstimmulierend und Androgenen immunsuppressiv wirken (siehe z.B. Fimmel et al. [80] und Cutolo et al. [81]).

4.2.3 Einfluss von Calcitriol

Neben der wichtigen Rolle von Calcitriol im Knochen-Metabolismus und in der Calcium-Homöostase, beeinflusst Calcitriol viele Funktionen des Immunsystems. Calcitriol hemmt z.B. die T-Zellaktivierung und beeinflusst die Reifung, Differenzierung und Migration von Antigen-präsentierenden Zellen, wie Monozyten, Makrophagen und dentritischen Zellen. Aufgrund seiner immunmodulatorischen Eigenschaften wird Calcitriol erfolgreich in der Therapie verschiedener Hautkrankheiten und Krebs eingesetzt (zur Vertiefung siehe z.B. May et al. [39] und Deluca et al. [82]).

In dieser Arbeit wurde die Zytokinsekretion durch Calcitriol uneinheitlich reguliert und zeigte deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede (Tabelle 5). So bewirkte die Behandlung mononukleärer Zellen männlicher Spender mit Calcitriol und LPS eine leichte, aber signifikante Reduktion der TNF-α und IL-6-Sekretion. Ohne LPS-Stimulierung hatte Calcitriol keinen Einfluss auf die Zytokinsekretion.

In mononukleären Zellen weiblicher Spender wurde die LPS-stimulierte TNF-α-Sekretion unterschiedlich reguliert: 100 pM und 1 nM Calcitriol hatten keinen Effekt, 10 und 100 nM Calcitriol reduzierten und 1 µM Calcitriol aktivierte die TNF-α-Sekretion. Die LPS-stimulierte IL-6-Sekretion wurde in Zellen weiblicher Spender nicht beeinflusst. Ohne LPS-Stimulierung hatte Calcitriol in Zellen weiblicher Spender keinen signifikanten Einfluss auf die TNF-α-Sekretion, aber reduzierte die IL-6-Sekretion.
Die Calcitriol-Vorbehandlung mit anschließender LPS-Stimulierung ergab in Zellen männlicher Spender keinen Einfluss auf die TNF-α-Sekretion und reduzierte die TNF-α-Sekretion in Zellen weiblicher Spender. Die IL-6-Sekretion wurde durch Calcitriol-Vorbehandlung in Zellen männlicher und weiblicher Spender aktiviert.
Die Calcitriol-Behandlung zeigte im MTS-Test keinen Einfluss auf die Zellvitalität. Dementsprechend kann ein zelltoxischer Effekt von Calcitriol ausgeschlossen werden.

Tabelle 5: Der Einfluss von Calcitriol auf die TNF-α- und IL-6-Sekretion in mononukleären Zellen männlicher und weiblicher Spender ist uneinheitlich. (↔) kein Effekt; (↓) signifikant reduzierend; (↑) signifikant aktivierend; (↑↓) konzentrationsabhängig aktivierend oder reduzierend.

	Behandlung mit Calcitriol					
mononukleäre Zellen	mit LPS		ohne LPS		Vorbehandlung	
	TNF-α	IL-6	TNF-α	IL-6	TNF-α	IL-6
männlicher Spender	↓	↓	↔	↔	↔	↑
weiblicher Spender	↑↓	↔	↔	↓	↓	↑

Auch in der Literatur wird der Einfluss von Calcitriol auf die TNF-α-Sekretion uneinheitlich beschrieben. In Übereinstimmung mit dieser Arbeit zeigten alle gefundenen Literaturbeispiele, in welchen monozytäre Zellen mit Calcitriol und LPS behandelt wurden, einen reduzierenden Einfluss auf die TNF-α-Sekretion. Darunter Studien mit humanen Monozyten [83], humanen PBMCs [84-87] und peritonealen Makrophagen [88]. Auch in klinischen Studien konnte durch Calcitriolgabe eine reduzierte TNF-α-Sekretion in isolierten PBMCs beobachtet werden [89].

Die Calcitriol-Behandlung ohne LPS-Stimulierung hatte in den hier verwendeten mononukleären Zellen männlicher Spender keinen Einfluss auf die Zytokinsekretion. Auch in nicht stimulierten, peritonealen Makrophagen konnte durch Calcitriol-Behandlung kein Einfluss auf die TNF-α-Sekretion festgestellt werden [90].
Die Methode der Calcitriol-Vorbehandlung bewirkte eine uneinheitliche Regulierung der TNF-α-Sekretion in den hier verwendeten humanen mononukleären Zellen. Auch in der Literatur wird der Einfluss der Calcitriol-Vorbehandlung in monozytären Zellen kontrovers diskutiert. So hatte die Calcitriol-Vorbehandlung einen aktivierenden Einfluss auf die TNF-α-Sekretion z.B. in Knochenmark-Makrophagen aus Mäusen [90]. Dagegen wurde ein reduzierender Effekt durch Calcitriol-Vorbehandlung in humanen Monozyten [91] und in humanen peritonealen Makrophagen [92] beschrieben. Diese entgegengesetzte Wirkung lässt sich u.a. durch Unterschiede im methodischen Design erklären. Die Calcitriol-Vorbehandlung für mindestens drei bis vier Tage aktivierte die TNF-α-Sekretion [90, 93]. Die Calcitriol-Vorbehandlung für ca. 16 Stunden reduzierte die TNF-α-Sekretion [91, 92]. Auch in dieser Arbeit wurde die TNF-α-Sekretion durch Calcitriol-Vorbehandlung für 16 Stunden in mononukleären Zellen weiblicher Spender reduziert, allerdings konnte dieser Effekt in Zellen männlicher Spender nicht bestätigt werden.

Wie bereits erwähnt berichten wesentlich weniger Studien über einen Einfluss von Calcitriol auf die IL-6-Sekretion. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit wurden auch in der Literatur uneinheitliche Effekte von Calcitriol auf die IL-6-Sekretion gefunden. So reduzierte Calcitriol die IL-6-Sekretion in LPS-stimulierten, humanen PBMCs [85] und humanen Monozyten [83]. Die Behandlung humaner PBMCs mit Calcitriol und Stimulierung mit Con A hatte keinen Einfluss auf die IL-6-Sekretion [94]. Die Calcitriol-Vorbehandlung bewirkte in humanen Monozyten eine konzentrationsabgängige Aktivierung oder Reduktion der IL-6-Sekretion [95]. Auch in klinischen Studien war der Einfluss von Calcitriol auf die IL-6-Sekretion uneinheitlich: Anhand von PBMCs gesunder Spender wurde sowohl eine Calcitriol-vermittelte reduzierte IL-6-Sekretion [89] als auch kein Einfluss auf die IL-6-Sekretion [96] gezeigt.

In den hier eingesetzten monozytären Zelllinien THP-1 hatte die Calcitriol-Behandlung keinen Effekt auf die TNF-α-Sekretion und aktivierte bzw. reduzierte die IL-6-

Sekretion konzentrationsabhängig. Dagegen ergab die Calcitriol-Behandlung in U937 eine einheitlich aktivierte TNF-α- und IL-6-Sekretion. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis zeigten Öberg et al. [49] und Taimi et al. [97] in U937 eine Calcitriol-vermittelte aktivierte IL-6-Sekretion.

Insgesamt konnte die Wirkung von Calcitriol auf die Zytokinsekretion in monozytären Zellen bisher nicht vollständig geklärt werden. Die Mehrzahl der Studien, in denen monozytäre Zellen mit Calcitriol und LPS behandelt wurden, zeigte jedoch eine reduzierte TNF-α- und IL-6-Sekretion, welche anhand mononukleärer Zellen männlicher Spender bestätigt werden konnte. Über die Zytokinsekretion hinaus deuten auch klinische Studien auf einen eher immunsuppressiven Nettoeffekt von Calcitriol hin (Übersicht z.B. bei Brown et al. [98]).
Interessanterweise zeigte die Calcitriol-Behandlung der hier verwendeten humanen mononukleären Zellen geschlechtsspezifische Unterschiede in der Regulierung der Zytokinsekretion. Speziell über eine geschlechtsspezifische Regulierung des Immunsystems durch Calcitriol sind noch keine Literaturbefunde bekannt. Allerdings beschreiben zahlreiche Studien, wie bereits erwähnt, allgemeine geschlechtsabhängige Unterschiede in der Immunantwort (siehe z.B. Ackerman et al. [62]). Außerdem scheint das Geschlecht einen Einfluss auf die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik zu haben (Übersicht z.B. bei Schwartz et al. [99]). Deshalb wären weitere Studien über eine eventuelle geschlechtsspezifische Regulierung der Immunantwort durch Calcitriol sehr interessant.

4.2.4 Einfluss von Retinolsäure

Retinolsäure ist essentiell für viele nicht visuelle Funktionen der Retinoide, darunter das Wachstum und die Differenzierung von Epithelgewebe. Außerdem ist Retinolsäure von Bedeutung für die optimale Funktion des Immunsystems. So beeinflusst Retinolsäure in Monozyten z.B. die phagozytäre Aktivität, die Chemotaxis, die Expression von Zelloberflächenmarkern und die Zytokinsekretion (siehe z.B. [100]). In Monozyten und anderen Zielzellen wirkt Retinolsäure wachstumshemmend und differenzierungsfördernd. Aufgrund dieser Funktionen und der vermutlich antiinflammatorischen Eigenschaften werden natürliche und synthetische Retinoide, vergleichbar mit

Calcitriol, erfolgreich in der Therapie verschiedener Hautkrankheiten und Krebs eingesetzt (Übersicht z.B. bei Reifen et al. [40] und Zouboulis et al. [101]).

In dieser Arbeit wurden die Retinolsäure-Derivate all-*trans*-Retinolsäure und 9-*cis*-Retinolsäure verwendet, welche hauptsächlich für die Wirkung von Retinolsäure verantwortlich sind. All-*trans*-Retinolsäure und 9-*cis*-Retinolsäure binden an den Retinolsäure-Rezeptor (RAR). 9-*cis*-Retinolsäure, aber nicht all-*trans*-Retinolsäure, bindet an den Retinoid X-Rezeptor (RXR). RAR und RXR regulieren als Homo- oder Heterodimere die Genexpression. Als Heterodimer-Partner kommen auch andere nukleäre Rezeptoren in Frage: darunter der Vitamin-D-Rezeptor (VDR), der Östrogen-Rezeptor (ER) und der Thyroid-Rezeptor (T3R) (Übersicht z.B. bei [14, 15]).

In den hier verwendeten mononukleären Zellen männlicher und weiblicher Spender hatte Retinolsäure einen überwiegend reduzierenden Einfluss auf die Zytokinsekretion (Tabelle 6). Die Retinolsäure-Behandlung mit und ohne LPS-Stimulierung reduzierte die TNF-α- und IL-6-Sekretion konzentrationsabhängig. Dieser Retinolsäure-Effekt war bereits im Bereich der physiologischen Retinolsäure-Konzentration signifikant und wurde durch supraphysiologische Konzentrationen noch verstärkt.
Auch die Retinolsäure-Vorbehandlung mit anschließender LPS-Stimulierung reduzierte die TNF-α-Sekretion konzentrationsabhängig und signifikant. Im Gegensatz dazu wurde die IL-6-Sekretion in mononukleären Zellen männlicher Spender durch Retinolsäure aktiviert und in mononukleären Zellen weiblicher Spender konzentrationsabhängig reduziert (100 pM 9-cis-Retinolsäure) bzw. aktiviert (1 µM all-*trans*- und 9-*cis*-Retinolsäure).

Um einen eventuellen toxischen Effekt durch Retinolsäure auf die Zellkultur auszuschließen, wurden MTS-Tests durchgeführt. Beide Retinolsäure-Metabolite hatten in den hier verwendeten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Zellvitalität von mononukleären Zellen männlicher und weiblicher Spender. Demnach ist die Retinolsäure-vermittelte reduzierte Zytokinsekretion ein spezifischer Effekt und nicht durch einen zelltoxischen Effekt ausgelöst. Auch in humanen Mikroglia-Zellen [102] und Ratten-PBMCs [103] beeinträchtigte eine Retinolsäure-Behandlung bis zu einer Konzentration von 3 µM die Zellvitalität nicht. Erst ab einer Konzentration von 10 µM wirkte Retinolsäure zelltoxisch [103].

Tabelle 6: Retinolsäure zeigte einen überwiegend reduzierenden Einfluss auf die TNF-α- und IL-6-Sekretion in mononukleären Zellen männlicher und weiblicher Spender.
(↔) kein Effekt; (↓) signifikant reduzierend; (↑) signifikant aktivierend; (↑↓) konzentrationsabhängig aktivierend oder reduzierend.

	Behandlung mit all-*trans*- bzw. 9-*cis*-Retinolsäure					
mononukleäre Zellen	mit LPS		ohne LPS		Vorbehandlung	
	TNF-α	IL-6	TNF-α	IL-6	TNF-α	IL-6
männlicher Spender	↓	↓	↓	↓	↓	↑
weiblicher Spender	↓	↓	↓	↓	↓	↓↑

Unter allen in dieser Arbeit durchgeführten Versuchsbedingungen reduzierte Retinolsäure die TNF-α-Sekretion. In der Literatur wird der Einfluss von Retinolsäure auf die TNF-α-Sekretion in monozytären Zellen uneinheitlich beschrieben: So aktivierte Retinolsäure die TNF-α-Sekretion in nicht stimulierten, humanen PBMCs [104, 105]. Retinolsäure hatte keinen Einfluss auf die TNF-α-Sekretion in nicht stimulierten, humanen Monozyten [106] und in LPS-stimulierten, humanen Monozyten nach Hormon-Vorbehandlung [107]. Allerdings berichtet die Mehrzahl der Studien, wie diese Arbeit, über einen reduzierenden Einfluss auf die TNF-α-Sekretion. So bewirkte die parallele Behandlung mit Retinolsäure und LPS eine reduzierte TNF-α-Sekretion in Ratten-PBMCs [103], Ratten-Leber-Makrophagen [108], Ratten-Kupffer-Zellen [109, 110], Maus-Makrophagen [88] und humanen Mikroglia-Zellen [102]. Ohne LPS-Stimulierung konnte eine Retinolsäure-vermittelte reduzierte TNF-α-Sekretion in Ratten-Makrophagen [111] und Maus-Makrophagen [88] gezeigt werden. Auch durch Retinolsäure-Vorbehandlung wurde die TNF-α-Sekretion z.B. in Ratten-PBMCs reduziert [103].

Die IL-6-Sekretion wurde in dieser Arbeit durch die Retinolsäure-Behandlung mit und ohne LPS-Stimulierung reduziert. Auch in der Literatur wurde schon mehrfach ein reduzierender Einfluss von Retinolsäure auf die IL-6-Bildung und -Sekretion beschrieben. So reduzierte Retinolsäure die IL-6-Transkriptmenge z.B. in humanen Monozyten [100] und Ratten-Makrophagen [108]. Auf Proteinebene reduzierte Retinolsäure die IL-6-Sekretion z.B. durch Behandlung mit 13-*cis*-Retinolsäure in nicht stimulierten Ratten-

Makrophagen [111]. Allerdings konnte in nicht stimulierten, humanen Mikroglia-Zellen keine Regulation der IL-6-Sekretion festgestellt werden [102].
Die Retinolsäure-Vorbehandlung ergab in den hier verwendeten humanen mononukleären Zellen eine überwiegend aktivierte IL-6-Sekretion. Dagegen berichten Gross et al. [100] anhand humaner PBMCs, dass die Retinolsäure-Vorbehandlung nach drei Tagen keinen und nach neun Tagen einen reduzierenden Einfluss auf die IL-6-Sekretion hatte. Der entscheidende Unterschied von dieser Arbeit und der Studie von Gross et al. [100] liegt wahrscheinlich im methodischen Design und in der Zelldifferenzierung.

Die Behandlung der monozytären Zelllinie THP-1 mit Retinolsäure und LPS hatte keinen Einfluss auf die TNF-α-Sekretion. Auch Oeth et al. [107] konnten in LPS-stimulierten THP-1 keinen Einfluss von Retinolsäure auf die TNF-α-Sekretion finden. Dagegen wurde in der murinen Makrophagen-Zelllinie J774 ein reduzierender Effekt durch Retinolsäure und LPS beschrieben [112].
Die Behandlung der monozytären Zelllinie U937 mit Retinolsäure aktivierte die TNF-α-Sekretion. Im Gegensatz dazu beobachteten Mou et al. [113] in U937 eine reduzierte TNF-α-Sekretion. In diesem Fall liegt der Hauptunterschied im verwendeten Stimulus. Hier wurde als Stimulus eine Kombination aus LPS und PMA verwendet, Mou et al. [113] setzten den pflanzlichen Stimulus Phytohemagglutinin (PHA) ein.

Zusammenfassend beschreiben die Mehrzahl der Literaturbefunde und die Mehrzahl der Ergebnisse dieser Arbeit eine Retinolsäure-vermittelte reduzierte TNF-α- und IL-6-Sekretion. In dieser Arbeit konnte der reduzierende Einfluss von Retinolsäure auf die TNF-α-Sekretion erstmals in humanen mononukleären Zellen gezeigt werden. Ein deutlicher geschlechtsspezifischer Unterschied in der Zytokinsekretion wie bei Dexamethason wurde durch Retinolsäure-Behandlung nicht beobachtet.
Andere Studien berichten über eine Aktivierung oder auch über keine Beeinflussung der Zytokinsekretion durch Retinolsäure. Diese uneinheitliche Regulierung verdeutlicht die wichtige Rolle des Modellsystems und des methodischen Designs für den Retinolsäure-Effekt. So variieren die eingesetzten Modellsysteme in der Spezies (z.B. Mensch oder Maus), im Zelltyp (z.B. PBMCs, Monozyten, Gewebemakrophagen, monozytäre Zelllinien), im Differenzierungsstatus (z.B. undifferenzierte Monozyten oder differenzierte Gewebemakrophagen), den exprimierten Rezeptoren (z.B. RAR, RXR) und Dimerisierungspartnern (z.B. ER oder VDR). Darüber hinaus ist das Geschlecht der

Zell-Spender entscheidend für den Retinolsäure-Effekt, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde. Allerdings blieb dieser Aspekt in der Literatur weitgehend unberücksichtigt.
Das methodische Design variiert u.a. im eingesetzten Retinolsäure-Derivat (all-*trans*-, 9-*cis*- oder 13-*cis*-Retinolsäure), der Retinolsäure-Konzentration, der Behandlungszeit und dem Versuchsablauf (z.B. mit oder ohne Vorbehandlung). Von besonderer Bedeutung ist sicherlich die Stimulierung (z.B. LPS, PMA oder ohne Stimulus).
Trotz der überwiegend reduzierenden Wirkung von Retinolsäure auf die Zytokinsekretion monozytärer Zellen, bleibt der Einfluss von Retinolsäure auf die Zytokinsekretion *in vivo* und auf die gesamte Inflammation noch offen. Ein erster Anhaltspunkt für einen antiinflammatorischen Effekt *in vivo* findet sich z.B. bei Nozaki et al. [114]. Dies wäre eine sehr interessante Grundlage für weiterführende Studien.

In den nachfolgenden Kapiteln soll ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit diskutiert werden: der Einfluss von Retinolsäure auf die Signaltransduktion der LPS-stimulierten TNF-α-Sekretion.

4.3 Untersuchungen zur Signaltransduktion

Die Bildung und Sekretion von TNF-α wird durch viele verschiedene Mechanismen der Signaltransduktion streng reguliert. Diese Mechanismen dienen u.a. der Kontrolle der Expression, der mRNA- und Protein-Stabilität, sowie der Sekretion von TNF-α (siehe z.B. [115-117]).
Ein Einfluss von Retinolsäure auf die TNF-α-Bildung ist prinzipiell auf verschiedenen Ebenen der Signaltransduktion möglich (Abb. 26). Hierzu sind aus der Literatur bereits einige Beispiele in unterschiedlichen Modellsystemen bekannt. So zeigten z.B. Landis et al. [106] eine posttranslationale Regulation der TNF-α-Proteinmenge in humanen Monozyten. Retinolsäure modulierte die TNF-α-mRNA-Stabilität z.B. in humanen Knochenmark-Makrophagen [108] und Leber-Makrophagen aus Ratten [118]. Über eine transkriptionale Regulation wurde z.B. in Ratten-Kupffer-Zellen berichtet [110]. Retinolsäure regulierte verschiedene intrazelluläre Signalwege, welche zur Aktivierung der TNF-α-Transkription führten, darunter den NFκB-Signalweg [119, 120], den AP-1-Signalweg [121, 122] und die MAP-Kinase-Signalwege [122-125]. Auf welchem intra-

zellulären Signalweg der Retinolsäure-Effekt tatsächlich vermittelt wird, ist wahrscheinlich hauptsächlich vom Modellsystem abhängig.
Zu dieser Schlussfolgerung kommt auch eine Studie von Means et al. [126], welche anhand unterschiedlicher humaner Gewebemakrophagen zeigten, dass die Regulierung der TNF-α-Transkription in Abhängigkeit vom Zelltyp über unterschiedliche intrazelluläre Signalwege verläuft.

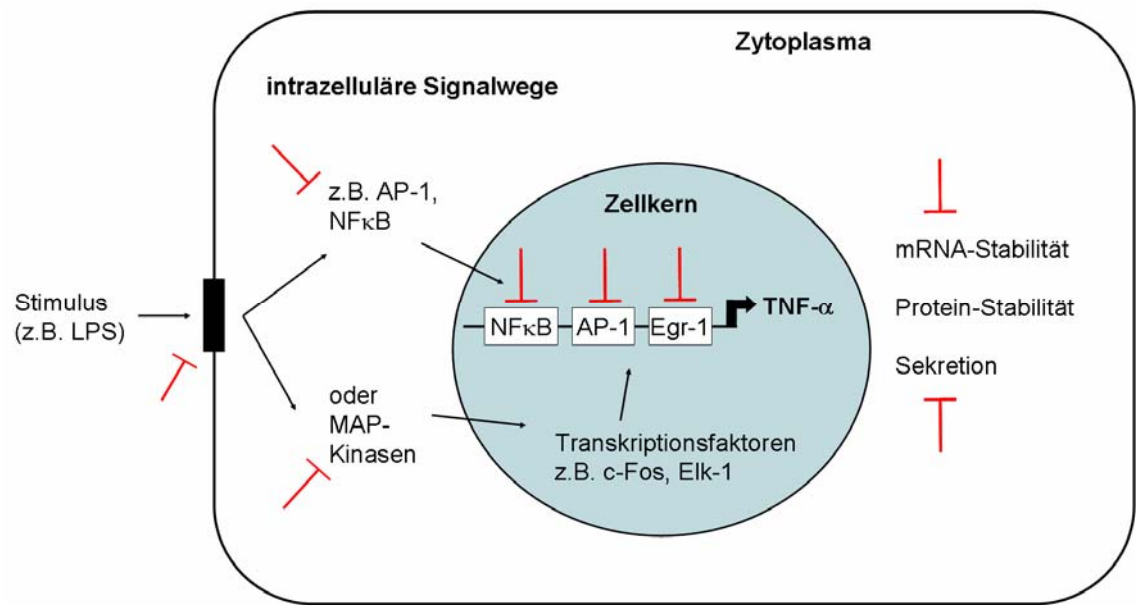


Abbildung 26: Möglicher Einfluss von Retinolsäure auf die verschiedenen Ebenen der Signaltransduktion, welche zur Aktivierung der TNF-α-Expression und -Sekretion führen. Die roten Zeichen stellen mögliche Angriffspunkte für Retinolsäure dar.

4.3.1 Einfluss von Retinolsäure auf die Transkriptmenge von TNF-α

Wie gerade beschrieben ist eine Interaktion von Retinolsäure mit verschiedenen zellulären Ebenen der Signaltransduktion möglich. Daher stellt sich die Frage: Welchen Einfluss übt Retinolsäure auf die Signaltransduktion speziell in humanen mononukleären Zellen aus? Zur Aufklärung dieser Frage sollte zunächst untersucht werden, ob die Retinolsäure-vermittelte reduzierte TNF-α-Sekretion bereits auf Transkriptebene beobachtet werden kann. Tatsächlich bewirkte die Behandlung mit 100 nM und 1 µM

all-*trans*-Retinolsäure eine signifikante Reduktion der LPS-stimulierten TNF-α-Transkriptmenge. Dieses Ergebnis legt nahe, dass insbesondere die Transkriptebene für den Retinolsäure-Effekt von Bedeutung ist.
In der Literatur wird der Einfluss von Retinolsäure auf die TNF-α-Transkriptmenge in monozytären Zellen uneinheitlich beschrieben. In Übereinstimmung mit dieser Arbeit reduzierte Retinolsäure die TNF-α-mRNA-Menge z.B. in THP-1 und mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut [127]. Dagegen berichten z.B. Mathew et al. [112] über eine aktivierte TNF-α-Transkriptmenge in der murinen Makrophagen-Zelllinie J774.

Die Transkriptmenge wird nicht nur durch die RNA-Neusynthese, sondern auch durch den RNA-Abbau reguliert. Die Behandlung der hier verwendeten humanen mononukleären Zellen mit Actinomycin D bewirkte einen zeitabhängigen, kontinuierlichen Abbau der TNF-α-mRNA. Die zusätzliche Behandlung mit Retinolsäure hatte keinen Einfluss auf den RNA-Abbau und dementsprechend ebenfalls nicht auf die RNA-Stabilität.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen lässt vermuten, dass nicht der RNA-Abbau sondern die RNA-Neusynthese für den Retinolsäure-Effekt entscheidend ist. Folglich scheint der Einfluss von Retinolsäure auf die TNF-α-Transkription und auf vorgeschaltete Signalwege eine wichtige Rolle zu spielen.

4.3.2 Einfluss von Retinolsäure auf die Aktivität von MAP-Kinasen

Der Mechanismus der LPS-stimulierten, intrazellulären Signaltransduktion wurde in monozytären Zellen bereits detailliert untersucht (Abb. 27, eine Übersicht findet sich z.B. bei Guha et al. [128]). Im Blut bildet LPS einen Komplex mit dem Lipopolysaccharid-bindenden Protein (LBP) und interagiert mit dem monozytären membranständigen Rezeptor CD14 (z.B. [129]). Das LPS-Signal wird an den transmembranen Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) übertragen (z.B. [130]) und aktiviert eine Vielzahl intrazellulärer Signalwege, darunter den NFκB-Signalweg und die MAP-Kinase-Signalwege. Diese Signalwege münden in der Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren und nukleärer Faktoren, z.B. NFκB und AP-1, welche die Transkription entzündungsabhängiger Gene regulieren.

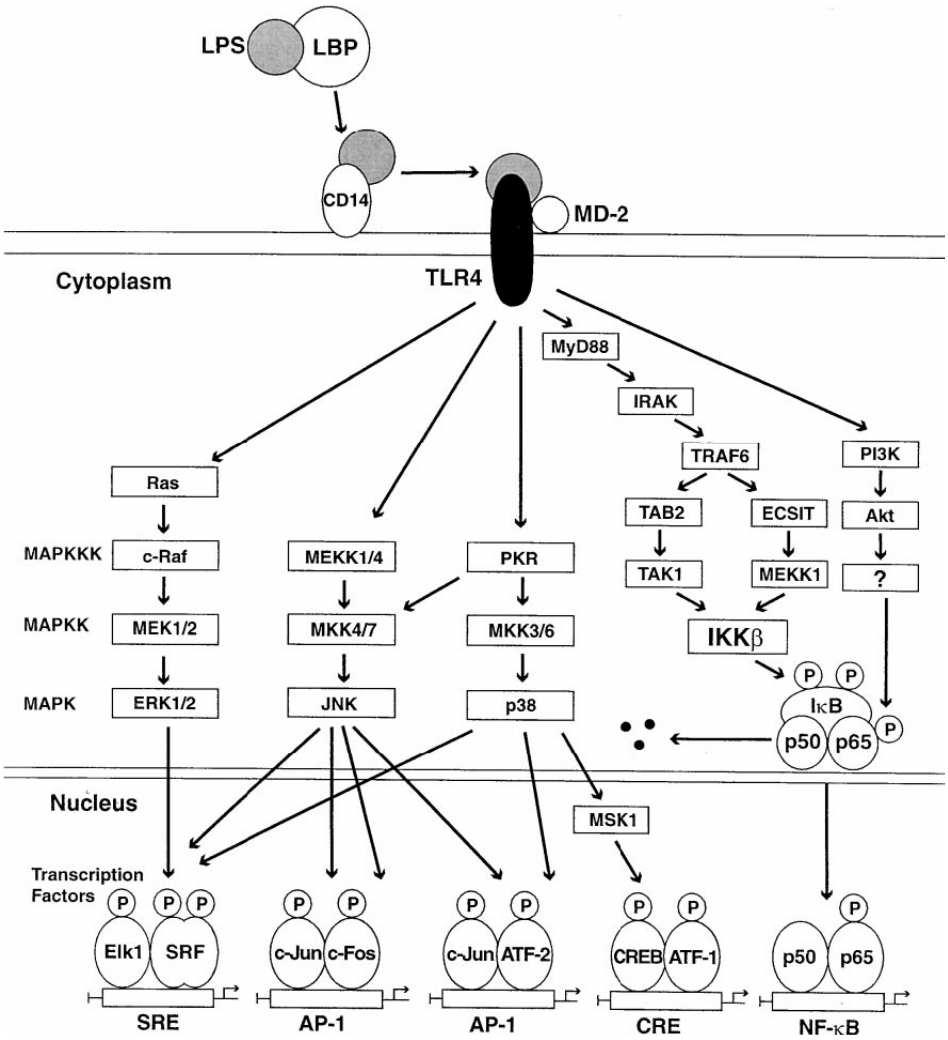


Abbildung 27: Die LPS-Stimulierung von Monozyten aktiviert verschiedene intrazelluläre Signalwege und Transkriptionsfaktoren. LPS bindet an das Serumprotein LBP und interagiert mit dem monozytären membranständigen Rezeptor CD14. Daraufhin wird das LPS-Signal an den transmembranen Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) und das MD-2 Protein übertragen und aktiviert eine Vielzahl intrazellulärer Signalwege. LPS stimuliert die Aktivierung der drei MAP-Kinase-Signalwege ERK, JNK und p38. Diese Signalwege phosphorylieren und aktivieren direkt oder indirekt verschiedene Transkriptionsfaktoren, darunter Elk-1, c-Jun, c-Fos, ATF-1, ATF-2, SRF und CREB. Außerdem aktiviert LPS den IKK-Signalweg über MyD88, IRAK, und TRAF6. TAK1-TAB2 und MEKK1-ECSIT-Komplexe phosphorylieren IKKβ, welches wiederum IκBs phosphoryliert. Die daraus resultierende Degradation von IκBs ermöglicht die Translokation von NFκB/Rel-Komplexen (z.B. p50/p65) in den Zellkern. Der PI3K-Signalweg phosphoryliert und aktiviert p65 über eine unbekannte Kinase; aus [128].

Dementsprechend ist die LPS-stimulierte TNF-α-Expression abhängig von speziellen intrazellulären Signalwegen. Viele Studien beschäftigen sich mit der Kontrolle der LPS-stimulierten TNF-α-Transkription, wobei speziell in monozytären Zellen über verschiedene, teilweise widersprüchliche Ergebnisse berichtet wird. So vermuten z.B. Udalova et al. [131] und Swantek et al. [132], dass der NFκB-Signalweg wichtig ist für die Regulation der TNF-α-Expression. Andere Literaturbefunde sprechen gegen eine vorherrschende Funktion von NFκB (z.B. [108, 133]).
In den letzten Jahren wurde insbesondere den MAP-Kinase-Signalwegen eine wichtige Rolle in der Signalweiterleitung in monozytären Zellen zugeschrieben. So konnte in humanen, monozytären Zellen gezeigt werden, dass LPS alle drei MAP-Kinase Signalwege stimuliert (z.B. [134, 135]), wobei die Aktivierung von p38 und ERK dominierte [136]. Der Einsatz von Inhibitoren des ERK-, p38- bzw. JNK-Signalwegs bewirkte eine deutliche Reduktion der TNF-α-Sekretion (z.B. [137]). Interessanterweise ergab die Kombination von ERK- und p38-Inhibitoren, auch ohne zusätzliche Inhibition von JNK, eine vollständige Hemmung der TNF-α-Sekretion [138-140]. Folglich scheinen insbesondere die MAP-Kinasen ERK und p38 für die LPS-stimulierte TNF-α-Sekretion wichtig zu sein. Deshalb sollte in dieser Arbeit der Einfluss von Retinolsäure auf die ERK- und p38-Aktivität in humanen mononukleären Zellen untersucht werden.

Zuerst wurde der zeitliche Verlauf der LPS-stimulierten MAP-Kinase-Aktivität analysiert. In den hier verwendeten humanen mononukleären Zellen bewirkte die LPS-Stimulierung für 15 und 30 Minuten eine starke Induktion der ERK- und p38-Aktivität. Nach LPS-Stimulierung für 60 Minuten nahm die MAP-Kinase-Aktivität wieder deutlich ab. Ein vergleichbarer zeitlicher Aktivierungsverlauf von ERK und p38 wurde z.B. in humanen Monozyten [140] und der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 [134] beobachtet. Demnach ist die LPS-stimulierte ERK- und p38-Aktivierung ein relativ schneller und kurzfristiger Vorgang.
Nachdem die optimale Behandlungszeit für LPS bestimmt war, sollte ein eventueller Einfluss von Retinolsäure auf die ERK- und p38-Aktivität untersucht werden. Western Blot-Analysen zeigten, dass die p38-Aktivität durch Retinolsäure-Behandlung nicht reguliert wurde. Weder eine langfristige Retinolsäure-Vorbehandlung für 16 Stunden mit anschließender LPS-Stimulierung, noch eine relativ kurzzeitige parallele Behandlung für 30 Minuten mit Retinolsäure und LPS hatten einen Einfluss auf die p38-Aktivität.

Vergleichbar mit p38, wurde die ERK-Aktivität durch eine langfristige Retinolsäure-Vorbehandlung nicht beeinflusst. Interessanterweise konnte aber gezeigt werden, dass eine kurzzeitige Behandlung mit Retinolsäure und LPS für 30 Minuten die ERK-Aktivität signifikant reduzierte.

In der Literatur wird der Einfluss von Retinolsäure auf die p38- und ERK-Aktivität in verschiedenen Modellsystemen uneinheitlich beschrieben. In Übereinstimmung mit dieser Arbeit hatte Retinolsäure keinen Einfluss auf die p38-Aktivität in TNF-α-stimulierten, humanen Endothelzellen [122]. Dagegen reduzierte Retinolsäure die p38-Aktivität in Angiotensin II-stimulierten Ratten-Kardiomyozyten [124] und H_2O_2-stimulierten, humanen mesengialen Zellen [125]. Eine Retinolsäure-vermittelte stimulierte p38-Aktivität zeigten Ko et al. [141] in nicht stimulierten THP-1.
Eine mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbare Retinolsäure-vermittelte Reduzierung der ERK-Aktivität wurde auch in einigen Literaturbefunden gezeigt. So reduzierte Retinolsäure die ERK-Aktivität in TNF-α-stimulierten, humanen Endothelzellen [122], in Angiotensin II-stimulierten Ratten-Kardiomyozyten [124] und in nicht stimulierten, humanen bronchialen Epithelzellen [123]. Dagegen berichten einige andere Studien über einen aktivierenden Einfluss von Retinolsäure auf die ERK-Aktivität, z.B. in H_2O_2-stimulierten, humanen mesengialen Zellen [125] und in nicht stimulierten, monozytären Zelllinien (THP-1 [141], HL60 [44, 142]).

Diese Studien verdeutlichen die wichtige Rolle des Stimulus und des Zelltyps für den Einfluss von Retinolsäure auf die MAP-Kinase-Aktivität.
Der Einfluss von Retinolsäure auf die Signaltransduktion insgesamt scheint, wie auch jener auf die Zytokinsekretion, hauptsächlich vom Modellsystem und vom methodischen Design abzuhängen.

Zusammenfassend hatte Retinolsäure keinen Einfluss auf die p38-Aktivität in den hier verwendeten humanen mononukleären Zellen. Demnach scheint der p38-Signalweg nicht in den Retinolsäure-Effekt involviert zu sein. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Retinolsäure die ERK-Aktivität signifikant reduzierte. Interessanterweise wurde dieser Effekt nicht durch eine langfristige Retinolsäure-Vorbehandlung, sondern durch eine kurzzeitige Retinolsäure-Behandlung für 30 Minuten vermittelt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Retinolsäure einen direkten Einfluss auf ERK oder auf Komponenten des ERK-Signalwegs ausübt.

Aus der Literatur sind sowohl direkte als auch indirekte Effekte von Retinolsäure auf die MAP-Kinase-Aktivität bekannt. So beschreiben z.B. Lee et al. [143], dass Retinolsäure die JNK-Aktivität in Serum-stimulierten Bronchialkarzinomzellen über zwei verschiedene Mechanismen reduzierte. Eine Retinolsäure-Behandlung für 30 Minuten reduzierte die JNK-Aktivität über einen direkten Effekt; eine Retinolsäure-Behandlung für 24 Stunden über einen indirekten. Dieser indirekte Effekt war von der transkriptionalen Aktivität des Retinolsäure-Rezeptors abhängig und erforderte die Neusynthese der MAP-Kinase Phosphatase-1 (MKP-1). MKP-1 gehört zu den *dual-specificity MAP kinase phosphatases* (Übersicht z.B. bei [144]) und reguliert die Dephosphorylierung und damit die Inaktivierung von MAP-Kinasen.
Neben Lee et al. [143] berichten auch einige andere Studien über eine Abhängigkeit des Retinolsäure-Effekts von der MKP-1-Aktivität. So zeigten z.B. Palm-Leis et al. [124] in Angiotensin II-stimulierten Ratten-Kardiomyozyten, dass Retinolsäure die ERK-Aktivität über die Induktion von MKP-1 reduzierte.
In den bereits erwähnten Studien von Lee et al. [143] und Palm-Leis et al. [124], sowie in einer Studie von Xu et al. [125], war die Retinolsäure-vermittelte MKP-1-Aktivierung abhängig von einer Protein-Neusynthese und von einer Retinolsäure-Vorbehandlungszeit von mindestens zwei Stunden. Dies deutet darauf hin, dass der Einfluss von Retinolsäure auf die MKP-1-Aktivität ein indirekter langfristiger Effekt ist. Dagegen konnte in dieser Arbeit nach einer Retinolsäure-Vorbehandlung für 16 Stunden kein Einfluss auf die ERK-Aktivität festgestellt werden. Folglich ist ein indirekter Einfluss von Retinolsäure auf die ERK-Aktivität, z.B. über eine stimulierte MKP-1-Expression, eher unwahrscheinlich. Vielmehr lässt der relativ schnelle Retinolsäure-Effekt vermuten, dass nicht eine Protein-Neusynthese, sondern vielmehr ein direkter Einfluss von Retinolsäure auf ERK oder Komponenten des ERK-Signalwegs entscheidend ist.
In Übereinstimmung damit berichten auch Jiang et al. [136] in Maus-Kupfferzellen, dass die LPS-stimulierte ERK-Aktivierung nicht von einer Protein-Neusynthese, sondern von einer schnellen Kinase-Aktivierung durch Phosphorylierung abhängig war. Ob der Einfluss von Retinolsäure auf die ERK-Aktiviät in humanen mononukleären Zellen tatsächlich durch eine direkte Interaktion mit ERK oder durch eine Interaktion mit vor- bzw. nachgeschalteten Komponenten des ERK-Signalwegs vermittelt wurde, gilt es in weiteren Studien zu klären.

Für eine wichtige Rolle des schnellen Retinolsäure-Effekts auf ERK sprechen auch Untersuchungen zur TNF-α-Sekretion. Beim ersten Messpunkt, nach drei Stunden Behandlung, war der reduzierende Einfluss von Retinolsäure auf die TNF-α-Sekretion bereits maximal ausgeprägt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Retinolsäure-vermittelte reduzierte TNF-α-Transkriptmenge und -Sekretion im Wesentlichen von einem relativ schnellen Effekt auf die ERK-Aktivität abhängt.
In Übereinstimmung mit der Hypothese dieser Arbeit wurde in verschiedenen monozytären Zellen gezeigt, dass der ERK-Signalweg entscheidend für die LPS-stimulierte TNF-α-Expression ist (Shi et al. [145], Guha et al. [146], Scherle et al. [147]). Außerdem zeigten Shi et al. [145], dass die LPS-stimulierte ERK-Aktivität einen relativ schnellen Effekt auf die TNF-α-Transkription hat. So bewirkte die Hemmung der ERK-Aktivierbarkeit durch einen ERK-Inhibitor oder durch Überexpression eines dominant negativen ERK-Konstrukts eine reduzierte TNF-α-Transkription bereits nach LPS-Stimulierung für 30 bis 60 Minuten. Auch die TNF-α-Sekretion wurde bereits nach zwei bis vier Stunden stark reduziert.
Darüber hinaus liefert eine Studie von Guha et al. [146] weitere Anhaltspunkte für die Signaltransduktion der LPS-stimulierten TNF-α-Expression. Diese Arbeitsgruppe zeigte anhand humaner Monozyten, dass der LPS-stimulierte MEK-ERK-Signalweg über die Phosphorylierung von Elk-1 zur Aktivierung der Egr-1-Expression führt, woraufhin Egr-1 über Bindung an den TNF-α-Promotor, die TNF-α-Expression stimuliert. Ob dieser Signalweg auch in den hier verwendeten humanen mononukleären Zellen durch LPS aktiviert wurde, müsste in weiteren Studien geklärt werden.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit erstmals ein reduzierender Einfluss von Retinolsäure auf die TNF-α-Sekretion in humanen mononukleären Zellen gezeigt. Darüber hinaus wurde ein Beitrag zur Aufklärung des Einflusses von Retinolsäure auf die dabei involvierte Signaltransduktion geleistet (Abb. 28). Weitere Studien sind notwendig, um die molekularen Mechanismen von Retinolsäure in der Entzündungsreaktion weiter aufzuklären und um eine bessere Abschätzung ihrer therapeutischen Einsatzmöglichkeiten zu gewinnen.

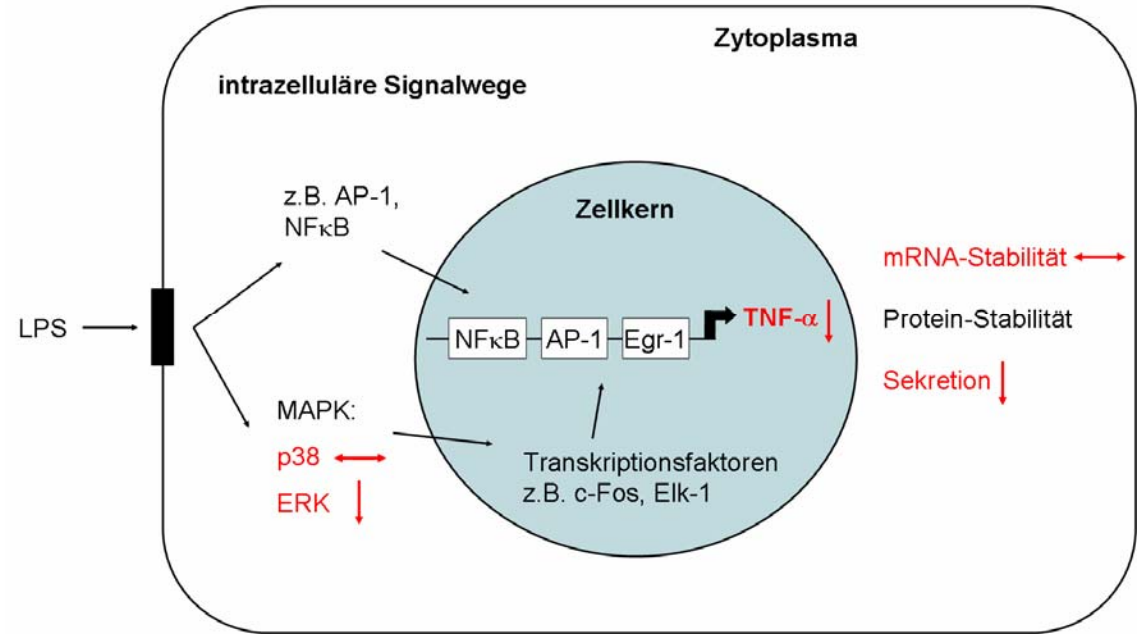


Abbildung 28: Einfluss von Retinolsäure auf die Signaltransduktion in LPS-stimulierten, humanen mononukleären Zellen. LPS bindet an einen spezifischen, membranständigen Rezeptor und aktiviert verschiedene intrazelluläre Signalwege, welche die TNF-α-Expression induzieren. Die Retinolsäure-Behandlung reduzierte die TNF-α-Sekretion. Dieser reduzierende Einfluss konnte bereits auf Transkriptebene gezeigt werden. So reduzierte Retinolsäure die TNF-α-Transkriptmenge ohne die mRNA-Stabilität zu beeinflussen, was auf eine wichtige Rolle der TNF-α-Transkription hinweist. Unter den vorgeschalteten intrazellulären Signalwegen scheint nicht der p38-, sondern der ERK-Signalweg von Bedeutung zu sein. Retinolsäure hatte keinen Einfluss nach langfristiger Hormon-Vorbehandlung, reduzierte aber die ERK-Aktivität nach einer relativ kurzen Behandlungsdauer von 30 Minuten. Dieser schnelle Effekt lässt vermuten, dass nicht eine Protein-Neusynthese, sondern vielmehr ein direkter Einfluss von Retinolsäure auf ERK oder Komponenten des ERK-Signalwegs für den Retinolsäure-Effekt entscheidend ist.

5. Zusammenfassung

Die Entzündung ist eine charakteristische Antwort auf einen äußeren oder innerlich ausgelösten Reiz. Das Ziel der Entzündungsreaktion ist es, den Körper in erhöhte Abwehrbereitschaft zu versetzen, den schädigenden Reiz zu beseitigen und die reizbedingte Gewebeschädigung zu reparieren. Allerdings werden Abweichungen von einer normalen Entzündungsreaktion mit vielen Krankheiten in Zusammenhang gebracht, darunter rheumatoide Arthritis, Psoriasis und Morbus Crohn. In der Therapie dieser Krankheiten werden insbesondere Glucocorticoide eingesetzt, welche gut bekannt sind für ihre starke immunsuppressive und entzündungshemmende Wirkung. In den letzten Jahren sind auch andere Wirkstoffe mit potentiell immunmodulatorischem Einfluss in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Dazu zählen andere Steroidhormone, das Secosteroid Calcitriol und das Terpen-Derivat Retinolsäure. Obwohl diese Hormone unterschiedliche physiologische Funktionen ausüben, vereint sie ein gemeinsamer Wirkungsmechanismus: Sie binden in Zielzellen an spezifische nukleäre Rezeptoren, die als Transkriptionsfaktoren die Expression hormonabhängiger Gene regulieren.

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von Steroidhormonen, Calcitriol und Retinolsäure auf die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF-α und IL-6 unter basalen und LPS-stimulierten Bedingungen untersucht werden. Als Modellsystem dienten mononukleäre Zellen männlicher und weiblicher Spender. Die Behandlung mit dem synthetischen Glucocorticoid Dexamethason zeigte in allen Versuchen den erwarteten reduzierenden Einfluss auf die Zytokinsekretion und bestätigte so die Validität von Modellsystem und Methodik. Interessanterweise war der Dexamethason-Effekt in Zellen männlicher Spender stärker ausgeprägt als in Zellen weiblicher Spender. Die Behandlung mit Testosteron und Östradiol hatte dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die TNF-α- und IL-6-Sekretion. Die Calcitriol-Behandlung ergab uneinheitliche Effekte, welche vom methodischen Design und vom Geschlecht der Zell-Spender abhängig waren. Die durch Retinolsäure erzielten Ergebnisse nehmen eine besondere Stellung in dieser Arbeit ein. Die Retinolsäure-Behandlung zeigte mit und ohne LPS-Stimulierung einen durchgehend reduzierenden Einfluss auf die TNF-α- und IL-6-Sekretion. Dieser Retinolsäure-Effekt war konzentrationsabhängig und wurde sowohl in Zellen männlicher als auch weiblicher Spender beobachtet.

Im weiteren Verlauf der Arbeit stand der Einfluss von Retinolsäure auf die Signaltransduktion im Vordergrund. So konnte die antiinflammatorische Wirkung von Retinolsäure

bereits auf Transkriptebene beschrieben werden. Retinolsäure reduzierte die TNF-α-mRNA-Menge ohne die mRNA-Stabilität zu beeinflussen. Folglich scheint der Einfluss von Retinolsäure auf die TNF-α-Transkription und auf vorgeschaltete Signalwege von Bedeutung zu sein.

Viele intrazelluläre Signalwege führen zu einer aktivierten TNF-α-Transkription. Aus der Literatur ist bekannt, dass speziell in monozytären Zellen die MAP-Kinase-Signalwege eine wichtige Rolle spielen. Deshalb wurde der Einfluss von Retinolsäure auf die Aktivität der MAP-Kinase ERK untersucht. Interessanterweise hatte Retinolsäure keinen Einfluss nach langfristiger Hormon-Vorbehandlung, reduzierte aber die ERK-Aktivität nach einer relativ kurzen Behandlungsdauer von 30 Minuten. Dieser schnelle Effekt lässt vermuten, dass nicht eine Protein-Neusynthese, sondern vielmehr ein direkter Einfluss von Retinolsäure auf ERK, für die Retinolsäure-vermittelte Reduktion der TNF-α-Sekretion entscheidend ist.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit erstmals ein reduzierender Effekt von Retinolsäure auf die TNF-α-Sekretion in humanen mononukleären Zellen gezeigt. Darüber hinaus wurde ein Beitrag zur Aufklärung des Einflusses von Retinolsäure auf die dabei involvierte Signaltransduktion geleistet. Weitere Studien über den Einfluss von Retinolsäure auf die Zytokinsekretion *in vivo* und auf die gesamte Inflammation sind notwendig, um hierdurch eine bessere Abschätzung ihrer therapeutischen Einsatzmöglichkeiten zu gewinnen.

6. Summary

Inflammation is the characteristic biological response of vascular tissues to harmful stimuli. Its function is to activate immune defense, to remove the harmful stimulus and to repair damaged tissue. Abnormalities associated with inflammation are believed to be responsible for a series of diseases e.g. rheumatoid arthritis, psoriasis and Crohn's disease. Immune-suppressive drugs in particular glucocorticoids are used to treat these diseases. Recently new agents with potentially immune-modulating effects got into focus of interest, including other steroid hormones, the secosteroid calcitriol and the terpene derivate retinoic acid. Although these hormones regulate various physiological functions they share a common mechanism of action. In target cells they bind to nuclear receptors and thereby regulate the expression of a specific set of genes.

The aim of my thesis was to investigate the influence of steroid hormones, calcitriol and retinoic acid on the basal, as well as LPS-stimulated secretion of the pro-inflammatory cytokines TNF-α and IL-6. Mononuclear cells of male and female donors served as a model-system. Treatment with the synthetic glucocorticoid dexamethasone showed the expected reduction of cytokine secretion, confirming the validity of the method and of the model-system. Interestingly, the reducing effect was more pronounced in cells of male than in cells of female donors, respectively. Testosterone and estradiol treatment showed no effect on cytokine secretion. Calcitriol had different effects on cytokine secretion, meaning activating, reducing or no effect, presumably depending on the method-design and the sex of the cell donor. Interestingly**,** retinoic acid reduced TNF-α and IL-6 secretion regardless of LPS stimulation. The retinoic acid effect was concentration dependent and could be demonstrated in cells of male and female donors.

Another focus of this work was to analyse the molecular signal transduction processes leading to reduced TNF-α secretion upon retinoic acid treatment. Reduced TNF-α transcript levels were observed, while TNF-α mRNA stability was not affected, indicating that retinoic acid presumably affects upstream intracellular pathways and transcription. Since MAP kinases are important in the process of LPS-stimulated cytokine transcription, especially in monocytic cells, I investigated the influence of retinoic acid on MAP kinase activity. While p38 MAP kinase activity was not affected, retinoic acid reduced the activity of ERK after 30 minutes of treatment, although no reduction of ERK activity could be observed after long-term treatment. The fast effect

indicates that not *de novo* protein synthesis but a direct effect on ERK is involved in the retinoic acid mediated inhibition of TNF-α secretion.

In conclusion this work demonstrates for the first time the reducing effect of retinoic acid on TNF-α secretion in human mononuclear cells. Moreover the achieved results contributed to the clarification of the retinoic acid effect on signal transduction.
To appraise the potential of retinoic acid in therapeutic applications further studies on its influence on cytokine secretion *in vivo* and on inflammation in general are necessary.

7. Literaturverzeichnis

1. Gemsa D, Kalden JR, Resch K. Immunologie. Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1997.

2. Elenkov IJ, Iezzoni DG, Daly A, Harris AG, Chrousos GP. Cytokine dysregulation, inflammation and well-being. Neuroimmunomodulation. 2005;12(5):255-69.

3. Campbell NA. Biologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford 1997.

4. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Immunologie. Hans Huber Verlag, Bern, Göttingen, Toronto, Seattle 2002.

5. Siegenthaler W, Blum HE. Klinische Pathologie. Thieme Verlag, Stuttgart, New York 2006.

6. Cope AP. Regulation of autoimmunity by proinflammatory cytokines. Curr Opin Immunol. 1998 Dec;10(6):669-76.

7. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. Annu Rev Immunol. 2000;18:621-63.

8. Hayden MS, West AP, Ghosh S. NF-kappaB and the immune response. Oncogene. 2006 Oct 30;25(51):6758-80.

9. Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. Biochim Biophys Acta. 1991 Dec 10;1072(2-3):129-57.

10. Roux PP, Blenis J ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2004 Jun;68(2):320-44. Review.

11. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. Cell Res. 2002 Mar;12(1):9-18.

12. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. Science. 2002 Dec 6;298(5600):1911-2.

13. Bagchi MK. Steroid hormone receptor family: Mechanisms of action. In "Encyclopedia of Hormones". Elsevier Science 2003: pp. 403.

14. Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, De Lera AR, Lotan R, Mangelsdorf DJ, Gronemeyer H. International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. Pharmacol Rev. 2006 Dec;58(4):760-72. Review.

15. Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, De Lera AR, Lotan R, Mangelsdorf DJ, Gronemeyer H. International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors. Pharmacol Rev. 2006 Dec;58(4):712-25.

16. Beato M, Klug J. Steroid hormone receptors: an update. Hum Reprod Update. 2000 May-Jun;6(3):225-36.

17. Hatina J. Nukleäre Rezeptoren. Heinrich-Heine Universität Düsseldorf. Forschungslabor der Urologischen Klinik.

18. Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR. Williams textbook of endocrinology. W.B. Saunders Company, Philadelphia 1998.

19. Spindler KD. Vergleichende Endokrinologie: Regulation und Mechanismen. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 1997.

20. Bhasin S. Androgen effects in mamals. In "Encyclopedia of Hormones". Elsevier Science 2003: pp. 70-83.

21. Murphy E, Korach KS. Actions of estrogen and estrogen receptors in nonclassical target tissues. Ernst Schering Found Symp Proc. 2006;1:13-24.

22. Schmidt RF, Lang F, Thews G. Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 2005.

23. Smith JB, Haynes MK, Abruzzo J, DeHoratisus RJ. Glucocorticoids and autoimmune diseases. In "Encyclopedia of Hormones". Elsevier Science 2003: pp. 134-50.

24. Adcock IA. Glucocorticoid effects on physiology and gene expression. In "Encyclopedia of Hormones". Elsevier Science 2003: pp. 430-9.

25. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. Am J Physiol Renal Physiol. 2005 Jul;289(1):F8-28. Review.

26. Hansen LA, Sigman CC, Andreola F, Ross SA, Kelloff GJ, De Luca LM. Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy. Carcinogenesis. 2000 Jul;21(7):1271-9.

27. Reichrath J, Lehmann B, Carlberg C, Varani J, Zouboulis CC. Vitamins as hormones. Horm Metab Res. 2007 Feb;39(2):71-84.

28. Rasenick MM, Jaffe RC. Molecular mechansims of hormone action: Biology of signal transduction. In "Endocrinology & Metabolism". Mc Graw-Hill, Inc. Medical Publishing Division 2001: pp. 49-90.

29. Klinke R, Pape HP, Silbernagl S. Physiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2005.

30. Beutler B. TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. J Investig Med. 1995 Jun;43(3):227-35.

31. O'Shea JJ, Ma A, Lipsky P. Cytokines and autoimmunity. Nat Rev Immunol. 2002 Jan;2(1):37-45.

32. Hildebrand F, Pape HC, Krettek C. [The importance of cytokines in the posttraumatic inflammatory reaction] [Article in German] Unfallchirurg. 2005 Oct;108(10):793-4, 796-803.

33. Hench PS, Kendall EC, Slocumb CH, Polley HF. Cortisone, its effects on rheumatoid arthritis, rheumatic fever, and certain other conditions. Merck Rep. 1950 Oct;59(4):9-14.

34. Miner JN, Hong MH, Negro-Vilar A. New and improved glucocorticoid receptor ligands. Expert Opin Investig Drugs. 2005 Dec;14(12):1527-45. Review.

35. Belvisi MG, Hele DJ. Soft steroids: a new approach to the treatment of inflammatory airways diseases. Pulm Pharmacol Ther. 2003;16(6):321-5. Review.

36. Schäcke H, Döcke WD, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. Pharmacol Ther. 2002 Oct;96(1):23-43.

37. Hengge UR, Ruzicka T, Schwartz RA, Cork MJ. Adverse effects of topical glucocorticosteroids. J Am Acad Dermatol. 2006 Jan;54(1):1-15; quiz 16-8. Review.

38. Olsen NJ, Kovacs WJ. Gonadal steroids and immunity. Endocr Rev. 1996 Aug;17(4):369-84. Review.

39. May E, Asadullah K, Zugel U. Immunoregulation through 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its analogs. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2004 Dec;3(4):377-93.

40. Reifen R. Vitamin A as an anti-inflammatory agent. Proc Nutr Soc. 2002 Aug;61(3):397-400. Review.

41. Grivennikov SI, Tumanov AV, Liepinsh DJ, Kruglov AA, Marakusha BI, Shakhov AN, Murakami T, Drutskaya LN, Forster I, Clausen BE, Tessarollo L, Ryffel B, Kuprash DV, Nedospasov SA. Distinct and nonredundant in vivo functions of TNF produced by t cells and macrophages/neutrophils: protective and deleterious effects. Immunity. 2005 Jan;22(1):93-104.

42. Ulmer AJ, Flad H, Rietschel T, Mattern T. Induction of proliferation and cytokine production in human T lymphocytes by lipopolysaccharide (LPS). Toxicology. 2000 Nov 2;152(1-3):37-45.

43. Raga S, Julia MR, Crespi C, Figuerola J, Martinez N, Mila J, Matamoros N. Gammadelta T lymphocytes from cystic fibrosis patients and healthy donors are high TNF-alpha and IFN-gamma-producers in response to Pseudomonas aeruginosa. Respir Res. 2003;4:9. Epub 2003 Sep 8.

44. Wang L, Das H, Kamath A, Bukowski JF. Human V gamma 2V delta 2 T cells produce IFN-gamma and TNF-alpha with an on/off/on cycling pattern in response to live bacterial products. J Immunol. 2001 Dec 1;167(11):6195-201.

45. Morrison DC, Ryan JL. Bacterial endotoxins and host immune responses. Adv Immunol. 1979;28:293-450.

46. Li P, Allen H, Banejee S, Franklin S, Herzog L, Johnston C, McDowell J, Paskind M, Rodman L, Salfeld J, Towne E, Tracey D, Wardwell S, Wei F-Y, Wong W, Kamen R, Seshadri T. Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. Cell. 1995 Feb 10;80(3):401-11.

47. Hu SK, Mitcho YL, Rath NC. Effect of estradiol on interleukin-1 synthesis by macrophages. Int J Immunopharmacol. 1988;10(3):247-52.

48. Lynch EA, Dinarello CA, Cannon JG. Gender differences in IL-1 alpha, IL-1 beta, and IL-1 receptor antagonist secretion from mononuclear cells and urinary excretion. J Immunol. 1994 Jul 1;153(1):300-6.

49. Oberg F, Nilsson K. Differentiation and activation associated expression of IL-6 and IL-6 receptors in U-937 monocytic cells: relationship to the expression of CD14. Growth Factors. 1992;7(1):85-96.

50. Roberts FA, Richardson GJ, Michalek SM. Effects of Porphyromonas gingivalis and Escherichia coli lipopolysaccharides on mononuclear phagocytes. Infect Immun. 1997 Aug;65(8):3248-54.

51. De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors. J Neuroimmunol. 2000 Sep 1;109(1):16-22. Review.

52. Saklatvala J. Glucocorticoids: do we know how they work? Arthritis Res. 2002;4(3):146-50. Epub 2002 Jan 21.

53. Tong Z, Dai H, Chen B, Abdoh Z, Guzman J, Costabel U. Inhibition of cytokine release from alveolar macrophages in pulmonary sarcoidosis by pentoxifylline: comparison with dexamethasone. Chest. 2003 Oct;124(4):1526-32.

54. Morris DD, Moore JN, Crowe N, Fischer JK. Dexamethasone reduces endotoxin-induced tumor necrosis factor activity production in vitro by equine peritoneal macrophages. Cornell Vet. 1991 Jul;81(3):267-76.

55. Ito T, Fraser IP, Yeo Y, Highley CB, Bellas E, Kohane DS. Anti-inflammatory function of an in situ cross-linkable conjugate hydrogel of hyaluronic acid and dexamethasone. Biomaterials. 2007 Apr;28(10):1778-86. Epub 2007 Jan 3.

56. Amano Y, Lee SW, Allison AC. Inhibition by glucocorticoids of the formation of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6: mediation by decreased mRNA stability. Mol Pharmacol. 1993 Feb;43(2):176-82.

57. Zanker B, Walz G, Wieder KJ, Strom TB. Evidence that glucocorticosteroids block expression of the human interleukin-6 gene by accessory cells. Transplantation. 1990 Jan;49(1):183-5.

58. Franchimont D, Louis E, Dewe W, Martens H, Vrindts-Gevaert Y, De Groote D, Belaiche J, Geenen V. Effects of dexamethasone on the profile of cytokine secretion in human whole blood cell cultures. Regul Pept. 1998 Jan 2;73(1):59-65.

59. Amir A, Chapman S, Kadar T, Gozes Y, Sahar R, Allon N. Sulfur mustard toxicity in macrophages: effect of dexamethasone. J Appl Toxicol. 2000 Dec;20 Suppl 1:S51-8.

60. Tommasini I, Cantoni O. Dexamethasone promotes toxicity in U937 cells exposed to otherwise nontoxic concentrations of peroxynitrite: pivotal role for lipocortin 1-mediated inhibition of cytosolic phospholipase A2. Mol Pharmacol. 2004 Apr;65(4):964-72.

61. Denman AM. Sex hormones, autoimmune diseases, and immune responses. BMJ. 1991 Jul 6;303(6793):2-3.

62. Ackerman LS. Sex hormones and the genesis of autoimmunity. Arch Dermatol. 2006 Mar;142(3):371-6. Comment in: Arch Dermatol. 2006 Mar;142(3):362-4. JAMA. 2006 Mar 22;295(12):1443-5.

63. Zhang X, Wang L, Zhang H, Guo D, Qiao Z, Qiao J. Estrogen inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha release from murine macrophages. Methods Find Exp Clin Pharmacol. 2001 May;23(4):169-73.

64. Posma E, Moes H, Heineman MJ, Faas MM. The effect of testosterone on cytokine production in the specific and non-specific immune response. Am J Reprod Immunol. 2004 Oct;52(4):237-43.

65. Malkin CJ, Pugh PJ, Jones RD, Jones TH, Channer KS. Testosterone as a protective factor against atherosclerosis--immunomodulation and influence upon plaque development and stability. J Endocrinol. 2003 Sep;178(3):373-80.

66. Chao TC, Van Alten PJ, Greager JA, Walter RJ. Steroid sex hormones regulate the release of tumor necrosis factor by macrophages. Cell Immunol. 1995 Jan;160(1):43-9.

67. Padgett DA, Loria RM. Endocrine regulation of murine macrophage function: effects of dehydroepiandrosterone, androstenediol, and androstenetriol. J Neuroimmunol. 1998 Apr 1;84(1):61-8.

68. Ben-Nathan D, Padgett DA, Loria RM. Androstenediol and dehydroepiandrosterone protect mice against lethal bacterial infections and lipopolysaccharide toxicity. J Med Microbiol. 1999 May;48(5):425-31.

69. Li ZG, Danis VA, Brooks PM. Effect of gonadal steroids on the production of IL-1 and IL-6 by blood mononuclear cells in vitro. Clin Exp Rheumatol. 1993 Mar-Apr;11(2):157-62.

70. Kanda N, Tsuchida T, Tamaki K. Testosterone inhibits immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells. Clin Exp Immunol. 1996 Nov;106(2):410-5.

71. Bouman A, Schipper M, Heineman MJ, Faas M. 17beta-estradiol and progesterone do not influence the production of cytokines from lipopolysaccharide-stimulated monocytes in humans. Fertil Steril. 2004 Oct;82 Suppl 3:1212-9.

72. Rogers A, Eastell R. The effect of 17beta-estradiol on production of cytokines in cultures of peripheral blood. Bone. 2001 Jul;29(1):30-4.

73. D'Agostino P, Milano S, Barbera C, Di Bella G, La Rosa M, Ferlazzo V, Farruggio R, Miceli M, Miele M, Castagnetta L, Cillari E. Sex hormones modulate inflammatory mediators produced by macrophages. Ann N Y Acad Sci. 1999 Jun 22;876:426-9.

74. Deshpande R, Khalili H, Pergolizzi RG, Michael SD, Chang MD. 1997. Estradiol down-regulates LPS-induced cytokine production and NFkB activation in murine macrophages. Am J Reprod Immunol. 1997 Jul;38(1):46-54.

75. Carruba G, D'Agostino P, Miele M, Calabro M, Barbera C, Bella GD, Milano S, Ferlazzo V, Caruso R, Rosa ML, Cocciadiferro L, Campisi I, Castagnetta L, Cillari E. Estrogen regulates cytokine production and apoptosis in PMA-differentiated, macrophage-like U937 cells. J Cell Biochem. 2003 Sep 1;90(1):187-96.

76. Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. Endocr Rev. 2007 Aug;28(5):521-74. Epub 2007 Jul 19.

77. Gilmore W, Weiner LP, Correale J. Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolipid protein-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. J Immunol. 1997 Jan 1;158(1):446-51.

78. Correale J, Arias M, Gilmore W. Steroid hormone regulation of cytokine secretion by proteolipid protein-specific CD4+ T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. J Immunol. 1998 Oct 1;161(7):3365-74.

79. Bouman A, Heineman MJ, Faas MM. Sex hormones and the immune response in humans. Hum Reprod Update. 2005 Jul-Aug;11(4):411-23. Epub 2005 Apr 7.

80. Fimmel S, Zouboulis CC. Influence of physiological androgen levels on wound healing and immune status in men. Aging Male. 2005 Sep-Dec;8(3-4):166-74.

81. Cutolo M, Sulli A, Capellino S, Villaggio B, Montagna P, Seriolo B, Straub RH. Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. Lupus. 2004;13(9):635-8. Review.

82. Deluca HF, Cantorna MT. Vitamin D: its role and uses in immunology. FASEB J. 2001 Dec;15(14):2579-85. Review.

83. Muller K, Haahr PM, Diamant M, Rieneck K, Kharazmi A, Bendtzen K. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits cytokine production by human blood monocytes at the post-transcriptional level. Cytokine. 1992 Nov;4(6):506-12.

84. Fujibayashi S, Suzuki S, Okano K, Naitoh T, Katabami T, Someya K. The weak calcemic vitamin D3 analogue 22-oxacalcitriol suppresses the production of tumor necrosis factor-alpha by peripheral mononuclear cells. Immunol Lett. 1991 Nov;30(3):307-11.

85. Muller K, Diamant M, Bendtzen K. Inhibition of production and function of interleukin-6 by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Immunol Lett. 1991 May;28(2):115-20.

86. Panichi V, De Pietro S, Andreini B, Bianchi AM, Migliori M, Taccola D, Giovannini L, Tetta C, Palla R. Calcitriol modulates in vivo and in vitro cytokine production: a role for intracellular calcium. Kidney Int. 1998 Nov;54(5):1463-9.

87. Giovannini L, Panichi V, Migliori M, De Pietro S, Bertelli AA, Fulgenzi A, Filippi C, Sarnico I, Taccola D, Palla R, Bertelli A. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) dose-dependently inhibits LPS-induced cytokines production in PBMC modulating intracellular calcium. Transplant Proc. 2001 May;33(3):2366-8.

88. Mehta K, McQueen T, Tucker S, Pandita R, Aggarwal BB. Inhibition by all-trans-retinoic acid of tumor necrosis factor and nitric oxide production by peritoneal macrophages. J Leukoc Biol. 1994 Mar;55(3):336-42.

89. Muller K, Gram J, Bollerslev J, Diamant M, Barington T, Hansen MB, Bendtzen K. Down-regulation of monocyte functions by treatment of healthy adults with 1 alpha,25 dihydroxyvitamin D3. Int J Immunopharmacol. 1991;13(5):525-30.

90. Abu-Amer Y, Bar-Shavit Z. Regulation of TNF-alpha release from bone marrow-derived macrophages by vitamin D. J Cell Biochem. 1994 Aug;55(4):435-44. Erratum in: J Cell Biochem 1994 Nov;56(3):426.

91. Lyakh LA, Sanford M, Chekol S, Young HA, Roberts AB. TGF-beta and vitamin D3 utilize distinct pathways to suppress IL-12 production and modulate rapid differentiation of human monocytes into CD83+ dendritic cells. J Immunol. 2005 Feb 15;174(4):2061-70.

92. Cohen ML, Douvdevani A, Chaimovitz C, Shany S. Regulation of TNF-alpha by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in human macrophages from CAPD patients. Kidney Int. 2001 Jan;59(1):69-75.

93. Prehn JL, Fagan DL, Jordan SC, Adams JS. Potentiation of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Blood. 1992 Dec 1;80(11):2811-6.

94. Inoue M, Matsui T, Nishibu A, Nihei Y, Iwatsuki K, Kaneko F. Regulatory effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on inflammatory responses in psoriasis. Eur J Dermatol. 1998 Jan-Feb;8(1):16-20.

95. Kreutz M, Andreesen R. Induction of human monocyte to macrophage maturation in vitro by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Blood. 1990 Dec 15;76(12):2457-61.

96. Gannage-Yared MH, Azoury M, Mansour I, Baddoura R, Halaby G, Naaman R. Effects of a short-term calcium and vitamin D treatment on serum cytokines, bone markers, insulin and lipid concentrations in healthy post-menopausal women. J Endocrinol Invest. 2003 Aug;26(8):748-53.

97. Taimi M, Defacque H, Commes T, Favero J, Caron E, Marti J, Dornand J. Effect of retinoic acid and vitamin D on the expression of interleukin-1 beta, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in the human monocytic cell line U937. Immunology. 1993 Jun;79(2):229-35.

98. Brown AJ. Therapeutic uses of vitamin D analogues. Am J Kidney Dis. 2001 Nov;38(5 Suppl 5):S3-S19. Review.

99. Schwartz JB. The current state of knowledge on age, sex, and their interactions on clinical pharmacology. Clin Pharmacol Ther. 2007 Jul;82(1):87-96. Epub 2007 May 9. Comment in: Clin Pharmacol Ther. 2007 Jul;82(1):15-7.

100. Gross V, Villiger PM, Zhang B, Lotz M. Retinoic acid inhibits interleukin-1-induced cytokine synthesis in human monocytes. J Leukoc Biol. 1993 Aug;54(2):125-32.

101. Zouboulis CC. Retinoids-which dermatological indications will benefit in the near future? Skin Pharmacol Appl Skin Physiol. 2001 Sep-Oct;14(5):303-15.

102. Xu J, Storer PD, Chavis JA, Racke MK, Drew PD. Agonists for the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and the retinoid X receptor inhibit inflammatory responses of microglia. J Neurosci Res. 2005 Aug 1;81(3):403-11.

103. Kim BH, Kang HS, Lee YS. Effect of retinoids on LPS-induced COX-2 expression and COX-2 associated PGE2 release from mouse peritoneal macrophages and TNF- release from rat peripheral blood mononuclear cells. 2004. Toxicology Letters. 150: 191-201.

104. Jarrous N, Kaempfer R. Induction of human interleukin-1 gene expression by retinoic acid and its regulation at processing of precursor transcripts. J Biol Chem. 1994 Sep 16;269(37):23141-9.

105. Turpin J, Mehta K, Blick M, Hester JP, Lopez-Berestein G. Effect of retinoids on the release and gene expression of tumor necrosis factor-alpha in human peripheral blood monocytes. J Leukoc Biol. 1990 Nov;48(5):444-50.

106. Landis MS, Patel HV, Capone JP. Oxysterol activators of liver X receptor and 9-cis-retinoic acid promote sequential steps in the synthesis and secretion of tumor necrosis factor-alpha from human monocytes. J Biol Chem. 2002 Feb 15;277(7):4713-21. Epub 2001 Dec 10.

107. Oeth P, Yao J, Fan ST, Mackman N. Retinoic acid selectively inhibits lipopolysaccharide induction of tissue factor gene expression in human monocytes. Blood. 1998 Apr 15;91(8):2857-65.

108. Motomura K, Ohata M, Satre M, Tsukamoto H. Destabilization of TNF-alpha mRNA by retinoic acid in hepatic macrophages: implications for alcoholic liver disease. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2001 Sep;281(3):E420-9.

109. Motomura K, Sakai H, Isobe H, Nawata H. Effects of retinoids on the production of tumour necrosis factor-alpha and nitric oxide by lipopolysaccharide-stimulated rat Kupffer cells in vitro: evidence for participation of retinoid X receptor signalling pathway. Cell Biochem Funct. 1997 Jun;15(2):95-101.

110. Uchimura K, Nakamuta M, Enjoji M, Irie T, Sugimoto R, Muta T, Iwamoto H, Nawata H. Activation of retinoic X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production in rat Kupffer cells. Hepatology. 2001 Jan;33(1):91-9.

111. Adams J, Kiss E, Arroyo AB, Bonrouhi M, Sun Q, Li Z, Gretz N, Schnitger A, Zouboulis CC, Wiesel M, Wagner J, Nelson PJ, Grone HJ. 13-cis retinoic acid inhibits development and progression of chronic allograft nephropathy. Am J Pathol. 2005 Jul;167(1):285-98.

112. Mathew JS, Sharma RP. Effect of all-trans-retinoic acid on cytokine production in a murine macrophage cell line. Int J Immunopharmacol. 2000 Sep;22(9):693-706.

113. Mou L, Lankford-Turner P, Leander MV, Bissonnette RP, Donahoe RM, Royal W. RXR-induced TNF-alpha suppression is reversed by morphine in activated U937 cells. J Neuroimmunol. 2004 Feb;147(1-2):99-105.

114. Nozaki Y, Tamaki C, Yamagata T, Sugiyama M, Ikoma S, Kinoshita K, Funauchi M. All-trans-retinoic acid suppresses interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha; a possible therapeutic agent for rheumatoid arthritis. Rheumatol Int. 2006 Jul;26(9):810-7. Epub 2005 Nov 15.

115. Piecyk M, Wax S, Beck AR, Kedersha N, Gupta M, Maritim B, Chen S, Gueydan C, Kruys V, Streuli M, Anderson P. TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF-alpha. EMBO J. 2000 Aug 1;19(15):4154-63.

116. Dean JL, Wait R, Mahtani KR, Sully G, Clark AR, Saklatvala J. The 3' untranslated region of tumor necrosis factor alpha mRNA is a target of the mRNA-stabilizing factor HuR. Mol Cell Biol. 2001 Feb;21(3):721-30. Erratum in: Mol Cell Biol. 2005 Apr;25(8):3400.

117. Shurety W, Merino-Trigo A, Brown D, Hume DA, Stow JL. Localization and post-Golgi trafficking of tumor necrosis factor-alpha in macrophages. J Interferon Cytokine Res. 2000 Apr;20(4):427-38.

118. Hakim I, Bar-Shavit Z. Modulation of TNF-alpha expression in bone marrow macrophages: involvement of vitamin D response element. J Cell Biochem. 2003 Apr 1;88(5):986-98.

119. Dheen ST, Jun Y, Yan Z, Tay SS, Ling EA. Retinoic acid inhibits expression of TNF-alpha and iNOS in activated rat microglia. Glia. 2005 Apr 1;50(1):21-31.

120. Na SY, Kang BY, Chung SW, Han SJ, Ma X, Trinchieri G, Im SY, Lee JW, Kim TS. Retinoids inhibit interleukin-12 production in macrophages through physical associations of retinoid X receptor and NFkappaB. J Biol Chem. 1999 Mar 19;274(12):7674-80.

121. Busam KJ, Roberts AB, Sporn MB. Inhibition of mitogen-induced c-fos expression in melanoma cells by retinoic acid involves the serum response element. J Biol Chem. 1992 Oct 5;267(28):19971-7.

122. González MV, González-Sancho JM, Caelles C, Munoz A, Jiménez B. Hormone-activated nuclear receptors inhibit the stimulation of the JNK and ERK signalling pathways in endothelial cells. FEBS Lett. 1999 Oct 8;459(2):272-6. Erratum in:FEBS Lett 2000 Jan 28;466(2-3):395.

123. Lee HY, Walsh GL, Dawson MI, Hong WK, Kurie JM. All-trans-retinoic acid inhibits Jun N-terminal kinase-dependent signaling pathways. J Biol Chem. 1998 Mar 20;273(12):7066-71.

124. Palm-Leis A, Singh US, Herbelin BS, Olsovsky GD, Baker KM, Pan J. Mitogen-activated protein kinases and mitogen-activated protein kinase phosphatases mediate the inhibitory effects of all-trans retinoic acid on the hypertrophic growth of cardiomyocytes. J Biol Chem. 2004 Dec 24;279(52):54905-17. Epub 2004 Oct 18.

125. Xu Q, Konta T, Furusu A, Nakayama K, Lucio-Cazana J, Fine LG, Kitamura M. Transcriptional induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 by retinoids. Selective roles of nuclear receptors and contribution to the antiapoptotic effect. J Biol Chem. 2002 Nov 1;277(44):41693-700. Epub 2002 Aug 16.

126. Means TK, Pavlovich RP, Roca D, Vermeulen MW, Fenton MJ. Activation of TNF-alpha transcription utilizes distinct MAP kinase pathways in different macrophage populations. J Leukoc Biol. 2000 Jun;67(6):885-93.

127. Wang X, Allen C, Ballow M. Retinoic acid enhances the production of IL-10 while reducing the synthesis of IL-12 and TNF-alpha from LPS-stimulated monocytes/macrophages. J Clin Immunol. 2007 Mar;27(2):193-200. Epub 2007 Jan 26 .

128. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. Cell Signal. 2001 Feb;13(2):85-94.

129. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. Science. 1990 Sep 21;249(4975):1431-3.

130. Beutler B. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. Curr Opin Immunol. 2000 Feb;12(1):20-6.

131. Udalova IA, Knight JC, Vidal V, Nedospasov SA, Kwiatkowski D. Complex NF-kappaB interactions at the distal tumor necrosis factor promoter region in human monocytes. J Biol Chem. 1998 Aug 14;273(33):21178-86.

132. Swantek JL, Christerson L, Cobb MH. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha promoter activity is inhibitor of nuclear factor-kappaB kinase-dependent. J Biol Chem. 1999 Apr 23;274(17):11667-71.

133. Goldfeld AE, Doyle C, Maniatis T. Human tumor necrosis factor alpha gene regulation by virus and lipopolysaccharide. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Dec;87(24):9769-73.

134. Chen P, Li J, Barnes J, Kokkonen GC, Lee JC, Liu Y. Restraint of proinflammatory cytokine biosynthesis by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. J Immunol. 2002 Dec 1;169(11):6408-16.

135. Zhu W, Downey JS, Gu J, Di Padova F, Gram H, Han J. Regulation of TNF expression by multiple mitogen-activated protein kinase pathways. J Immunol. 2000 Jun 15;164(12):6349-58.

136. Jiang JX, Zhang Y, Ji SH, Zhu P, Wang ZG. Kinetics of mitogen-activated protein kinase family in lipopolysaccharide-stimulated mouse Kupffer cells and their role in cytokine production. Shock. 2002 Oct;18(4):336-41.

137. Chakrabarty K, Wu W, Booth JL, Duggan ES, Coggeshall KM, Metcalf JP. Bacillus anthracis spores stimulate cytokine and chemokine innate immune responses in human alveolar macrophages through multiple mitogen-activated protein kinase pathways. Infect Immun. 2006 Aug;74(8):4430-8.

138. Carter AB, Monick MM, Hunninghake GW. Both Erk and p38 kinases are necessary for cytokine gene transcription. Am J Respir Cell Mol Biol. 1999 Apr;20(4):751-8.

139. Rutault K, Hazzalin CA, Mahadevan LC. Combinations of ERK and p38 MAPK inhibitors ablate tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) mRNA induction. Evidence for selective destabilization of TNF-alpha transcripts. J Biol Chem. 2001 Mar 2;276(9):6666-74. Epub 2000 Nov 13.

140. van der Bruggen T, Nijenhuis S, van Raaij E, Verhoef J, van Asbeck BS. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway. Infect Immun. 1999 Aug;67(8):3824-9.

141. Ko J, Yun CY, Lee JS, Kim JH, Kim IS. p38 MAPK and ERK activation by 9-cis-retinoic acid induces chemokine receptors CCR1 and CCR2 expression in human monocytic THP-1 cells. Exp Mol Med. 2007 Apr 30;39(2):129-38.

142. Yen A, Roberson MS, Varvayanis S, Lee AT. Retinoic acid induced mitogen-activated protein (MAP)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase-dependent MAP kinase activation needed to elicit HL-60 cell differentiation and growth arrest. Cancer Res. 1998 Jul 15;58(14):3163-72.

143. Lee HY, Sueoka N, Hong WK, Mangelsdorf DJ, Claret FX, Kurie JM. All-trans-retinoic acid inhibits Jun N-terminal kinase by increasing dual-specificity phosphatase activity. Mol Cell Biol. 1999 Mar;19(3):1973-80.

144. Dickinson RJ, Keyse SM. Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. J Cell Sci. 2006 Nov 15;119(Pt 22):4607-15. Review.

145. Shi L, Kishore R, McMullen MR, Nagy LE. Lipopolysaccharide stimulation of ERK1/2 increases TNF-alpha production via Egr-1. Am J Physiol Cell Physiol. 2002. Jun;282(6):C1205-11.

146. Guha M, O'Connell MA, Pawlinski R, Hollis A, McGovern P, Yan SF, Stern D, Mackman N. Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. Blood. 2001 Sep 1;98(5):1429-39.

147. Scherle PA, Jones EA, Favata MF, Daulerio AJ, Covington MB, Nurnberg SA, Magolda RL, Trzaskos JM. Inhibition of MAP kinase kinase prevents cytokine and prostaglandin E2 production in lipopolysaccharide-stimulated monocytes. J Immunol. 1998 Nov 15;161(10):5681-6.

8. Publikationen

Roßknecht E, Hanke H, Marx N, Weidemann W. Einfluss von Calcitriol und Retinolsäure auf die Sekretion von Zytokinen in humanen Monozyten. In Heinle H, Schulte H, von Eckardstein A (Hrsg.): Arteriosklerose: Neue Konzepte, Risikofaktoren und Targets. 20. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung 2006. Tübingen 2007; S. 157-160.

Roßknecht E, Hanke H, Marx N, Weidemann W. Effects of calcitriol and retinoids on cytokine secretion in human monocytes. Perfusion; Kreislauferkrankungen in Klinik und Praxis. Jahrgang 19, Heft 2, Februar 2006; S. 76-77.

Roßknecht E, Hanke H, Marx N, Weidemann W. Influence of steroid hormones, calcitriol and retinoids on inflammation. Abstracts of Oral Presentations and Posters. Endocrinology & Diabetes. 50th Annual Meeting of the German Society of Endocrinology (DGE) & 23rd Meeting of the Dutch Endocrine Society. Supplement 1, Vol. 114, 2006, S. 62-63.

Roßknecht E, Stoiber K, Lenz C, Arnold E, Hanke H, Weidemann W. Einfluß von Androgenen auf die Expression von Matrixmetalloproteinasen sowie deren Inhibitoren im Kaninchenmodell. Perfusion. Kreislauferkrankungen in Klinik und Praxis. Jahrgang 18, Heft 2, Februar 2005; S. 91.

Roßknecht E, Tatan M, Lenz C, Hanke H, Weidemann W. Effekte von Androgenen auf die Proliferation glatter Muskelzellen und die Bildung extrazellulärer Matrix am Kaninchenmodell. Perfusion. Kreislauferkrankungen in Klinik und Praxis. Jahrgang 17, Heft 2, Januar 2004; S. 79.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Eva Roßknecht
Geburtsort: Tettnang
Geburtsdatum: 06.11.1978

Promotion

seit Jan. 2004	Promotion im Fach Biologie, Universität Ulm Angestrebter Titel: Dr. rer. nat. Thema: „Einfluss von Steroidhormonen, Calcitriol und Retinolsäure auf die Sekretion proinflammatorischer Zytokine in humanen mononukleären Zellen.“

Stipendium

Juli 2004 - Juni 2007	Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Graduiertenkollegs 1041: „Molekulare Endokrinologie und Diabetes“

Hochschulausbildung

Okt. 1998 - Dez. 2003	Studium der Biologie, Universität Ulm Abschluss: Diplom-Biologin Note: sehr gut Hauptfach: Botanik Nebenfächer: Stoffwechselphysiologie der Tiere, Ökologie, Chemie Diplomarbeit: „Mechanismen der Signalweiterleitung von Sexualhormonen in Gefäßzellen“

Schulausbildung

Sept. 1995 – Juni 1998	Ernährungswissenschaftliches Gymnasium, Friedrichshafen Abschluss: allgemeine Hochschulreife Note: 1,4

10. Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Weidemann für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Betreuung der Arbeit.
Mein Dank geht an Herrn Prof. Dr. Klaus-Dieter Spindler für die Möglichkeit meine Promotion im Institut für Allgemeine Zoologie und Endokrinologie an der Universität Ulm durchzuführen.
Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Hartmut Hanke und Herrn Dr. med. Joachim Kamenz für die Ermöglichung der praktischen Arbeit in der Abteilung Innere Medizin II.
Herrn Prof. Dr. Nikolaus Marx danke ich für die wissenschaftliche Beratung und die Unterstützung durch seine Arbeitsgruppe.
Für die Möglichkeit dem Graduiertenkolleg 1041 als Stipendiatin angehört zu haben, möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Böhm und Herrn Prof. Dr. Klaus-Dieter Spindler einen großen Dank aussprechen.
Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner Arbeitsgruppe der Biologie I (Susanne Schmidt, Susanne Siewert, Alexandra Döhring, Elisabeth Arnold, Jenny Kressel und Andreja Bekarska) und meiner Arbeitsgruppe in der Inneren Medizin II (Regine Baur, Tina Lenz und Hicran Schuler). Ich danke Euch für die Unterstützung bei der Einarbeitung und Durchführung der molekularbiologischen Methoden und Zellkultur-Techniken. Darüberhinaus möchte ich mich für die wissenschaftlichen Diskussionen und die schöne gemeinsame Zeit bedanken. Ein besonderer Dank geht an Susanne Schmidt für die gute fachliche Beratung und die gute Zusammenarbeit während meiner Diplom- und Doktorarbeit. Außerdem möchte ich mich besonders bei Regine Baur bedanken, die mich durch ihre fachliche Kompetenz des öfteren begeisterte und die sich immer für meine Fragen und Probleme Zeit genommen hat.
Miriam Grüb, Helga Bach und Renate Durst danke ich für ihre große Hilfe bei der Etablierung der Monozytenisolierung, der ELISA- und Northern Blot-Analysen.
Dass neben dem wissenschaftlichen Arbeiten auch ein tolles soziales Umfeld vorhanden war und eine gute Atmosphäe herrschte, habe ich allen Mitarbeitern des Instituts für Allgemeine Zoologie und Endokrinologie und den Mitarbeitern des SFB-Flurs zu verdanken. Ein besonderer Dank gilt Yukiko Imamichi und Sven Beilke für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen.
Mein ganz besonderer Dank gilt zuletzt meiner Familie und meinem Freund für ihr Verständnis und ihre Unterstützung.