

Aus dem Department Innere Medizin
Klinik für Pneumologie
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

**Rolle des OS9 bei der Makrophagenaktivierung
im Rahmen der Sarkoidose**



Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades der Medizinischen Fakultät

der Albert-Ludwigs-Universität

Freiburg im Breisgau

vorgelegt 2015

von Ramona Proissl

geboren in Göppingen

Dekanin: Prof. Dr. rer.net. Kerstin Krieglstein

Erster Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Gernot Zissel

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. Philipp Henneke

Jahr der Promotion: 2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1 Das Krankheitsbild der Sarkoidose.....	1
1.2 Die Ätiologie der Sarkoidose.....	2
1.3 Die Immunpathogenese der Sarkoidose und die Rolle der Alveolarmakrophagen.....	6
1.4 OS-9.....	8
1.4.1 Der ER-assoziierte Proteinabbau (ERAD).....	8
1.4.2 Die „Unfolded protein response“ (UPR).....	9
1.5 Das Zytokinnetzwerk der Sarkoidose – TNF α und Interleukin 8.....	13
1.6 Die Rolle des OS9 im Rahmen der Sarkoidose.....	15
2. Fragestellung	16
3. Material	17
3.1 Geräte und Software.....	17
3.2 Verbrauchsmaterialien.....	18
3.3 Chemikalien, Medien und Stimulanzien.....	19
3.4 Primer, Antikörper und Transfektionsreagenzien.....	21
4. Methoden	22
4.1 THP1-Zellreihe.....	21
4.1.1 Zellkultur und Zellzählung.....	21
4.1.2 THP1 Reifung mittels PMA.....	23
4.2 Stimulation und Versuchsansatz.....	24
4.2.1 THP1.....	24
4.2.2 BAL-Zellen.....	25
4.3 RNA-Isolierung.....	26
4.4 Umschreibung der RNA in cDNA – Reverse Transkription.....	26
4.5 Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (rt-PCR).....	27
4.6 MNC-Isolierung.....	29
4.6.1 Isolation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut.....	29
4.6.2 Isolation von Monozyten aus PBMCs.....	30
4.7 ELISA.....	31
4.7.1 Tumornekrosefaktor α (TNF- α).....	31
4.7.2 Interleukin 8 (IL-8).....	32
4.8 Transfektion von THP1 Zellen.....	32
4.9 Genotypisierung.....	34
4.10 Auswertung und Statistik.....	34

5. Ergebnisse	35
5.1 Die Expression des OS9 von verschiedenen myelozytären Vorläuferzellen	35
5.2 Die Induktion der Reifung der THP1 Zellen	36
5.3 Das OS9-Expressionsverhalten und die Zytokinfreisetzung von ungereiften THP1 Zellen	38
5.4 Das OS9-Expressionsverhalten und die Zytokinfreisetzung von gereiften THP1 Zellen	42
5.4.1 Vergleich der verschiedenen Ansätze nach Reifung der THP1 Zellen	43
5.4.2 Reaktion von gereiften THP1 Zellen auf verschieden Stimuli	47
5.5 Der Vergleich der Reaktion von Monozyten gegenüber THP1- und BAL-Zellen	58
5.6 Die Transfektion der THP1 Zellen mit OS9-siRNA	61
5.7 Die Reaktion von BAL-Zellen auf verschiedene Granulom-assoziierte Stimuli – im Vergleich: Sarkoidosepatienten zu Kontrollpatienten	66
5.8 Die Frage nach Korrelation zwischen Genotyp des Sarkoidosepatienten und OS9 Expression	71
6. Diskussion	74
6.1 Vergleich der OS9 Expression verschiedener myelozytärer Vorläuferzellen	76
6.2 PMA gereifte THP1 Zellen als Modell für Makrophagen	77
6.3 Expressionsverhalten und Mediatorfreisetzung von THP1 Zellen nach Exposition mit verschiedenen Granulom-assoziierten Stimuli	78
6.3.1 Reaktion ungereifter THP1 Zellen auf verschiedene Stimuli	78
6.3.2 Selektion des optimalen Reifungs-/Stimulationsansatzes für THP1 Zellen	81
6.3.3 Reaktion gereifter THP1 Zellen auf verschiedene Stimuli	81
6.3.4 Unterschiede der Reaktionen durch gereifte und ungereifte THP1 Zellen	84
6.4 Auswirkungen der OS-siRNA auf die Mediatorfreisetzung von THP1 Zellen	87
6.5 Verhalten von Monozyten im Vergleich	89
6.6 Unterschiede zwischen Sarkoidose- und Kontrollpatienten im Hinblick auf OS9	91
6.7 Korrelation zwischen Genotyp der Sarkoidosepatienten und OS9 Expression, sowie Zytokinfreisetzung	92
7. Zusammenfassung	95
8. Literaturverzeichnis	96

Abkürzungsverzeichnis

ATF	Activation Transcription Factor
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	complementary DNA
DC-STAMP	dendritischen zellspezifischen transmembranären Proteinen
DEPC-H2O	Diethylpyrocarbonate behandeltes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotide
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF2 α	Eukaryotic translation initiation factor 2A
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER assoziierter Proteinabbau
ERQC	Endoplasmatisches Retikulum- Qualitätskontrollmechanismus
FCS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase
GWAS	genome wide association study
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	humanes Leukozytenantigen
HRP	horseradish-peroxidase
IFN- γ	Interferon γ
IL-8	Interleukin 8
Ire1	Inositol-requiring enzym 1
JNK	C-Jun N-terminal kinase
LAM	Lipoarabinomannan
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
mKatG	Mycobacterium tuberculosis catalase- peroxidase G
MNC	Monozyten
MRH	Mannose-6-phosphat Rezeptor Homologie
mRNA	messenger Ribonukleinsäure

M.tb.	Mykobakterium tuberculosis
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
OS-9	osteosarcoma amplified 9
P.acnes	Propionibacterium acnes
PBMC	peripheren mononukleären Zellen
PBS	phosphate buffered saline
PERK	Proteinkinase RNA-like Endoplasmatic Reticulum Kinasen
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
P/S	Penicillin/Streptomycin
rE	relative Expression
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	revolutions per minute
rt-PCR	realtime-Polymerasekettenreaktion
siRNA	small interfering Ribonukleinsäure
SNP	single nucleotid polymorphism
TDM	Cordfaktor
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
Tregs	regulatorische T-Zellen
UPR	Unfolded Protein Response
XBP1	Xbox binding protein 1

1. Einleitung

1.1 Das Krankheitsbild der Sarkoidose

Die Sarkoidose, die synonym auch als Morbus Boeck bezeichnet wird, ist eine Multisystemerkrankung unklarer Genese. Sie ist gekennzeichnet durch eine chronische Inflammation, welche zu mononukleären Zellinfiltrationen und Bildung von epitheloidzelligen Granulomen führt. [94, 137] Diese zeigen sich insbesondere in der Lunge – sie können sich aber auch in vielen anderen Organen bilden. [141]

Bei einer Prävalenz von 50 pro 100.000 Einwohner in Westeuropa und einer Inzidenz von 10 pro 100.000 Einwohner im Jahr handelt es sich um eine seltene Erkrankung. Junge Erwachsene zwischen 20 und 40 Jahren sind hierbei am häufigsten betroffen. In der Klinik wird eine seltene akute Form der Sarkoidose, das sogenannte Löfgren Syndrom, von einer häufigen chronischen Form der Sarkoidose unterschieden. Die akute Form betrifft besonders junge Frauen und wird durch einen plötzlichen Krankheitsbeginn mit einer typischen Symptomtrias, bestehend aus Arthritis, Erythema nodosum und Lymphadenopathie, charakterisiert. Die chronische Form zeigt meist einen schleichenden Beginn und wird häufig als Zufallsbefund diagnostiziert. Sie betrifft zu 95% die Lunge und weist eine typische Diskrepanz zwischen gutem subjektivem Befinden und ausgeprägten objektiven Befunden auf. Die internationale Einteilung wird nach Röntgen-Thoraxbefunden in verschiedene Typen vorgenommen. [52] Neben der Hauptmanifestation in der Lunge können auch extrapulmonale Organe wie etwa die Haut, Augen, Parotis, Herz und viele weitere Organe betroffen sein. Die Diagnose wird anhand der Manifestationsorte, des histologischen Nachweises, der Zytologie der broncho-alveolären Lavage und nach Ausschluss einer infektiösen Genese gestellt. In akuten Fällen ist oft keine Behandlung notwendig – meistens kommt es zu einem selbstlimitierenden Verlauf mit spontaner Ausheilung innerhalb von 24 bis 36 Monaten. [97, 145] Ein schleichender Beginn führt jedoch fast immer zu einer chronischen Erkrankung, die im Verlauf behandlungsbedürftig wird. [97, 145]

Bei schwereren Fällen wird in Abhängigkeit des Typs und der betroffenen Lokalisationen für etwa 12 Monate mit systemischen Kortikosteroiden behandelt. Diese können auch lokal zur Anwendung kommen. Bei Nichtansprechen oder Langzeitanwendung wird Prednisolon in Kombination mit Immunsuppressiva, wie etwa Methotrexat angewandt. In seltenen, schweren Fällen wird eine spezifische anti-TNF- α -Therapie versucht. [2]

Die Letalität der Sarkoidoserkrankung liegt bei etwa 5%. Als Ultimo ratio bietet eine Lungentransplantation die äußerste Therapieoption. [99]

1.2 Die Ätiologie der Sarkoidose

Die Sarkoidose ist eine systemische granulomatöse Erkrankung, deren Ursache seit der Beschreibung im Jahr 1889 und 1899 durch Ernest Besnier und Caesar Peter Moeller Boeck [10, 70] bis heute nicht geklärt ist. Es wird ein Zusammenspiel von Umweltfaktoren in Kombination mit genetischen und immunologischen Faktoren vermutet. [94, 98]

In epidemiologischen Studien zeigen sich familiäre Häufungen, die für eine genetische Prädisposition sprechen. So haben Geschwister von Erkrankten ein fünffach erhöhtes Risiko ebenfalls zu erkranken. [111] Des Weiteren lassen sich verschiedene Inzidenz- und Prävalenzraten in unterschiedlichen Populationen und ethnische Gruppen finden. [54, 79] Es wird angenommen, dass genetische prädisponierende Faktoren einen Einfluss darauf haben, ob sich die Erkrankung Sarkoidose manifestiert. [18, 63] In diesem Zusammenhang wurden die major histocompatibility complex genes (MHC) im Hinblick auf bestimmte Allele des humanen Leukozyten-Antigens (HLA) untersucht. [44, 122]

Auch Toll-like-Rezeptoren (TLR), die an der Reaktion der unspezifischen Immunabwehr beteiligt sind, werden mit dem Krankheitsbild der Sarkoidose verknüpft. So wurde in einer Studie gefunden, dass eine fehlerhafte TLR-2-Antwort in der Pathogenese der Lungensarkoidose eine Rolle spielt. [42, 142] Außerdem wurde eine bisher unidentifizierte Variante des TLR-4 untersucht, welche eine Prädisposition für Sarkoidose zu fördern scheint. [117] In einer weiteren Studie konnte zudem ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen Patienten mit chronischem Krankheitsverlauf und einem Polymorphismus des TLR-4-Gens gestellt werden. [102] Es wird also nicht nur ein genetischer Einfluss auf die Entstehung der Sarkoidose, sondern auch auf den Verlauf der Erkrankung vermutet. Als möglicher Prädispositionslokus wurde des Weiteren das BTNL2 Gen auf Chromosom 6 untersucht. Dieses spielt eine Rolle in der Regulation der T-Zellaktivierung. [136]

In einer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS: genome wide association study) wurde von Hoffmann et al ein neuer Prädispositionslokus für Sarkoidose auf Chromosom 12q13.3-q14.1 identifiziert. [56] Hierbei konnte OS9 (osteosarcoma amplified 9) als ein wahrscheinlicher Risikofaktor für Sarkoidose ermittelt werden. [56]

Dieser genetische Risikolokus wurde bisher im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis, Typ 1 Diabetes, Multipler Sklerose und Zöliakie untersucht. [6, 40, 43, 159]

OS9 (osteosarcoma amplified 9) ist ein sogenanntes Osteosarkom-Protein, welches durch das OS9 Gen kodiert wird. In Osteosarkomen wird das Gen stark exprimiert. [78] Das mutmaßliche Risikogen des OS9 spielt einerseits eine wichtige Rolle in der ERAD (ER-assoziiertes Abbau) von un- oder falschgefalteten Proteinen, und andererseits in der Induktion einer Antigen-T-Zellantwort. [146]

In dieser Arbeit soll unter anderem der Einfluss des OS9 auf die Manifestation der Erkrankung Sarkoidose, sowie auf deren Verlauf untersucht werden. Genetische Risikoprofile für Sarkoidose und ihr Einfluss auf die Immunpathogenese sind Gegenstand aktueller Forschung. [36]

Neben diesen zahlreichen Hinweisen auf eine genetische Prädisposition, wird zusätzlich von einem Trigger aus der Umwelt ausgegangen. Es wird vermutet, dass eine übermäßige granulomatöse Reaktion nach Exposition mit einem nicht identifizierten Antigen bei Individuen mit genetischer Anfälligkeit die Erkrankung auslösen kann. [123, 137] Dabei handelt es sich wahrscheinlich um verschiedene, schlecht abbaubare Antigene infektiösen oder umweltbedingten Ursprungs, die diese Reaktion triggern. [14] Es wird die Exposition zahlreicher verschiedener Schadstoffe der Umwelt als Trigger der Sarkoidose diskutiert. So zeigte sich eine starke Zunahme der Inzidenz sarkoidoseähnlicher granulomatöser Lungenerkrankungen bei Helfern des 11. Septembers 2001, die dem Staub des World Trade Centers ausgesetzt waren. Im folgenden ersten Jahr stieg die Inzidenz auf 86 von 100 000 bei einer ursprünglich stabilen Inzidenz von 15 pro 100 000 Einwohner in den Jahren zuvor. [68] Als mögliche infektiöse Antigene wurden insbesondere Mykobakterien und deren Bestandteile in zahlreichen Studien untersucht. [5, 24–26]

Auch in dieser Arbeit wurde das Mykobakterium tuberculosis als Stimulanz verwendet. Dabei werden Mykobakterien schon seit langem als potentielle ätiologische Trigger für Sarkoidose vermutet, auch aufgrund der histologischen Ähnlichkeiten zwischen Tuberkulose und Sarkoidose. [46] In einer Metaanalyse von Studien zur Rolle von Mykobakterien bei der Sarkoidose aus den Jahren 1980 bis 2006 wurde eine nachweislich mykobakterielle Anwesenheit (DNA/RNA) in sarkoiden Läsionen aufgezeigt, die einen Zusammenhang zwischen Mykobakterien und einigen Fällen von Sarkoidose nahe legt. [45] In weiteren Studien wurde M.tb. DNA für das Protein mKatG (Mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase G) in 38% der Biopsien und IgG für mKatG in über der Hälfte der Sarkoidosepatienten nachgewiesen. Dies lässt vermuten, dass mKatG eine der Angriffspunkte der adaptiven Immunantwort ist und an der Entstehung der granulomatösen Inflammation der Sarkoidose beteiligt ist. [121] Als Liganden für Mycobacterium tuberculosis dienen hierbei Toll-like-Rezeptoren. [42] Der Zusammenhang zwischen mykobakteriellen Antigenen und systemischer Sarkoidose wird auch in weiteren Studien gestellt. [22, 100] Jedoch konnte er nicht bei allen Patienten nachgewiesen werden und so bleibt das Mykobakterium zwar ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der Erkrankung, es ist wohl jedoch kein eindeutiger ursächlicher „Sarkoidose-Stimulus“. Mykobakterien werden weiterhin Gegenstand experimenteller und klinischer Forschung im Rahmen der Sarkoidose sein.

In dieser Arbeit wurde das Glykolipid Trehalose 6,6'-dimycolat (TDM) zur Stimulation der hier eingesetzten Zelllinie und der BAL-Zellen verwendet. Es ist Bestandteil der mykobakteriellen Zellwand.

In einer Studie wurde die Vermutung geäußert, dass die Anwesenheit von TDM ein wichtiger Faktor für eine erfolgreiche Infektion und das Überleben des *M. tb.* in Makrophagen ist [66]. Es hat dabei Auswirkungen auf die Immunantwort der betroffenen Zellen. [37] Darüber hinaus ist es für die Bildung der pulmonalen Granulome mitverantwortlich – gekoppelt über die Freisetzung an TNF- α . [114] Weiterhin wurde hier das Glykolipid Lipoarabinomannan, LAM, als Stimulanz genutzt. Es ist ebenfalls Bestandteil der äußeren Wandschicht von Mykobakterien. Die Erkennung von Mykobakterien durch Makrophagen und dendritische Zellen geschieht primär über LAM-Identifizierung auf der mykobakteriellen Zelloberfläche durch Toll-like Rezeptoren (TLRs) – insbesondere durch TLR2. [138] Dies macht die Bedeutung von LAM für die Mykobakterien deutlich. Als Agonist für TLR1 und TLR2 kann es über einen transmembranären Signalweg zur Aktivierung der Zelle führen. [130] Zudem kann eine Immunantwort eingeleitet werden [106] – dabei spielen der NF κ B Signalweg und der Map Kinase Signalweg eine Rolle. [131] Die Aktivierung der Makrophagen über TLRs durch Mykobakterien verursacht zudem die vermehrte Produktion zahlreicher Zytokine, wie etwa TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 und IFN- γ . [138] Des Weiteren besitzt LAM einen Mannosylrest, [39, 134] welcher als Ligand für die MRH-Domäne des OS9 dienen kann und so direkt am ERAD (ER-assoziiertes Proteinabbau) beteiligt sein könnte.

Auch Propionibakterien, kommensale Bakterien der Hautflora, werden immer wieder in Zusammenhang mit der Sarkoidose gebracht. In einer Studie von Eishi et al konnte gezeigt werden, dass Propionibacterium acnes (P. acnes) eine zelluläre Immunantwort bei Sarkoidosepatienten auslöst. [31] Im Vergleich wurde eine signifikant stärkere Antikörperantwort auf P. acnes-Proteine durch BAL von Sarkoidosepatienten ausgelöst als bei Kontrollen. [55] Im Tierversuch konnte zudem bei den Mäusen eine pulmonale Granulombildung induziert werden, welche an einer latenten P. acnes Infektion der Lungen litt. [87] Antibiotika verhinderte ein Fortschreiten der Granulomentwicklung. Es wird angenommen, dass eine latente P. acnes Infektion in systemischen Organen durch weitere Trigger zu einer systemischen Sarkoidose führen kann. [31]

In einer großen Metaanalyse von Zhou et al konnte ein Zusammenhang von P. acnes und einigen Sarkoidosefällen unterstützt werden. [161]

Das Propionibacterium spp. konnte auch direkt in Lymphknotenbiopsien nachgewiesen werden. [30, 58] Doch auch bei Kontrollen kann P. acnes in Gewebeproben nachgewiesen werden. [67] Als möglicher Trigger wurde P. acnes in dieser Arbeit als Stimulanz verwendet. Es besitzt die Fähigkeit die Produktion von TNF- α von THP1 Zellen zu steigern. [77]

Eine Hemmung des P. acnes führt wiederum zu einer verminderten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α und IL-8. [76] Die Anwendung dieser Erkenntnisse in Form der therapeutischen Gabe von Clarithromycin ermöglichte die erfolgreiche Behandlung eines P. acnes positiven Sarkoidosefalles. [128] Die Rolle von P. acnes im Rahmen der Sarkoidose ist noch ungeklärt, jedoch scheint es zumindest zusammen mit anderen Faktoren an der Pathogenese der Sarkoidose beteiligt zu sein.

Trotz zahlreicher Studien zu verschiedenen infektiösen Agenzien und Triggern aus der Umwelt, konnte bisher kein eindeutiger „Sarkoidose-Stimulus“ identifiziert und nachgewiesen werden.

1.3 Die Immunpathogenese der Sarkoidose und die Rolle der Alveolarmakrophagen

Als typisch pathologische Veränderung finden sich in den betroffenen Organen nicht-verkäsende, epitheloidzellige Granulome mit Langhans' Riesenzellen und einem schmalen Lymphozytensaum. [52] Die mehrkernigen Riesenzellen können dabei zum Teil laminare Kalzium-Protein-Körper, sogenannte Schaumann-Körper [133], sowie sternförmige Einschlüsse, die Asteroid-Körper, enthalten. Bei der Entstehung der Granulome und einer begleitenden Alveolitis wird von einer Immunpathogenese ausgegangen, die in folgender Abbildung dargestellt wird. [80, 170]

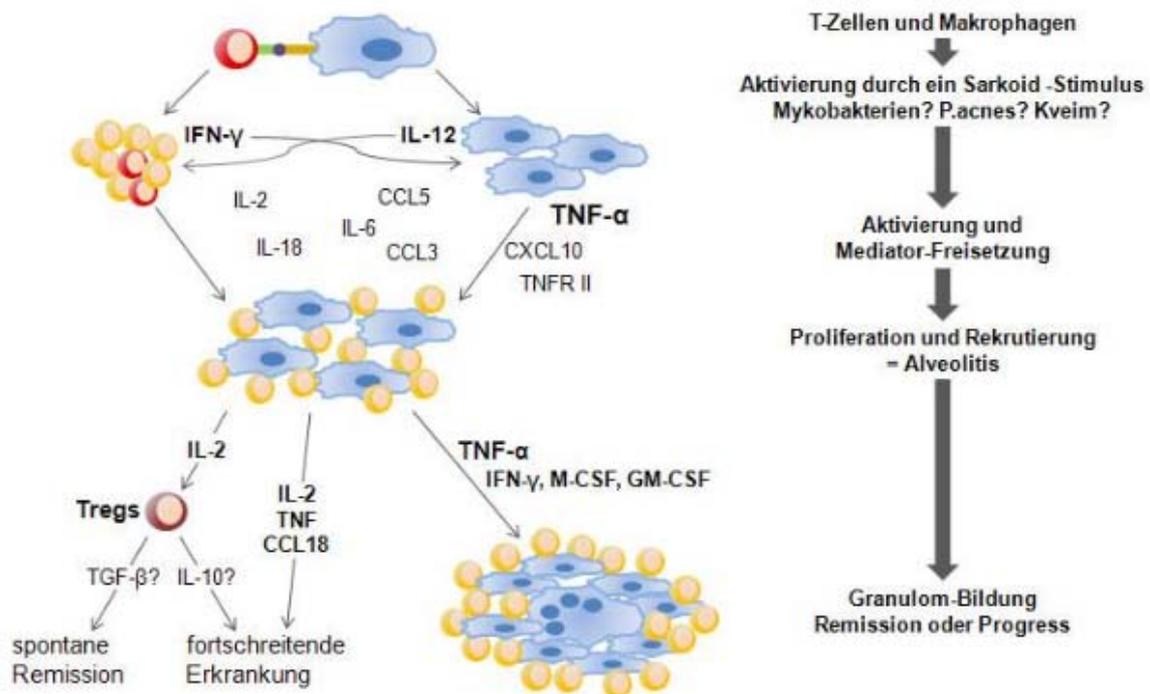


Abb.1.1: Die Abbildung zeigt die Immunpathogenese der Sarkoidose, sowie deren Verlauf mit Beteiligung zahlreicher Zytokine, T-Zellen und Makrophagen. Der ursprüngliche Sarkoidose-Stimulus ist bis heute ungeklärt.

Eine aktuelle Hypothese zur Immunpathogenese der Sarkoidose postuliert, dass ein bisher unbekanntes Sarkoidoseantigen T-Zellen und Makrophagen stimuliert – es sind also sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunität an der Pathogenese beteiligt. Über eine Mediatorfreisetzung dieser Zellen, darunter Interleukin-12, TNF-α und IFN-γ, kommt es zu einer Rekrutierung und Aktivierung von weiteren Immunzellen. [94]

Diese Immunantwort verursacht eine Alveolitis, welche durch weitere Zytokine und regulatorische T-Zellen, sogenannte Tregs, entweder zu einer Spontanremission oder einer Progredienz der Erkrankung führt. Die klinische Manifestation ist dabei von genetischen und immunologischen Komponenten abhängig. [92]

Neben den alveolären T-Zellen spielen die Alveolarmakrophagen eine entscheidende Rolle in der Immunpathogenese. [167] Bei einem starken Anstieg der Zellzahl in der bronchoalveolären Lavage, zeigt sich zwar ein Anstieg der absoluten Zahl an Alveolarmakrophagen bei Sarkoidosen, die relative Zahl sinkt jedoch. [166] Der Prozentsatz an Alveolarmakrophagen mit monozytärer Erscheinung steigt bei Sarkoidosepatienten, was eine Immigration von monozytären Vorläuferzellen der Alveolarmakrophagen aus dem Blut vermuten lässt. [47] Dafür spricht die Tatsache, dass im Verlauf der inflammatorischen Reaktion Zytokine produziert werden, welche chemotaktisch auf Monozyten wirken, so etwa TNF- α , Interleukin 8 und MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1). [13, 88] Es wird vermutet, dass der Grad an Aktivierung der monoklonalen Phagozyten mit der Aktivität der Lungenerkrankung korreliert und zudem auch die Funktion der Lungenlymphozyten moduliert. [167]

Alveolarmakrophagen sind durch Freisetzung zahlreicher Mediatoren, wie Interleukin 6, Interleukin 1, das Makrophagen-Inflammasomprotein 1 und MCP-1 (monocyte chemotactic protein -1) [124, 125] an der Inflammasomreaktion und Entstehung der Alveolitis beteiligt. Diese Annahme wird durch den Nachweis der Freisetzung von Superoxid-Anionen und Radikalen durch Makrophagen bestärkt. [126] Zudem konnte gezeigt werden, dass monozytäre Zellen Interleukin 12 produzieren, ein Schlüsselzytokin, welches T-Zellen in Richtung Th1 aktiviert und so zum Voranschreiten der Erkrankung führt. [89] Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Alveolarmakrophagen von Sarkoidosepatienten eine erhöhte Transkription an TNF- α aufweisen. [93] Durch diese Erkenntnis und den direkten Nachweis von aktivierten Makrophagen in Granulomen konnte gezeigt werden, dass Alveolarmakrophagen maßgeblich an der Granulombildung beteiligt sind.

Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Alveolarmakrophagen eine kritische Rolle sowohl in der Pathogenese als auch dem weiteren Krankheitsverlauf der Sarkoidose spielen. Daher werden in dieser Arbeit Makrophagen, sowie monozytäre Vorläuferzellen untersucht.

1.4 OS9

Genetische Risikoprofile für Sarkoidose und ihr Einfluss auf die Immunpathogenese sind Gegenstand aktueller Forschung. [36] Wie bereits beschrieben, wurde OS9 (osteosarcoma amplified 9) als wahrscheinlicher Risikofaktor für Sarkoidose ermittelt. In einer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS: genome wide association study) wurde von Hoffmann et al dieser neue Prädispositionslokus für Sarkoidose auf Chromosom 12q13.3-q14.1 identifiziert. [56] Bisher wurde dieser genetische Risikolokus im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis, Typ 1 Diabetes, Multipler Sklerose und Zöliakie untersucht. [6, 40, 43, 159]

In dieser Arbeit soll unter anderem untersucht werden, welche Funktion und welche Aufgaben OS9 im Rahmen der Sarkoidose besitzt und welche Auswirkungen ein Verlust dieser Funktion hat.

OS9 (osteosarcoma amplified 9) ist ein sogenanntes Osteosarkom-Protein, welches durch das OS9 Gen kodiert wird. In Osteosarkomen wird das Gen hoch exprimiert. [78] OS9 findet sich im Lumen des ER und wird bei ER-Stress hochreguliert. Es spielt also eine Rolle in der Unfolded protein reaction. [1] OS9 ist notwendig, um missgefaltete Proteine zu erkennen, bei der Ubiquitinierung zu assistieren und Proteasombestandteile zu transportieren. [60, 86, 115]

1.4.1 ER-assoziiertes Proteinabbau

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein von Membranen umhülltes Zellorganell, das in eukaryotischen Zellen für die Synthese, Faltung, Modifizierung und Qualitätskontrolle von zahlreichen sekretorischen Proteinen und Membranproteinen zuständig ist. Der Prozess der Faltung ist hierbei hoch sensibel gegenüber Veränderungen in der Zelle und anderen Stressoren, wie etwa Hypoxie, Zigarettenrauch, Umweltfaktoren oder Infektionen. Nur korrekt gefaltete Proteine werden über den Golgi-Apparat an ihren Zielort geschleust. Die Faltung wird durch einen ER-Qualitätskontrollmechanismus (ERQC) überprüft – sind nicht alle Kriterien erfüllt, werden nicht- oder falschgefaltete Proteine dem Signalweg des ER-assoziierten Abbaus (ERAD) zugeführt. [8, 144]

Die Erkennung und Markierung findet durch zytosolische und luminalen Chaperone statt. Die Substrate werden daraufhin zurück ins Zytoplasma transportiert, wo sie durch eine Ubiquitinierung zum Proteasom geleitet und dort abgebaut werden. [109]

Eine Störung des Signalwegs des ERAD wird mit bestimmten Erkrankungen assoziiert, da diese eine Akkumulation von Proteinen im ER und damit eine Schädigung der Zelle bewirkt, so etwa bei Diabetes [158], neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson [83, 155] sowie HIV [160]. ERAD ist zudem Gegenstand aktueller Forschung bei verschiedenen chronischen Lungenerkrankungen. [151]

1.4.2 „Unfolded protein response“ – UPR

Bei der „unfolded protein response“ handelt es sich um eine zelluläre Stressreaktion, einem hochkomplexen Mechanismus, der überlebenswichtig für eukaryotische Zellen ist. In dieser Reaktion werden Stressfaktoren erkannt, die Informationen weiter geleitet und so zahlreiche Mechanismen zur Beseitigung des Zellstresses veranlasst. Ohne diesen Vorgang würde bei den Zellen die Apoptose ausgelöst.

Eine solche ER-Stressantwort kann durch Akkumulation falsch gefalteter Proteine ausgelöst werden. Eine fehlerhafte Faltung kann etwa durch Zellgifte ausgelöst werden, wie zum Beispiel durch Tunicamycin, welches die N-Glykosylierung von Proteinen hemmt. [74] Über verschiedene intrazelluläre Signalwege wird in der sogenannten „unfolded protein response“ (UPR) die Proteinfaltungskapazität im ER erhöht, die globale Proteinsynthese reduziert und der ER-assoziierte Abbau missgefalteter Proteine gesteigert. [12, 53] Dies wird durch Regulation der Expression zahlreicher Gene erreicht, um auf Veränderungen in der Zelle zu reagieren und die zelluläre Homöostase wieder herzustellen. [110, 148] So findet zum Beispiel eine vermehrte Synthese von Chaperonen, den sogenannten molekularen Faltungshelfern, statt, um eine Akkumulation falsch gefalteter Proteine im ER zu unterbinden.

Es wird zudem angenommen, dass Zellen im Rahmen der UPR die Konzentration von bestimmten freien Proteinen im ER über eine Art Messfühler bestimmen und das Level der Transkription des Gens für diese Proteine anpassen können.

Entscheidend für die Erkennung von ER-Stress sind hierbei drei „Stresssensoren“: die Proteinkinasen Ire1 (Inositol-requiring enzym 1), PERK (Proteinkinase RNA-like Endoplasmatic Reticulum Kinasen) und der Transkriptionsfaktor ATF6 (Activation Transcription Factor 6) fungieren als Fühler für die Akkumulation ungefalteter Proteine. [53, 69] Ihre Aktivierung triggert spezifische adaptive Antwortmechanismen, um das Überleben der Zelle zu sichern. So haben sie einen Einfluss auf Translations-, Transkriptions- und Signaltransduktionsebene, sowie auf Splicingmechanismen. [7] Die Zielgene des UPR sind dabei Gene, dessen Produkte die Proteinfaltungskapazität erhöhen und die Homöostase wieder herstellen können.

So erhöht ER-Stress etwa die Aktivität der PERK Proteinkinase. Über direkte Phosphorylierung von eIF2 α nimmt PERK Einfluss auf die Translationsebene und damit auf die Produktion von Proteinen und deren Einstrom ins ER. [48] Über Induktion des ATF4 hat es zudem Einfluss auf die Transkription weiterer UPR Zielgene, wie Translationsfaktoren, antioxidative Faktoren und Transkriptionsfaktoren. [147] Als Antwort auf ER Stress spaltet die aktivierte zytosolische Domäne des IRE1 den Transkriptionsfaktor XBP1 (Xbox binding protein). Dieser reguliert UPR Stress Gene durch direkte Bindung von Promotorregionen im Nukleus nach oben. [11] Als dritter wichtiger Stresssensor wird ATF6 in den Golgi-Apparat transportiert und bewirkt als basischer Transkriptionsfaktor eine Hochregulation von etwa Chaperonen. [69] Wenn durch diese Mechanismen der Zellstress nicht abgebaut werden kann, wird die Zelle zuletzt der Apoptose zugeführt. [148] Dabei spielen die UPR Rezeptoren eine pro-apoptotische Rolle, insbesondere Ire1 and PERK. So aktiviert Ire1 durch Binden des Proteins TRAF2 einen JNK (C-Jun N-terminal kinase) Signalweg, welcher über die humane Procaspase 4 die Apoptose einleitet. [21]

Neben diesen Mechanismen zur Beseitigung des Zellstress, kommt es durch die Signalwege der UPR auch zur Triggerung einer Inflammationsreaktion. [149] Über Freisetzung freier Sauerstoffradikale, des activator protein 1 (AP1) und Aktivierung des NF- κ B kommt es etwa zu einer vermehrten Freisetzung an Zytokinen, wie TNF- α .

Bisher konnte gezeigt werden, dass Störungen der UPR eine Rolle bei neurodegenerativen Krankheiten [90] wie Morbus Alzheimer [140] oder Morbus Parkinson [135], sowie bei Krebserkrankungen [150], wie dem Hepatozellulären Karzinom [32] oder Stoffwechselstörungen wie Diabetes mellitus, Atherosklerose oder Adipositas [17] spielen.

Über die Mechanismen der UPR und ERAD sind Zellen in der Lage, eine adäquate Reaktion auf verschiedenartigen Zellstress zu zeigen und diesen abzuwehren. Diese hochkomplexen Mechanismen sind jedoch, wie beschrieben, von einer Vielzahl an Faktoren abhängig und demnach stark störanfällig. In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass OS9 eine Domäne mit Mannose-6-phosphat Rezeptor Homologie (MRH) besitzt, welche am ER-assoziierten Proteinabbau und damit an der Qualitätskontrolle neu synthetisierter Proteine beteiligt ist. [59] Es konnte zudem gezeigt werden, dass gute Liganden für die MRH-Domäne des OS9 verschiedene N-Glykane sind, die terminal einen α -1,6-verknüpften Mannoserest besitzen. [105] OS9 besteht aus 15 Exons, besitzt eine beta-Faltblattstruktur und ein Doppeltryptophanmotiv an der Oligosaccharid-Bindungsstelle, welches den α -1,6-verknüpften Mannoserest erkennt. [50] Diese Saccharide, besonders Mannose, spielen eine wichtige Rolle in der Markierung falsch gefalteter Proteine für den Abbau. [59]

Des Weiteren wird vermutet, dass das Trimmen der äußersten α -1,2-verknüpften Mannose am C-Arm der Glykane ein kritischer Prozess für ERAD Substrate ist, um mit Hilfe des OS9 in den Abbauweg eingespeist zu werden. [60] In einer Studie konnte weiterhin gezeigt werden, dass es bei Suppression der OS9 Expression zu einer partiellen Hemmung des Substratabbaus gekommen ist. Es ist somit ein Lektin, welches für die ERAD von Glykoproteinen erforderlich ist. [59] Fehlt OS9, kann dies eine Störung des komplexen ERAD bewirken, die zu einer Akkumulation falsch gefalteter Proteine und damit zu Zellschäden führen kann. Zur Klärung der Rolle des OS9 wurden monozytäre Zellelinien als Modell für Makrophagen verwendet. Durch Blockierung des OS9 durch siRNA kann beobachtet werden, ob und welchen Einfluss das Fehlen von OS9 auf das OS9 Expressionsverhalten und die Zytokinfreisetzung der Targetzellen hat und damit auf den Umgang der Zellen mit verschiedenen Stimulanzen.

In dieser Arbeit soll hierdurch untersucht werden, inwieweit eine genetische Prädisposition der Träger des Risikoallels für OS9 die Abwehr verschiedener Umweltstoffe erschwert oder sogar verhindert und so die Entstehung der Sarkoidose begünstigt.

Neben seiner wichtigen Funktion im Rahmen des ERAD interagiert OS9 außerdem mit dendritischen zellspezifischen transmembranären Proteinen (DC-STAMP) während der TLR (Toll-like-Rezeptor) getriggerten Reifung von dendritischen Zellen. Es wird daher angenommen, dass OS9 eine Rolle in der myeloiden Zelldifferenzierung und Zellfusion spielt. [71]



Abb.1.2 Die Abbildung zeigt die Signalsequenz des OS9, die eine Mannose-6-phosphat Domäne (MRH domain) beinhaltet.

Es wurden verschiedenen Stimulanzen in dieser Arbeit verwendet, darunter das Zellgift Tunicamycin. Es ist an der Akkumulation falsch gefalteter Proteine beteiligt. Dieses verursacht durch Hemmung der N-Glykosylierung von Proteinen deren Missfaltung. [144] Als Nukleosid-Antibiotikum ist es demnach durch Hemmung der Proteinsynthese enormer Stressor für Zellen und induziert eine UPR. [9]

Daneben wurde das Lipopolysaccharid (LPS), ein proinflammatorisches Endotoxin verwendet. Es befindet sich an der äußeren Zellmembran von gramnegativen Bakterien und kommt physiologisch in der Umwelt vor. Es wird jedoch auch mit Atemwegsinfektionen und Asthmaexazerbationen in Verbindung gebracht. [127] Bei LPS handelt es sich um einen Liganden des Toll-like-Rezeptor 4, der über diesen LPS/TLR4-Signalweg eine Induktion proinflammatorischer Zytokine bewirkt. [84] Über Bindung sogenannter LPS-Bindeproteine im Plasma werden zuerst Komplexe gebildet, von denen LPS auf CD14-Rezeptoren der Makrophagen bzw. Monozyten übertragen wird. Durch weitere Signaltransduktion wird hierdurch eine Aktivierung der Zelle mit vermehrter Zytokinsynthese bewirkt. [51] So kann LPS den Transkriptionsfaktor NF κ B (nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells) aktivieren und eine vermehrte TNF- α Freisetzung bewirken. [95] Außerdem kann es eine vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffmonoxid (NO) auslösen [157] und hierdurch eine Aktivierung der UPR und der ERAD provozieren. Es handelt sich bei LPS also ebenfalls um eine Stimulanz, die starken Zellstress verursachen kann und Toll-like-Rezeptor-4-vermittelt eine Induktion proinflammatorischer Zytokine verursacht, die für eine wirksame Immunantwort notwendig ist.

1.5 Das Zytokinnetzwerk der Sarkoidose

Ein Teil der Immunpathogenese der Sarkoidose wird durch eine Alveolitis bestimmt, in deren Verlauf es zu einem Anstieg an Zytokinen, löslichen Zytokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen für die Aktivierung von Immunzellen, sowie zur Induktion und Bildung von Granulomen kommt. Diese Zytokine werden von Alveolarmakrophagen, T-Zellen, dendritischen Zellen, Fibroblasten und Epithelzellen freigesetzt. [64, 168] Dabei kommunizieren die Immunzellen über dieses Zytokinnetzwerk, rekrutieren hierdurch weitere Zellen und führen entweder zu einer Spontanremission, einem Voranschreiten der Erkrankung oder gar einer Granulombildung. Die klinische Manifestation ist dabei von genetischen und immunologischen Komponenten abhängig. [92] In dieser Arbeit soll auch untersucht werden, ob und welchen Einfluss OS9 auf die Zytokinfreisetzung der Makrophagen hat. Dabei soll auf eine Abhängigkeit der Zytokinfreisetzung vom Genotyp der Patienten und Kontrollen geachtet werden.

Die Zytokine TNF- α und Interleukin 8

Bei dem Zytokin TNF- α handelt es sich um ein zentrales Zytokin. Hauptproduzenten für TNF- α sind Alveolarmakrophagen – insbesondere in der initialen Phase der Erkrankung. [34] Eine Bildung des TNF- α wird über Toll-like Rezeptoren, den MAP-Kinase-Weg sowie NF- κ B induziert. Eine Aktivierung kann hierbei durch zahlreiche Induktoren verursacht werden, wie etwa Lipopolysaccharide. Zudem kann eine Induktion über die drei beschriebenen UPR Signalwege erfolgen. [149]

So kommt es durch PERK (Proteinkinase RNA-like Endoplasmatic Reticulum Kinasen) zu einer Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen und hierüber auch zu einer Aktivierung des NF- κ B. Über die Proteinkinasen Ire1 (Inositol-requiring enzym 1) wird durch das activator protein 1 (AP1) und NF- κ B ebenfalls eine Inflammation getriggert. Zuletzt spielt auch der Transkriptionsfaktor ATF6 (Activation Transcription Factor 6) eine Rolle in der Aktivierung des NF- κ B. Die Signalwege der Unfolded protein reaction sind somit auch an der Entstehung einer Inflammationsreaktion beteiligt, in deren Rahmen es zu einer vermehrten Freisetzung von TNF- α kommt. TNF- α kann wiederum zur Akkumulation freier Sauerstoffradikale führen, welche zu einer Induktion der Unfolded protein reaction führt. [154]

Es konnte gezeigt werden, dass TNF- α nicht nur an der Bildung und Aufrechterhaltung der Granulome beteiligt ist, indem es zum Beispiel die Kollagensynthese stimuliert, sondern auch eine wichtige Rolle für die Induktion der irreversiblen Lungenfibrose spielt. [91] Zudem wirkt es als Mediator an der Inflammation und der zellulären Immunantwort mit. [92]

Die inflammatorische Antwort der Sarkoidose ist charakterisiert durch eine ansteigende Produktion verschiedener proinflammatorischer Zytokine und Chemokine. Dabei zeigen sich jedoch signifikante Unterschiede des Zytokingehalts bei Sarkoidosepatienten mit verschiedenen Krankheitsverläufen, die durch den unterschiedlichen Grad der Aktivierung der krankheitsvermittelten Immunzellen angezeigt wird. [94]

Ziegenhagen et al. konnten zeigen, dass TNF- α und Interleukin 8 bei Patienten mit progressivem Krankheitsverlauf signifikant mehr freigesetzt wurden als bei Patienten mit stabilem Krankheitsbild. [165] TNF α ist notwendig, um Granulome zu generieren und stabilisieren. [120] Werden neue Granulome sichtbar, zeigt sich auch ein Anstieg der TNF- α -Produktion. [33] Es wird vermutet, dass genetische Polymorphismen für die unterschiedliche Zytokinregulation verantwortlich sind. [164] In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Patienten mit höheren TNF- α Werten ein signifikant höheres Risiko einer Krankheitsprogredienz besitzen als Patienten mit niedrigeren Werten. [163] Durch diese Erkenntnisse kann TNF- α als prognostischer Parameter für den weiteren Krankheitsverlauf genutzt werden und Einfluss auf die Wahl der Therapie nehmen.

Im Rahmen der Immunpathogenese scheint außerdem eine neutrophile Alveolitis ein entscheidender Faktor zu sein. Es handelt sich bei Interleukin 8 um einen potenten neutrophilen chemotaktischen Faktor, der durch TNF und IL-1 induziert wird. Interleukin 8 steigt bei Fortschreiten der Erkrankung stark an – insbesondere bei Patienten mit progressivem Krankheitsverlauf. Gleichzeitig zeigt sich ein Anstieg der Neutrophilenzahlen bei progressiven Krankheitsverläufen im Vergleich zur stabilen Erkrankung. [165]

Eine genaue Analyse des Zytokinnetzwerks, zum Beispiel durch serologische Bestimmung der Zytokine und ihrer Rezeptoren, kann helfen, Risikopatienten zu selektieren und die Ausprägung als auch Aktivität der Erkrankung abzuschätzen. Zudem könnten eventuell Risikoprofile auf Grundlage der Phänotyp-assoziierten Haplotypen für einzelne Patienten erstellt werden. [164]

Eine Untersuchung des genauen Pathomechanismus und des Zytokinnetzwerks bei der Sarkoidose ist klinisch hilfreich, um zum einen neue Therapiestrategien zu entwickeln als auch neue prognostische genetische und molekulare Faktoren zu identifizieren. Diese können neben verbesserten Behandlungsmöglichkeiten, entscheidende prognostische Informationen liefern und Grundlage für die Entscheidung einer therapeutischen Intervention bilden.

1.6 Die Rolle des OS9 im Rahmen der Sarkoidose

Sarkoidose ist bis heute eine Multisystemerkrankung unklarer Genese. Die bisher identifizierten Umweltfaktoren und genetischen Faktoren sind eine nur unzureichende Erklärung für die Pathogenese der Erkrankung. Hoffmann et al. konnten jedoch in einer Studie OS9 (osteosarcoma amplified 9) als einen wahrscheinlichen Risikofaktor für Sarkoidose ermitteln. [56] Hoffmann et al führten in einer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS: genome wide association study) eine Analyse von 677 619 SNPs (single nucleotid polymorphism) an 637 deutschen Sarkoidosen und 1233 Kontrollen durch. Dabei identifizierten sie einen neuen Prädispositionslokus für Sarkoidose auf Chromosom 12q13.3-q14.1. Die Region 12q13.3-q14.1 wurde bisher schon in Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen beschrieben. So wurde dieser genetische Risikolokus im Rahmen der rheumatoiden Arthritis, Diabetes, Multipler Sklerose und Zöliakie untersucht. [6, 40, 43, 159] Das mutmaßliche Risikogen des OS9 spielt eine wichtige Rolle in der ERAD von un- oder falschgefalteten Proteinen. [146] Zusätzlich ist es an der myeloiden Differenzierung und Zellfusion beteiligt. [71] Aufgrund seiner Funktion im Rahmen des ERAD und der UPR [64] kann vermutet werden, dass das Fehlen des OS9 mitunter ein Grund für die Anreicherung falsch gefalteter Proteine sein kann und damit zu Zellschäden, Immunreaktionen und eventuell zur Granulomentstehung führt. So kann weiterhin angenommen werden, dass durch eine ausbleibende effiziente Immunantwort das „Sarkoidose-Antigen“ nicht eliminiert und eine Manifestation der Erkrankung nicht verhindert werden kann. Inwieweit OS9 hierfür verantwortlich ist, ist bisher noch unklar.

In der Studie von Hofmann et al zeigten sich Patienten mit Genotyp CC als homozygote Träger des Risiko-Allels rs 1050045. Daneben existieren noch die Genotypen TT und TC. Bei der Untersuchung der BAL-Zellen von Sarkoidosen in Abhängigkeit vom Genotyp zeigte der SNP rs 1050045 eine signifikante negative Korrelation der OS9 mRNA Expression mit dem Genotyp CC. In einer subphenotyp-spezifischen Analyse konnte zudem eine stärkere Assoziation dieses SNP mit der akuten Form der Sarkoidose als mit anderen Krankheitsverläufen festgestellt werden. Während die Abwesenheit von OS9 mit eher chronischen Verläufen und reduziertem CD4/CD8 T-Zellverhältnis assoziiert werden konnte, zeigte sich bei erhöhtem OS9 eine Assoziation mit einer aktiven Sarkoidose und einem erhöhten CD4/CD8 T-Zellverhältnis. [169] Außerdem wurde vermutet, dass bei Sarkoidosepatienten im Vergleich zu Kontrollpersonen eine erhöhte OS9 Expression vorliegt, welche mit einem ebenfalls erhöhten Anteil an Makrophagen einhergeht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Studie nach Hoffmann et al zum ersten Mal eine Assoziation der Sarkoidose mit der chromosomalen Region 12q13.3-q14.1 vorbringt. Dabei scheint OS9 einer der wahrscheinlichsten Kandidaten für eine grundlegende Prädisposition zu sein.

2. Fragestellung

In dieser Arbeit wurde die Induktion und Regulation des OS9 bei Sarkoidosepatienten untersucht. Es wurde die Frage untersucht, ob sich Unterschiede im OS9 Expressionsverhalten und im Umgang mit Sarkoidose-assoziierten Stimulanzen zwischen Sarkoidosepatienten und gesunden Kontrollen aufzeigen lassen. Hierfür wurden Zellen aus der bronchoalveolären Lavage und dem peripheren Blut von Sarkoidosepatienten und Kontrollen mit Granulom-assoziierten Stimuli stimuliert. Dabei soll insbesondere auf eine Abhängigkeit der Expression des OS9 sowie der Zytokinfreisetzung vom Genotyp der Sarkoidosepatienten und Kontrollen geachtet werden. So kann beobachtet werden, ob Patienten mit Genotyp CC eine andere Reaktion aufweisen, als Patienten, die keine oder nur heterozygote Träger des Risikoallels sind und ob es Zusammenhänge zur Entstehung und zum Verlauf der Erkrankung gibt. Zur weiteren Klärung der Rolle des OS9 wurden monozytäre Zelllinien verwendet. Diese wurden auf ihr OS9 Expressionsverhalten und ihre Zytokinfreisetzung untersucht. Des Weiteren wurden auch die Auswirkungen einer Blockierung des OS9 durch siRNA untersucht. So kann beobachtet werden, ob und welchen Einfluss das Fehlen von OS9 auf den Umgang der Zellen mit verschiedenen Stimulanzen hat. Indirekt lassen sich hierdurch Rückschlüsse ziehen, inwieweit eine genetische Prädisposition der Träger des Risikoallels für OS9 die Abwehr verschiedener Umweltstoffe erschwert oder sogar verhindert und so die Entstehung der Sarkoidose begünstigt.

- Wie zeigt sich das Expressionsverhalten von OS9 bei verschiedenen monozytären Vorläuferzellen?
- Wie wirken sich verschiedene Stressstimuli auf das Expressionsverhalten und die Mediatorfreisetzung von THP1-Zellen aus? Gibt es Unterschiede in Abhängigkeit des Reifegrades der THP1 Zellen?
- Kann durch Transfektion der THP1-Zellen durch OS9-siRNA eine Aussage zur Aufgabe des OS9 getroffen werden?
- Unterscheiden sich OS9 Expressionsverhalten und Zytokinproduktion von BAL-Zellen von Sarkoidosepatienten zu Kontrollpatienten? Haben Kontrollpatienten etwa bessere Möglichkeiten den durch Stimulanzen induzierten Zellstress abzuwehren?
- Gibt es eine Korrelation zwischen Genotyp der Sarkoidosepatienten und OS9 Expression sowie ihrer Zytokinproduktion? Hat etwa eine erhöhte OS-9 Expression einen protektiven Einfluss auf die Zellen?
- Gibt es eine Korrelation zwischen Genotyp der Sarkoidosepatienten und ihrer Zytokinproduktion an TNF- α und IL-8? Zeigen sich hier Unterschiede der Verlaufsformen der Erkrankten in Abhängigkeit des Genotyps?
- Kann OS9 als genetischer Prädispositionsfaktor für Sarkoidose gesehen werden?

3. Material

3.1 Geräte und Software

Begasungsbrutschrank	Heraeus, Stuttgart, D
Eismaschine	Scotsman, Polignano Milanese, Milan, I
ELISA-Reader, μ Quant™	Bio-Tek Instruments, Inc., Götendorf, D
Heizblöcke	AccuBlock, Labnet International INC, Edison, USA
MACS Cell Sorter Gladbach, D	VarioMACS, MidiMACS, Miltenyi Biotec, Bergisch
Magnetic Cell Separation	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Magnetrührer	IKA-Labortechnik, Staufen, D
Mehrkanalpipetten	Eppendorf GmbH, Hamburg, D
Mikroskope	CK2, Olympus, Hamburg, D BX60, Olympus, Hamburg, D Axiolab A, Carl Zeiss Microscopy, Jena, D
Multistep-Pipette	Eppendorf GmbH, Hamburg, D
Neubauer-Zählkammer	Brand.Wertheim/Main, D
Nunc-Immuno Wash 12	Nunc, Roskilde, DK
Sterilbank	Captair, Erlab D.F.S., Köln, D HeraSafe, Heraeus Instruments GmbH, Fellbach, D LaminAir HB2448, Heraeus Instruments GmbH, Fellbach
PCR-Gerät	TGradient Thermocycler, Biometra GmbH, Göttingen, D iCycler, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Pipetboy	IBS Integra Bioscience, Fernwald, D
Pipetten	Thermo Labsystems, Egelsbach, D Eppendorf, Hamburg, D
Präzisionswaage Scaltec	Scaltec, Heiligenstadt, D
Schüttler	Heidolph Elektro GmbH, Kelheim, D
Transferpipette	Brand, Wertheim/Main, D
Vortexer	VortexMixer, neoLab, Heidelberg, D Whirli Mixer, Laboratory FSA Supplies, Loughborough, UK
Wasserbad	Köttermann GmbH und Co. KG Labortechnik, Uetze, D VarioMAC, Thermo Scientific, Waltham, D
Zentrifugen	Biofuge fresco, Heraeus Instruments GmbH, Fellbach, D Sprout, Biozym Scientific GmbH, Hess Oldendorf, D

Zentrifugen	Rotanta 460RS, Hettich, Bäch, Schweiz Rotixa/RP, Hettich, Bäch, CH Typ 2043, Hettich, Bäch, CH Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg, D Labofuge 400 R, Heraeus Instruments GmbH, Fellbach, D Shandon Cytospin 3, Thermo Electron GmbH, Dreiech, D
-------------	--

Software

Adobe Photoshop 5.0.1	Adobe Systems, San Jose, USA
CellF	Olympus, Hamburg, D
iCycler iQ 3.0 Software	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Microwin Vers. 4	Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath, D
StatView5.01	SAS Institute Inc., Cary, NC, USA

3.2 Verbrauchsmaterialien

Dispenser-Tips	Finnpipette, Thermo Labsystems, USA
EDTA-Monovetten	Sarstedt, Nürnberg, D
ELISA-Platten 96 Well	Nunc, Roskilde, Dänemark
Handschuhe Sensiclean	
Latex/Nitratex	Ansell, München, D
Kulturflaschen	Costar, Corning Inc., Bodenheim, D Becton Dickinson, Labware, Lincoln Park, USA
Kulturplatten 6 well	Costar, Corning Inc., Bodenheim, D
Kulturplatten 12 well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
MACS LD- und LS-Säulen	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D
Micron Centrifugal Filter Devices	Millipore Cooperation, Billerica, USA
Objektträger, Glas	R. Langenbrinck, Emmendingen, D
Objektträger 8-Kammern	Brand, Wertheim/Main, D
PCR-Platten	Thermo Scientific (ABgene), Surrey, UK
PCR: Optically Clear	
Adhesive Seal Sheets	Thermo Scientific (ABgene), Surrey, UK
PCR 8er-SoftStripes (0.2 ml)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D Thermo Scientific (ABgene), Surrey, UK ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Pipetten (5µl, 10µl, 25µl)	Costar, Corning Inc., Bodenheim, D
Pipettenspitzen	Brand, Wertheim/Main, D
(0,1µl-10µl,200µl, 1000µl)	Sarstedt, Nümbrecht, D
	ratiolab GmbH, Dreieich, D
	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Reagenzröhrchen (15, 50 ml)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, D
Reaktionsgefäße	nerbe plus, Winsen/Luhe, D
(0,75/ 1,5/ 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, D
Zellkulturflaschen 175 cm ²	BD Falcon, Bedford, USA
Zellkulturflaschen 75cm ²	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, D
<u>Zelllinien</u>	
THP1-Zellen	DSMZ, Braunschweig, D
U937	ATCC, Manassas, VA, USA
HL60	ATCC, Manassas, VA, USA
Zellschaber	Costar, Corning Inc., Bodenheim, D

3.3 Chemikalien, Medien und Stimulanzen

Absolute QPCR SYBR Green	Thermo Scientific ABgene, Epsom, UK
Fluorescein Mix	
Aceton	Merck, Darmstadt, D
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich, Deisenhofen, D
Aqua	B.Braun, Melsungen, D
Chloroform	Merck, Darmstadt, D
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt, D
DMEM +L-Glutamin	Gibco Invitrogen, Paisley, UK
DMSO	Sigma Aldrich, Deisenhofen, D
D-PBS	Gibco Invitrogen, Paisley, UK
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
Fetal Calf Serum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, A
Formaldehyd 37%	Carl Roth GmbH, Carl Roth, D
iScript cDNA Synthesis Kit	BioRad Laboratories, Hercules, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Lipoarabinomannan (LAM)	
des Mycobacterium smegmatis	InVivoGen San Diego, USA
Lipopolysaccharid (LPS)	

von E.coli	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
MACS-Puffer: 475ml D-PBS (steril), 2ml EDTA 0,5M (steril), 25ml BSA 10% (steril filtriert)	
Natriumhydrogen- phosphat	Merck, Darmstadt, D
Nuclease free water	Ambion, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Phorbol12-mycistate13-acetate	
PMA	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, D
Propionibacterium acnes	Eigenherstellung, Labor Pneumologie, Freiburg,D
RPMI 1640 Medium	
+ L-Glutamine	Gibco Invitrogen, Paisley, UK
Salzsäure	Merck, Darmstadt, D
Schwefelsäure	Merck Darmstadt, D
Streptavidin-HRP	Sigma Aldrich, Deisenhofen, D
TDM: Trehalose-6,6`-dimycolate	
Cord Factor (endotoxin-free grade)	
isolated from M.tuberculosis	Enzo, Life Sciences GMBH, Lörrach, D
Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma, Deisenhofen, D
TRizol® Reagent	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Trypanblau-Lösung	Merck, Darmstadt, D
Tunicamycin	
from Streptomyces sp.	Sigma-Aldrich, Taufkirchen,D

ELISA

TMB 100ml

20mmol/l Tetramethylbenzidine (TMB)	= 480mg
100ml/l Aceton	= 10ml
900ml/l Ethanol	= 90ml
50mmol/l H2O2 (30%)	= 200µl

Citratbuffer

6,3g Kaliumcitrat (Zitronensäure-Monohydrat) + 800ml Aqua dest.
 ph auf 4,1 einstellen mit Natronplättchen oder konz. NaOH
 Auffüllen mit Auqa dest auf 1000ml

ELISA-Waschpuffer:

10xPBS + 0,05%Tween (NaCl, Na₂HPO₄, KCl, KH₂PO₄); ph=7

ELISA-Stopplösung:

4N H₂SO₄

3.4 Primer, Antikörper und Transfektionsreagenzien

Primer

OS9_F // OS9_R

GAPDH_RISP//LIPS

Gipie_R4//F4

biomers.net, Söflingen, Ulm, D

	F/LISP	R/RISP
OS-9	5'- gctgactgat...acacga -3'	5'- cggttaattgc... ...cagctc -3'
Gap-DH	5'- caccagggct...ttaact -3'	5'- gactcctc.. ...aafatf -3'

Antikörper

DuoSet-TNF- α

Capture/Detection-Antikörper

Immunotools,Oldenburg, D

Il-8 Biotin Conjugate (anti-human)

Il-8 Capture Antibody

Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D

MACS

CD14+ Microbeads, human

Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D

Anti-Biotin Microbeads

Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D

Transfektionsreagenzien

OS-9 siRNA (h) sc-96230

Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg,D

Control siRNA-A sc-37007

Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg,D

peqFECT DNA

Transfection Reagent

peQlab Bitotechnologie GmbH, Erlangen,D

4. Methoden

4.1 THP1-Zellreihe

4.1.1 Zellkultur und Zellzählung

Zur Untersuchung der Reaktion von Makrophagen bzw. Monozyten auf verschiedene Stimuli wurde in den Versuchen das Modell der monozytären THP1-Zellreihe verwendet.

In den Vorversuchen wurden verschiedene monozytäre Vorläuferzellen getestet. Dabei handelte es sich um HL-60-, U937- und THP1-Zellen.

Bei den HL60-Zellen handelt es sich um humane promyelozytische leukämische Zellen, die von einer 36 Jahre alten Patientin mit akuter promyeloischer Leukämie isoliert wurden.

Die Zelllinie der U937 wird ebenfalls zur Untersuchung monozytärer Eigenschaften verwendet und wurde von einem 37 Jahre alten Mann mit histiozytärem Lymphom isoliert.

Die dritte Zelllinie THP1, welche untersucht wurde, stammt aus dem peripheren Blut eines 1 Jahr alten Jungens mit akuter myeloischer Leukämie aus dem Jahre 1978. Diese Zellreihe lässt sich dem Reifungsstadium zwischen Promonozyt und Monozyt zuordnen.

Da die THP1-Zellen in den Vorversuchen neben einer niedrigen basalen Expression eine gute Steigerbarkeit durch Stimuli zeigten, wurden diese für die Versuchsreihen gewählt. Die Zellen besitzen phagozytoseähnliche Eigenschaften und können Zytokine, Chemokine und andere Mediatoren produzieren.

Die für die Versuche verwendeten THP1-Zellen wurden in RPMI-Medium kultiviert, einem Zellkulturmedium, welches Mitte der 1960er Jahre am Roswell Park Memorial Institut entwickelt wurde. Phenolrot wurde dem Medium als Indikator für den pH-Wert zugesetzt. Außerdem wurden 10% Fetales Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin /Streptomycin zugegeben. (Abb.4.1)

Name	Komponenten	Konzentration/Volumen	Hersteller
RPMI 1640	Fertigmedium	1x	Invitrogen GmbH
P/S	Penicillin Streptomycin	Penicillin: 50 000 U Streptomycin: 50 mg/ml	Biochrom
FCS	Fetales Kälberserum	1x	PAA Laboratories

Abb.4.1 Es wurden das Medium und Komponenten aufgelistet, die zur gebrauchsfertigen Medienherstellung benötigt wurden.

Die Kultivierung der Zellen sowie die Stimulationen erfolgten bei 37°C und 5%CO₂ im Brutschrank. Für den Mediumwechsel wurden die nicht adhärenen Zellen in der Zentrifuge gewaschen und dann mit neuem Medium resuspendiert. Vor einem Versuchansatz wurden die Zellen in 10ml Medium gelöst und 10µl hiervon mit 90µl Tryphanblau vermischt - Verdünnung 1:10. So konnte die durchschnittliche Zellzahl unter dem Lichtmikroskop mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt werden. Diese besteht aus vier Quadranten. Die Vitalität der Zellen ließ sich mittels Tryphanblau darstellen. Während sich lebende Zellen mit intakter Zellmembran ungefärbt zeigen, färben sich tote Zellen blau an.

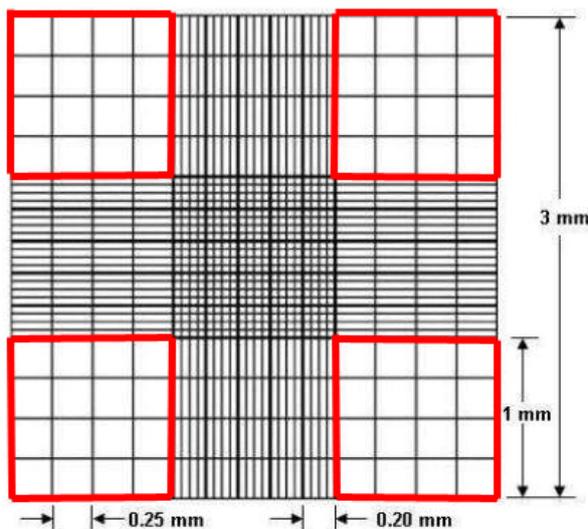


Abbildung 4.2: Schema des Rasters einer Zählkammer

Quelle: http://www.peqlab.de/wcms/de/pdf/84-DHCN-02_m.pdf

Mit Hilfe einer Formel konnte so die Gesamtzellzahl ermittelt werden:

$$\text{Zellzahl} = (A / 4) \times B \times C \times 10\,000$$

A: Anzahl der Zellen in 4 großen Quadranten

B: Verdünnungsfaktor (hier 10)

C: Volumen der Zellsuspension (hier 10ml)

Vereinfacht ergibt sich also folgende Formel: $ZZ = (A/4) \times 1 \text{ Mio.}$

Für die einzelnen Versuche wurde das Verhältnis 1 Millionen Zellen pro ml Medium gewählt.

4.1.2 THP1-Reifung mittels PMA

THP1-Zellen differenzieren durch Zusatz des Phorbolesters PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) in 72 h zu makrophagenähnlichen Zellen aus. Dieser in vitro Prozess wurde in einer 12-well-Platte durchgeführt. 1 Million Zellen pro ml Medium wurden jeweils 10µl PMA einer 5µM Lösung zugefügt – somit 50nM PMA. Nach Inkubation bei 37°C für 72h wurde im Lichtmikroskop sichtbar, dass die Zellen adhären geworden sind. Dies spricht für eine erfolgreiche Reifung. Vor anstehender Stimulation wurde ein erneuter Mediumwechsel durchgeführt.

4.2 Stimulation und Versuchsansatz

4.2.1 THP1-Zellen

Die nicht-adhärenenten THP1-Zellen wurden vor einem Versuch für 5 Minuten bei 5000 rpm zu einem Zellpellet abzentrifugiert und anschließend nach oben beschriebenem Schema gezählt. Zur Stimulation der THP1-Zellen wurde jeweils 1 ml RPMI-Medium mit 10%FCS und 1%Pen/Strep mit 1 Million Zellen in eine 12-well-Platte gegeben. Anschließend wurde dem jeweiligen well ein Stimulanz zugegeben.

Es wurden insgesamt vier Versuchsansätze durchgeführt:

- 1) Die THP1 –Zellen wurden im ungereiften Zustand stimuliert (siehe folgende Stimulationsreihe) - für 24 h.
- 2) Induktion der Reifung der THP1-Zellen mittels 50nM PMA für 72h. Vor anstehender Stimulation wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Stimulation selbst erfolgte für 24h.
- 3) Induktion der Reifung der THP1-Zellen mittels 50nM PMA mit Inkubation bei 37°C für 72h. Nach Mediumwechsel wurden die Zellen für weitere 72h inkubiert. Die Stimulation fand nach erneutem Mediumwechsel für 24 h statt.
- 4) Simultane Stimulation und Reifung der THP1-Zellen für 72h.

Die Stimulationsreihe für die verschiedenen Ansätze sah folgendermaßen aus:

- 0) nativ: vor Stimulation nach 72h Reifung
- 1) unstimuliert (nach 24h)
- 2) Lipopolysaccharid (LPS) 1µg/ml
- 3) Tunicamycin 10nM
- 4) Tunicamycin 100nM
- 5) Tunicamycin 10000nM
- 6) Lipopolysaccharid 1µg/ml + Tunicamycin 10nM
- 7) LAM 10µg/ml
- 8) Lipoarabinomannan (LAM; Mycobacterium smegmatis) 10µg/ml + Tunicamycin 10nM
- 9) Mycobacterium tuberculosis 10µg/ml
- 10) Mycobacterium tuberculosis 10µg/ml + Tunicamycin 10nM
- 11) Propionibacterium acnes 10µg/ml
- 12) Propionibacterium acnes 10µg/ml + Tunicamycin 10nM
- 13) TDM – Cord-factor 5µg/ml
- 14) Cord-factor: 5µg/ml + Tunicamycin 10nM

Die stimulierten Zellen wurden daraufhin mit 200µl Trizol lysiert. Die Überstände wurden bei -20°C weggefroren. Diese standen so für die Durchführung eines TNF-α- und IL-8-ELISA zur Verfügung.

4.2.2 BAL-Zellen

Bei einer broncho-alveolären Lavage handelt es sich um ein diagnostisches Verfahren, um Untersuchungsmaterial aus dem peripheren Lungengewebe zu gewinnen. Hierfür wird mittels eines Bronchoskops, welches den Bronchus in der sogenannten „wedge-Position“ kurzzeitig verschließt, Spülflüssigkeit über einen Instrumentierkanal eingebracht. Diese gelangt in den von diesem Bronchus versorgten Lungenabschnitt bis hin zu den Alveolen und reichert sich dort mit Zellen, Proteinen etc. an. Die Flüssigkeit wird daraufhin wieder abgesaugt. Auf diese Weise können Proben aus den peripheren, mit dem Bronchoskop nicht erreichbaren, kleinen Bronchien und Alveolen gewonnen werden. Die BAL-Zellen können neben der Untersuchung auf Erreger, Zellen, ihre Zusammensetzung und Zellbestandteile auch für experimentelle in vitro Versuche genutzt werden. So kann die Reaktion dieser Zellen auf verschiedene Stressstimuli untersucht werden.

Für die Stimulation der BAL-Zellen wurden Proben von Sarkoidosepatienten und freiwilligen Kontrollpersonen verwendet. Diese Probanden wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt: keine bekannte Lungenerkrankung und keine Allergien. Die BAL-Zellen wurden am gleichen Tag durch eine Bronchoskopie gewonnen. Die Zellen wurden dann nach oben beschriebenen Verfahren in eine 12-well-Platte gegeben. Auch hier wurde RPMI-Medium mit 10%FCS und 1%P/S verwendet. Die Stimulation fand daraufhin für 24 h statt – nach folgender Stimulationsreihe:

- nativ
- unstimuliert
- LPS 1µg/ml
- Tunicamycin 10nM
- LPS 1µg/ml + Tunicamycin 10nM
- LAM 10µg/ml
- LAM 10µg/ml + Tunicamycin 10nM
- Mycobacterium tuberculosis 10µg/ml
- Propionibacterium acnes 10µg/ml
- TDM – Cord-factor 5µg/ml

Für die Nativprobe wurden 1 Mio. Zellen direkt nach Abnahme der BAL in 200µl Trizol gelöst weggefroren. Auch hier wurde eine PCR der Zellen und ELISA der Überstände angestrebt.

4.3 RNA-Isolierung

Aus den mit Trizol versetzten Zellen (THP1 bzw. BAL-Zellen) wurde nach folgendem Protokoll RNA isoliert:

Als Erstes findet eine Phasenseparation statt. Hierfür werden die Zellen in Reaktionsgefäßen für 5 Minuten bei 30°C im Heizblock inkubiert, dann mit 50µl Chloroform versehen und für etwa 15 Sekunden mit Hilfe des Vortexmischers gemischt. Nach weiteren 3 Minuten bei 30°C Inkubation werden die Reaktionsgefäße bei 12700rpm für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. In der anschließenden RNA-Präzipitation wird die wässrige, durchsichtige Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die leichte, phenolhaltige rote Phase wird verworfen. Nach Zugabe von 100µl Isopropanol und Vortexen von 15 Sekunden wird für 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Daraufhin wird für 10 Minuten bei 12700g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Nach erfolgter Präzipitation findet nun die RNA-Reinigung mit 200µl 75%Ethanol statt – nach Mischen der Substanzen werden die Zellen bei 7500rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgekippt und das RNA-Pellet wird an der Luft für mindestens 30 Minuten getrocknet. Zur Wiederaufnahme der RNA wird das Pellet nun mit 30µl DEPC-H₂O (nukleasefreies Wasser) resuspendiert und dann für 10 Minuten bei 60°C inkubiert. Die RNA kann nun für die Umschreibung in cDNA verwendet werden oder bei -20°C weggefroren werden.

4.4 Umschreibung RNA in cDNA

Nach erfolgter RNA-Isolierung wurde diese mit Hilfe des iScript –cDNA Synthesis Kits in cDNA umgeschrieben. Hierbei wird die komplementäre DNA (cDNA) durch das Enzym Reverse Transkriptase hergestellt.

Für die Reverse Transkription wurden folgende Komponenten zusammengefügt:

X mal 4µl iScript reaction mix

X mal 1µl iScript reverse transcriptase

Dabei ist X gleich der Anzahl der benötigten Reaktionen +1.

Es wurden je 5µl dieser Mischung in 0,2ml Röhrchen vorgelegt.

Dieser wurden 15µl RNA - vorverdünnt mit DEPC-H₂O im Verhältnis 1:3 - zugegeben.

So ergab sich ein Gesamtvolumen von 20µl. Die Umschreibung erfolgte in einem Thermocycler des Typs iCycler.

Die Reverse Transkription fand mit folgendem Programm statt:

- 25°C für 5 min.
- 42°C für 30 min.
- 85°C für 5 min
- Abkühlen auf 8°C

4.5 rt-PCR – Realtime polymerase chain reaction

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um ein Verfahren zur Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Hierbei wird mit Hilfe einer hitzestabilen Taq-Polymerase ein bestimmter DNA-Abschnitt verdoppelt.

Die PCR kann verwendet werden, um die Expression von DNA-Abschnitten, insbesondere die Expression einzelner Gene zu untersuchen.

Essentielle Bestandteile für die Vervielfältigung von DNA sind neben der cDNA DNA-Polymerasen, Nukleotide, spezielle Primer, ein Polymerasepuffer und Nuklease freies Wasser. Eine DNA-Verdopplung entspricht einem Zyklus und erfolgt in drei Teilschritten. Bei diesen Schritten handelt es sich um die Denaturierung, die Primerhybridisierung, das sogenannte Annealing und die Elongation, auch Amplifikation genannt. Diese Prozesse wurden in einem iCycler durchgeführt, welcher optimale Temperaturbedingungen für die einzelnen Teilschritte schafft.

Zunächst wurde das Enzym für 15 Minuten bei einer Temperatur von 95°C aktiviert und gleichzeitig die cDNA-Stränge denaturiert, so dass nur noch Einzelstränge vorliegen. Bei 57°C findet das Annealing statt. Die Primer, welche aus einer für das Zielgen spezifischen Oligonukleotidabfolge bestehen, können an die Einzelstrang-DNA binden. Die Basensequenzen der Primer wurden hierbei so gewählt, dass der gewünschte DNA-Abschnitt amplifiziert wurde. Es sind pro Zielgen zwei Primer notwendig – ein Primer mit vorwärts gerichteter Ableserichtung (forward) und ein Primer mit rückwärts gerichteter Ableserichtung (reverse). Die Primer-Hybridisierung benötigt etwa 15 Sekunden und wird bei jedem Zyklus wiederholt.

In der anschließenden Amplifikation wurde für 20 Sekunden eine Temperatur von 72°C erreicht, der optimalen Arbeitstemperatur für die taq-Polymerase.

Das SYBR Green kann nun an die DNA-Doppelstrang binden und die Fluoreszenz gemessen werden.

Der nun folgende Zyklus beginnt mit einer Denaturierung für 10 Sekunden bei 95°C. Es werden insgesamt 45 Zyklen durchgeführt. Zuletzt werden die Proben auf 4°C abgekühlt.

In der anschließenden Schmelzkurvenanalyse konnte durch Erhöhung der Temperatur die Bestimmung der spezifischen Schmelztemperatur des PCR-Produkts erfolgen und so die Spezifität der Amplifikation für bestimmte Gene überprüft werden. Hierfür wurde die Temperatur schrittweise (0,2°C Schritte) von 55°C auf 95°C erhöht bis die DNA in Einzelsträngen vorlag.

Die Auftrennung der amplifizierten DNA-Abschnitte sollte hierbei zum gleichen Zeitpunkt erfolgen, da die Abschnitte die gleiche spezifische Länge besitzen. Dabei kommt es zu einer schlagartigen Änderung der Fluoreszenz durch Freisetzung des SYBR Green.

Der hierfür notwendige Reaktionsansatz beinhaltet je Probe 12,5 µL PCR-Mix (*Absolute SYBR Green Fluorescein Mix, Thermo Scientific*) verwendet. Dieser PCR-Mix enthält neben dem Fluoreszin auch Puffer, dNTPs und die taq-Polymerase.

Außerdem wurden je 1,26 µL der unterschiedlich orientierten Primern von OS9 und 9,3 µL Nuklease-freies Wasser hinzugegeben. (Abb.4.3)

Number of samples	IQ Mix µl	Primer Left 20µM µl	Primer Right 20µM µl	DEPC H ₂ O µl
1	12,5	0,63	0,63	9,30
5	62,5	3,13	3,13	46,30
20	250	12,50	12,50	185,0
28	350	17,50	17,50	259,0
32	400	20,00	20,00	296,0

Abb4.3. Der hierfür notwendige Reaktionsansatz beinhaltet folgende Bestandteile und wurde folgendermaßen angesetzt.

Es wurden je 23µl des PCR-Gemischs auf die PCR-Platte aufgetragen und 2µl der Probe hinzugegeben. Die cDNA wurde zuvor im Verhältnis 1:5 mit Nuklease freien Wassers verdünnt. Dies entspricht einem Gesamtvolumen von 25µl.

Nach Abdecken der Platte wurde noch einmal zentrifugiert. Anschließend wurde mit dem PCR-Programm im *iCycler IQ (Bio-Rad)* nach oben beschriebenen Schema amplifiziert.

Um die amplifizierte DNA zu quantifizieren, wurde eine Realtime-PCR (rt-PCR) durchgeführt. Hierbei wurde SYBR Green, ein Cyanin-Farbstoff, verwendet, welcher bei Interkalierung in doppelsträngige DNA zu fluoreszieren beginnt. Dabei ist der Grad der Fluoreszenz linear abhängig von der Menge an DNA. Diese konnte somit über Ermittlung der Lichtemission durch den Komplex aus DNA und SYBR Green bestimmt werden. Die Fluoreszenz wurde während der rt-PCR nach jedem Zyklus gemessen. Zu einem bestimmten Zeitpunkt übersteigt diese die Hintergrundfluoreszenz. Die Anzahl der zu diesem Zeitpunkt absolvierten Zyklen wird als cycle threshold (ct-Wert) definiert. Dieser Wert ist umso niedriger, je häufiger ein DNA-Abschnitt in der cDNA-Probe vorkommt, da hierdurch umso früher die kritische Fluoreszenz gemessen wird.

Der Gehalt an spezifischer DNA muss verglichen werden können. Deshalb wird ein Reporter- oder auch Haushältergen (housekeeping gene) gewählt, welches unabhängig vom Zellstadium konstitutiv exprimiert und nicht reguliert wird.

Hier wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Die ct-Werte des GAPDH wurden zur relativen Quantifizierung in Relation zu den ct-Werten des zu untersuchenden Gens gesetzt. So konnte rechnerisch die relative Expression (rE) bestimmt werden. Dies fand durch eine modifizierte Delta-Delta Methode mittels folgender Formel statt:

$$rE = 2^{(ct(\text{GapDH})-ct(\text{Zielgen}))} \times 10\,000$$

4.6 MNC-Isolierung

Um die Reaktion von Monozyten auf verschiedene Stressstimuli zu untersuchen, wurden diese aus dem peripheren Blut von freiwilligen Probanden isoliert.

Im venösen Vollblut finden sich verschiedene Zellgruppen, darunter Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten, Monozyten/ Makrophagen und Lymphozyten.

4.6.1 Isolation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

In einem ersten Schritt werden nun die sogenannten „peripheren mononukleären Zellen“ (PBMCs) gewonnen. Diese bestehen vor allem aus Monozyten und Lymphozyten. Dabei wird die Tatsache genutzt, dass diese Zellen eine geringere Dichte besitzen als die restlichen Blutzellen. So können die PBMCs durch Zentrifugation über einen Ficoll-Dichtegradienten (1,077g/cm³) abgetrennt werden.

Diese sammeln sich der Phase zwischen Plasma und Ficoll an, während die Erythrozyten und Granulozyten durch ihr höheres spezifisches Gewicht auf den Boden in die Ficollphase sinken und dort sedimentieren.

Das peripher venös abgenommene Blut der freiwilligen Probanden wurde 1:2 mit PBS verdünnt. Es wurde vorsichtig in einem 50ml Falcon auf 20ml Ficoll geschichtet.

Anschließend wurde bei 1700rpm und 20°C für 20 Minuten zentrifugiert. Hierbei finden sich die mononukleären Zellen in der Phasengrenze zwischen Plasma und Ficoll ein – nun konnten diese vorsichtig mit Hilfe einer Pipette abgenommen werden.

Die Zellen wurden daraufhin mit PBS bei 300g und 20°C für 10 Minuten gewaschen und der Überstand verworfen.

Die restlichen, trotz Dichtegradientenzentrifugation noch in der PBMC-Fraktion verbliebenen Erythrozyten wurden mit 10ml 0,2% NaCl-Lösung für 30 Sekunden lysiert, dann wurde mit 10ml 1,6% NaCl-Lösung eine isotonische Lösung hergestellt und abschließend wiederum mit PBS gewaschen.

Die so gewonnene PBMC-Fraktion besteht nun aus einem Gemisch aus Lymphozyten und Monozyten, sowie einem geringen Anteil an Makrophagen, dendritischen Zellen und basophilen Granulozyten.

4.6.2 Isolation von Monozyten aus PBMCs

Im nachfolgenden Verfahren wurden aus dem PBMC-Gemisch Monozyten isoliert – dies konnte mit Hilfe des MACS-Systems (Magnetic Cell Sorter) erfolgen.

Dieses System nutzt die Eigenschaften bzw. die spezifischen Oberflächenstrukturen der Zellen aus, um diese zu markieren und über ein Magnetfeld von den anderen Zellen abzutrennen.

Zu Beginn wurden die Zellen mit Magnetpartikeln - gebunden an Antikörpern - inkubiert, den sogenannten MicroBeads. Dabei binden die Antikörper spezifisch Oberflächenstrukturen von Zellen an die gewünschte Zellpopulation.

Die so markierten Zellen wurden hierdurch beim Durchfluss durch eine von einem Magnetfeld umgebene Säule zurückgehalten. Die nicht markierten Zellen durchlaufen die Säule problemlos und können aufgefangen werden.

Die zurückgehaltenen Zellen können durch Entfernen des Magnetfelds gewonnen werden – es findet also eine Positiv-Selektion statt. Die Zellen werden mit einem typischen Oberflächenmarker für Monozyten, dem CD14 Antikörper, inkubiert.

Im Genaueren wurde als Erstes die Zellzahl des PBMC-Gemisch bestimmt und in 30µl pro 10^7 MACS-Puffer (PBS + EDTA + BSA) gelöst.

In einem weiteren Schritt wurden CD14 Microbeads mit je 20µl pro 10^7 Zellen hinzugegeben und erneut für 15 Minuten auf Eis inkubiert.

Die LS Separationssäule wurde vorab mit MACS-Puffer gespült.

Nach einem Waschvorgang mit etwa 1 bis 2ml MACS-Puffer wurden die Zellen in 500µl MACS Puffer gelöst und auf die LS Separationssäule gegeben.

Die Säule wurde anschließend dreimal mit 3ml MACS-Puffer gewaschen.

Nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld werden 5-6ml MACS-Puffer in die Säule gegeben. Mit Hilfe eines Stempels werden die markierten Zellen aus der Säule gelöst und aufgefangen.

4.7 ELISA – Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein Verfahren zur Detektion und Quantifizierung von Molekülen – in dieser Arbeit von den Zytokinen TNF- α (Tumornekrosefaktor) und Interleukin-8 (IL-8).

4.7.1 TNF- α

Zu Beginn des ELISA findet ein „Coating“ statt. 25 μ l des 1. TNF- α - Antikörpers wird mit 5,5ml PBS gemischt. Von der Mischung mit einer Konzentration von 4 μ g/ml wird je 50 μ l in ein Well gegeben. Die Antikörper werden über Nacht auf der Platte im Kühlschrank belassen. Am folgenden Tag werden die nicht gebundenen Antikörper abgewaschen und die Platte für etwa 1,5-2 Stunden „geblockt“ – dies findet mit 200 μ l DPBS +1%BSA bei Raumtemperatur statt. So wird eine unspezifische Bindung verhindert. In dieser Zeit werden die Proben und der Standard angesetzt. Die Proben entsprechen den Überständen, die nach Stimulation der Zellen (THP1 oder BAL) abgenommen wurden und jeweils zweimal gemessen werden. Sie werden zum großen Teil verdünnt – mit DPBS + 1%BSA. Es wird eine Standardreihe mit einem Maximum von 1000pg pro ml gewählt.

Nach Entfernen der Blocking-Flüssigkeit werden die Proben und der Standard mit je 50 μ l auf die Platte aufgetragen und für 2-3 Stunden belassen. Bei diesem Vorgang können die TNF- α Moleküle, die sich im Überstand befinden, spezifisch an den Antikörper binden. Daraufhin erfolgt ein vierfacher Waschvorgang. Im Anschluss daran wird 50 μ l der TNF- α Detektions-Antikörper-Verdünnung aufgegeben. 25 μ l dieses Sekundärantikörpers wurden zuvor in 5,5ml DPBS +1%BSA gemischt – entspricht also einer Konzentration von 0,5 μ g/ml.

Der Antikörper wird für mindestens zwei Stunden auf der Platte inkubiert. Er bindet an ein anderes Epitop des TNF- α und ist an Biotin gekoppelt, welches hoch affin für Streptavidin ist. Nach erneutem Waschen wird Streptavidin-HRP in einer 1:200 Verdünnung mit je 50 μ l aufgetragen. Es werden 30 μ l Streptavidin-HRP in 6ml DPBS +1%BSA gegeben und gut gemischt. Das Streptavidin ist mit HRP (horseradish-peroxidase) konjugiert und wird für 25 Minuten inkubiert. Es wird erneut gewaschen und eine Farbreaktion durch Zugabe von 50 μ l TMB/Citratpuffer ausgelöst. Hierfür werden 550 μ l TMB mit 11ml Citratpuffer gemischt, welches hier als chromogenes Substrat fungiert. Die Proben und Standardlösungen verfärben sich hierdurch blau – je nach Konzentration langsamer oder schneller. Die Platten werden hierbei abgedeckt, um sie vor Licht zu schützen.

Nach etwa 20 Minuten, je nach Geschwindigkeit der Verfärbung wird die Reaktion gestoppt. Bei der Stopplösung handelt es sich um 50 μ l 4 N Schwefelsäure. Nach Abstoppen der Reaktion wird die ELISA-Platte in den ELISA-Reader gegeben, der photometrisch die Enzymaktivität erfassen kann. Diese ist proportional zur Menge des gebundenen

Zielmoleküls. Die Konzentration des TNF- α kann anhand des Standards, die eine Kalibrationskurve liefert, bestimmt werden.

4.7.2 IL8

Das Prinzip für den IL8-ELISA gleicht dem oben beschriebenen Verfahren für TNF- α -ELISA. Um optimale Versuchsbedingungen zu schaffen, wurden vorab verschiedene Konzentrationen der einzelnen Komponenten, wie etwa des Detection-Antikörpers, getestet und so die bestmöglichen Konzentrationen ermittelt. Für den capture Antikörper wurde hier der anti human IL8- Capture Antibody verwendet. Dieser wurde 1:400 verdünnt (2,5 μ g/ml) – es wurden 15 μ l der Stocklösung (1mg/ml) in 6ml PBS gegeben. Das anti human IL-8 Biotin Conjugate wurde als Detection Antikörper 1:5000 mit 1%BSA/PBS verdünnt – dies entspricht 1,2 μ l der Stocklösung (0,5mg/ml) in 6ml PBS/BSA. Der Standard (Immuno Tools rh IL-8) wurde 1:25 in 1%BSA/PBS verdünnt – es wurde dementsprechend ein Ansatz mit einer Maximumkonzentration von 2000pg/ml gewählt. Beim IL-8 ELISA wurde das Streptavidin-HRP 1:400 in 1%BSA/PBS verdünnt - 15 μ l der Stocklösung in 6ml 1%BSA/PBS. Alle anderen Teilschritte des ELISA entsprechen den Schritten des TNF- α -ELISA.

4.8 Transfektion

Unter einer Transfektion versteht man das Einbringen von DNA oder RNA in eine eukaryontische Zelle. Diese kann transient oder stabil, also dauerhaft sein. Hier wurde eine transiente biochemische Transfektion durchgeführt.

Es wurde in dieser Arbeit das peqLab-Reagenz verwendet. Die Expression des Zielgens OS-9 wurde hier durch Einbringen von OS9-siRNA vermindert bzw. verhindert. Als Negativkontrolle wurde eine scramble RNA genutzt. Durch das „Ausschalten“ des OS9 kann hier die Funktion, Rolle und Einflussnahme des OS9 auf die Stressreaktion der THP1-Zellen untersucht werden.

Bei der folgenden Transfektion der THP1 Zellen wurden diese vorab für 72h mit 50nM PMA gereift. Die Reifung fand in 12-Well-Platten statt mit je 1 Mio. Zellen pro ml RPMI mit 10%FCS und 1%P/S. Anschließend fand ein Mediumwechsel statt – nun wurde RPMI ohne Zusätze verwendet. Nach 24h Ruhephase wurde die Transfektion gestartet. Die Konfluenz der Zellen sollte nun optimalerweise 70-90% betragen. Es wurde eine Endkonzentration in der Zellkultur von 16,7nM gewählt – dies entspricht 20pmol siRNA (2 μ l) in 200 μ l RPMI.

Anschließend wurde das peqFECT Reagenz kurz gemischt und jeweils 2 μ l zu den jeweiligen Ansätzen hinzugefügt. Die Mischung wurde daraufhin für 15-20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann 200 μ l vorsichtig und tropfenweise zu jedem well gegeben. Die Platte wurde vorsichtig geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung der Komplexe zu gewährleisten und für 48h im Brutschrank inkubiert.

Im Anschluss an diese Inkubationszeit wurde ein erneuter Mediumwechsel mit RPMI +10%FCS +1%P/S durchgeführt. Daraufhin wurden die transfizierten Zellen für 24h nach folgender Reihe stimuliert: **THP1/PMA +**

Nummer	peqFECT-Reagenz	OS9siRNA/scramble	Stimulanz
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	-	LPS 1µg/ml
4	-	-	Tunicamycin 10nM
5	-	-	LAM 10µg/ml
6	-	-	P.acnes 10µg/ml
7	-	-	Tunicamycin 10nM + LAM 10µg/ml
8	-	-	Tunciamycin 10nM + P.acnes 10µg/ml
9	+	siRNA	-
10	+	scramble	-
11	+	siRNA	LPS 1µg/ml
12	+	scramble	LPS 1µg/ml
13	+	siRNA	Tunicamycin 10nM
14	+	scramble	Tunicamycin 10nM
15	+	siRNA	LAM 10µg/ml
16	+	scramble	LAM 10µg/ml
17	+	siRNA	P.acnes 10µg/ml
18	+	scramble	P.acnes 10µg/ml
19	+	siRNA	Tunicamycin 10nM + LAM 10µg/ml
20	+	scramble	Tunicamycin 10nM + LAM 10µg/ml
21	+	siRNA	Tunciamycin 10nM + P.acnes 10µg/ml
22	+	scramble	Tunciamycin 10nM + P.acnes 10µg/ml

Abb.4.4 Aufgelistet sind die Bestandteile der einzelnen Versuchsansätze – Reagenzien, siRNA, scramble und verschiedene Stimulanzen.

Nach 24h Stimulation unter Inkubation im 37°C, 5%CO2 Brutschrank wurde die Zellen mit 200µl Trizol lysiert. Die Überstände wurden abgenommen und weggefroren. Im Anschluss wurde hier ebenfalls PCR und ELISA durchgeführt.

4.9 Genotypisierung

Die Genotypisierung der Sarkoidosepatienten und der freiwilligen Probanden wurde in Kiel, im Institut für Klinische Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität durchgeführt. Im Speziellen wurde hier auf das OS-9 Gen untersucht. Dieses befindet sich auf Chromosom 12q13.3-q14.1 und kann einen SNP (single nucleotid polymorphism) enthalten. Bei dem Allel, welches genau untersucht wird, handelt es sich um das rs 1050045. Es können drei verschiedene Genotypen vorliegen: AA, CA und CC.

Der Untersuchung wurde zuvor durch die Ethikkommission zugestimmt – Antragsnummer 3/10 im Jahr 2010.

4.10 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse konnte aufgrund der geringen Anzahl an Tests pro Messreihe keine Normalverteilung angenommen werden. Pro Messreihe wurden mehrere unabhängige Versuche an verschiedenen Zeitpunkten vorgenommen.

Es wurde eine nicht-parametrische Statistikmethode verwendet. Der Friedman Test wurde zur Prüfung der statistischen Signifikanz der Ergebnisse durchgeführt. Eine statistische Signifikanz wurde für einen p-Wert kleiner 0,05 bestimmt. Die Ergebnisse der Tests mit Patientenproben wurden im Vergleich zu Kontrollpatienten aufgeführt. Zudem wurde der Wilcoxon signed- rank Test verwendet.

Die Ergebnisse wurden graphisch in Säulendiagrammen dargestellt. Es werden die Mittelwerte und deren Standardabweichung gezeigt.

5. Ergebnisse

5.1 Die Expression des OS9 bei verschiedenen myelozytären Vorläuferzellen

In den Vorversuchen wurden verschiedene myelozytäre Vorläuferzellen untersucht. Es handelte sich hierbei um HL60-Zellen, U937-Zellen und THP1-Zellen.

Die Zelllinien wurden mittels rt-PCR auf ihre relative OS9 Expression hin untersucht und verglichen. Dabei wurde auf die Expression im unstimulierten Zustand und die mögliche Erhöhung der Expression durch einen Stimulus geachtet. Die Ergebnisse der rt-PCR wurden als relative Expressionen in nachfolgender Abbildung 5.1 dargestellt.

Im unstimulierten Zustand zeigt die Zellreihe der U937 die höchste Expression an OS9, während die basale OS9 Expression der HL60 Zellen eine deutlich geringere Expression aufweist. Eine Erhöhung der relativen OS9-Expression wird nach Stimulation mit 1µg/ml LPS für 24 Stunden sowohl bei den HL60- als auch bei den THP1-Zelllinien erreicht. Auch eine Stimulation mit 10nM Tunicamycin bewirkt bei THP1 Zellen einen Expressionsanstieg. Dagegen kommt es bei U937 Zellen durch Stimulation mit 1µg/ml LPS oder 10nM Tunicamycin zu einem starken Abfall der Expression.

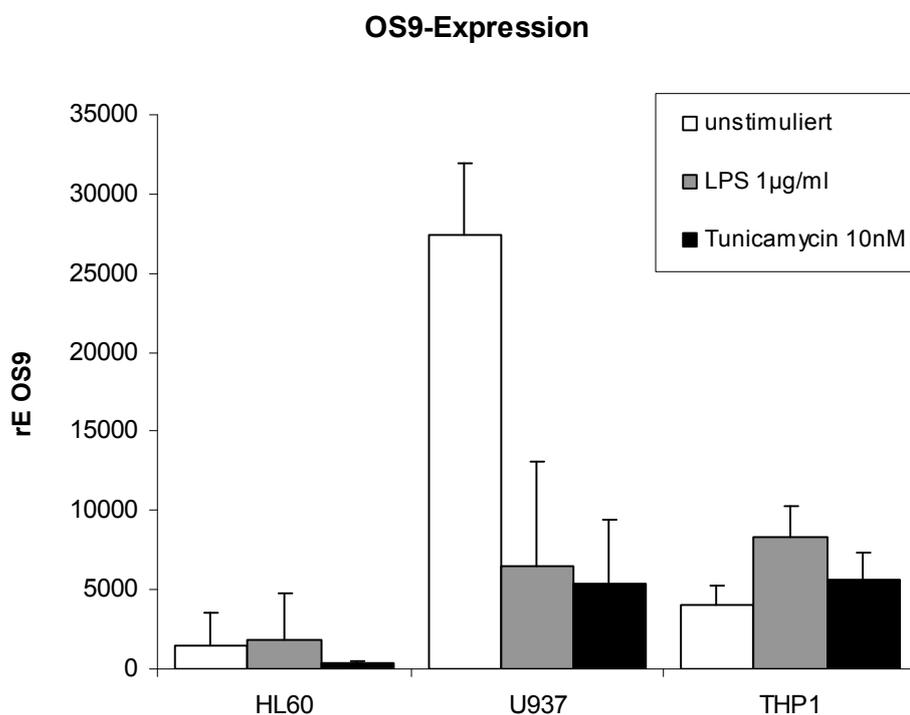


Abb.5.1: Die Abbildung zeigt die relativen Expressionen an OS9 der Zelllinien HL60, U937 und THP1 im unstimulierten Zustand, sowie nach Stimulation der Zellen mit LPS 1µg/ml und Tunicamycin 10nM für 24h. Die Versuchsreihe wurde vierfach durchgeführt, die abgebildeten Werte zeigen Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen.

5.2 Die Induktion der Reifung von THP1 Zellen

In dieser Arbeit wurden neben PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) auch DMSO (Dimethylsulfoxid) und Cholecalciferol (Vitamin D3) für die Induktion der THP1-Reifung verwendet und getestet. In verschiedenen Arbeiten konnten diese Agenzien eine Reifung von THP1 Zellen induziert werden. [15, 20, 118, 153]

In dieser Arbeit wurden in mehreren Versuchansätzen verschiedene Konzentrationen an DMSO zur Induktion der Reifung getestet. Doch es konnte nur für einen Teil der THP1 Zellen eine erfolgreiche Reifung erreicht werden. Bei zusätzlicher Stimulierung gingen zudem viele Zellen zugrunde. Auch eine Reifung mit Vitamin D3 blieb erfolglos. Die THP1-Zellen reagierten auf bereits geringe Konzentrationen empfindlich und leiteten den Zelltod ein.

THP1-Zellen differenzierten jedoch durch Zusatz des Phorbolesters PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) in 72 h zu makrophagenähnlichen Zellen aus. Die Zellen wurden dabei im Brutschrank bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden im Lichtmikroskop morphologische Veränderungen sichtbar. Während sich die THP1-Zellen im ungeriftem Zustand groß, rund und einzellig präsentierten, zeigten sich die Zellen durch den Reifungsprozess mit zytoplasmatischen Ausläufern und formierten sich häufiger in Zelltrauben. Zudem wurden die Zellen adhärent.

In Abbildung 5.2 sind die THP1 Zellen vor und nach der 72-stündigen Reifung mit 50nM PMA abgebildet. Die lichtmikroskopischen Bilder wurden in einer 4er- und einer 10er-Vergrößerung aufgenommen.

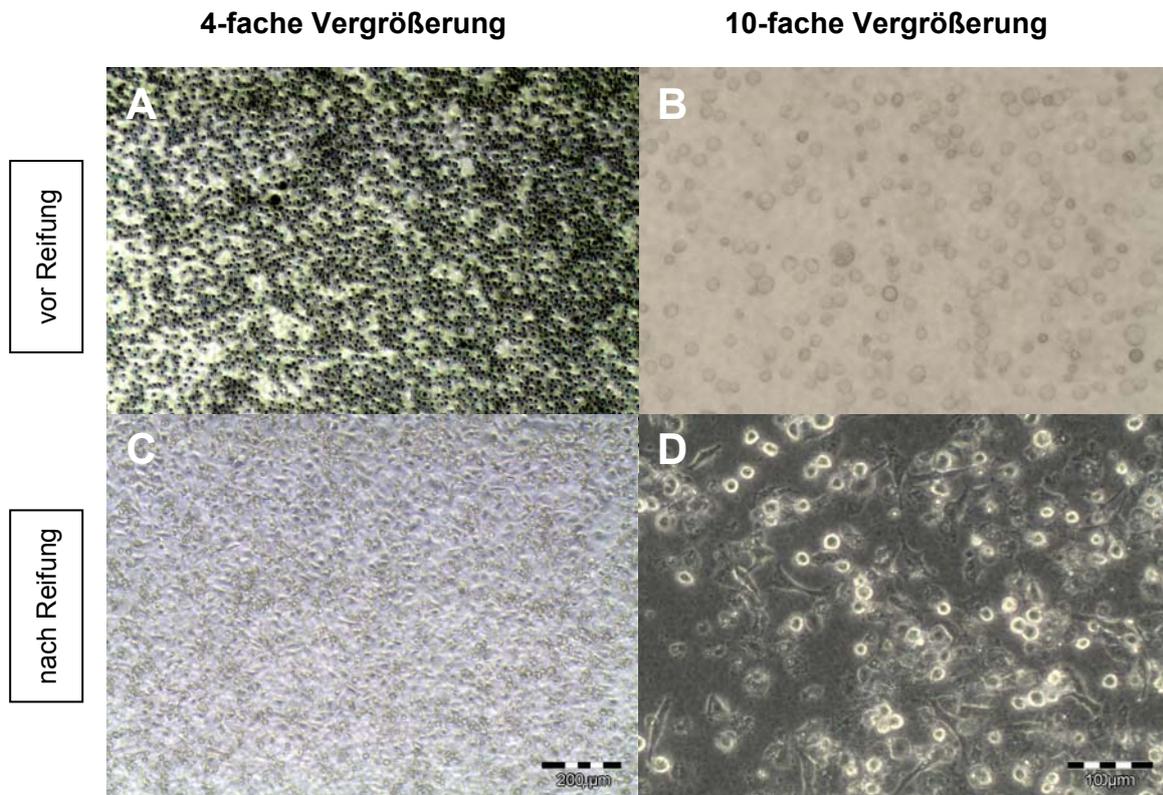


Abb.5.2: Nummer A und B zeigen lichtmikroskopische Bilder von THP1-Zellen vor der Reifung, Nummer C und D nach der Reifung mit PMA für 72h. Die Zellen werden in einer 4- und 10-fachen Vergrößerung gezeigt.

5.3 Das OS9-Expressionsverhalten und die Zytokinfreisetzung von ungereiften THP1 Zellen

Die Stimulation mit Tunicamycin und LAM

Ungereifte THP1 Zellen wurden nach Stimulation mit 10nM Tunicamycin und 10µg/ml LAM für 24 Stunden, sowie deren Kombination auf die Expression von OS9 und die Produktion von TNF- α und Interleukin-8 hin untersucht.

Die Ergebnisse lassen erkennen, dass die Stimulation ungereifter THP1 Zellen mit Tunicamycin, sowie einer Kombination aus Tunicamycin und LAM einen Anstieg der OS-9 Expression bewirken. (Abb.5.3) Dagegen wird die Expression durch eine Einzelstimulation mit LAM nicht beeinflusst. (Abb.5.3)

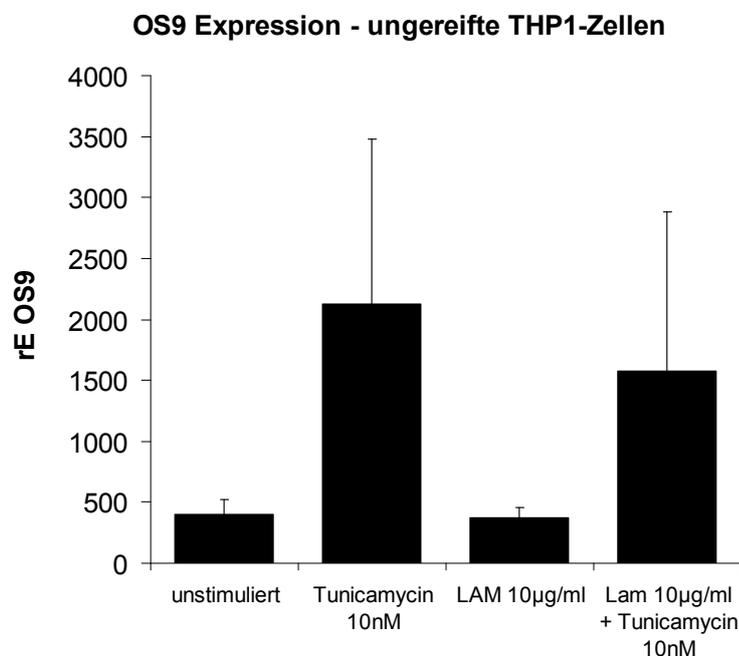


Abb.5.3 Die Abbildung zeigt die relative Expression ungereifter THP1-Zellen im unstimulierten Zustand, sowie nach Stimulation mit Tunicamycin und LAM für 24h. Der Versuch wurde vierfach durchgeführt. Es wird deren Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

Bei Untersuchung der Überstände, zeigte sich ein Anstieg der TNF- α Produktion durch die einzelnen Stimulanzen. Durch Stimulation mit einer Kombination aus LAM und Tunicamycin kam es zudem zu einer starken Erhöhung der TNF- α Freisetzung. (Abb.5.4)

Bei der Produktion an IL-8 zeigte sich ebenfalls ein Anstieg durch die Stimulanzen und deren Kombination. (Abb.5.5)

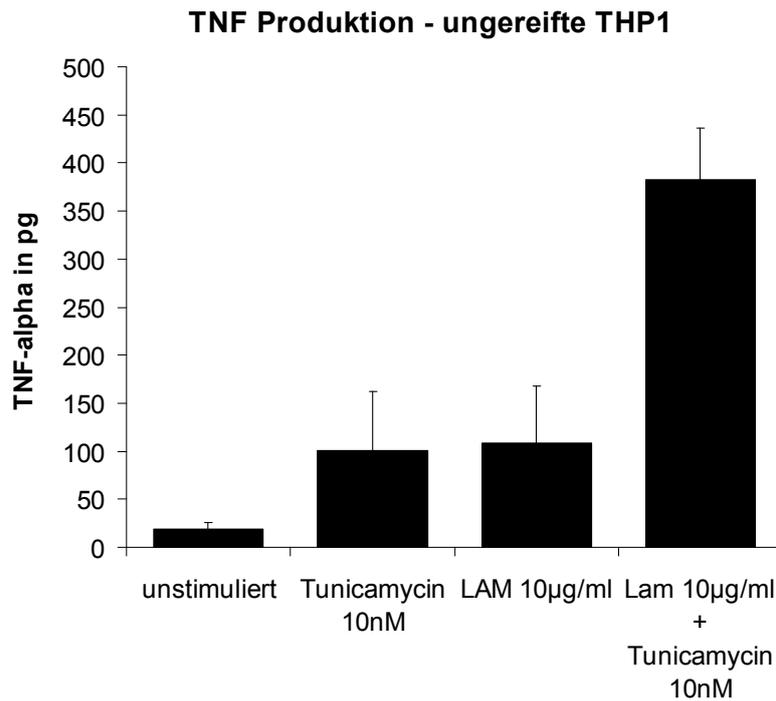


Abb.5.4 Das Säulendiagramm zeigt die Produktion an TNF- α durch ungeriefte THP1-Zellen vor und nach Stimulation mit Tunicamycin 10nM und/oder LAM 10 μ g/ml für 24h. Der Versuch wurde vierfach durchgeführt. (n=4) Es wird deren Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

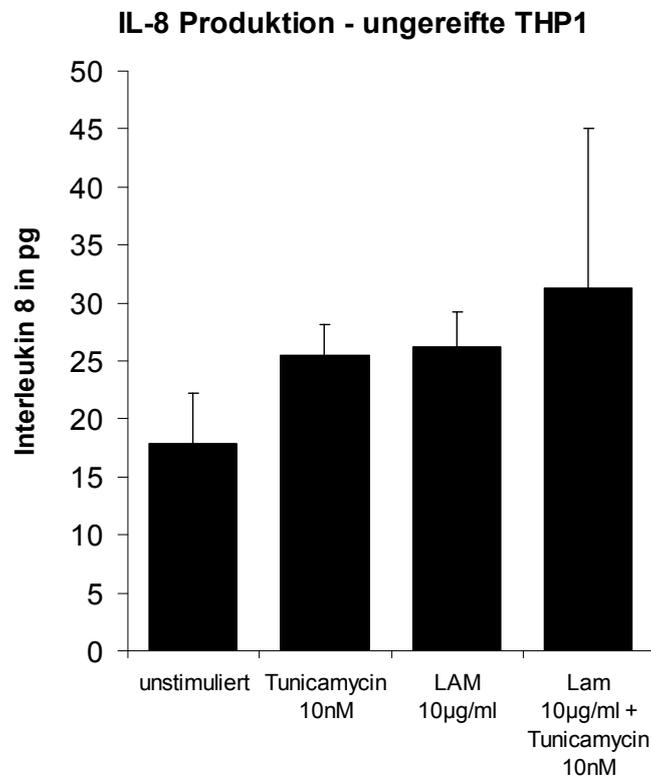


Abb. 5.5 Das Säulendiagramm zeigt die Produktion an IL-8 durch ungeriefte THP1-Zellen vor und nach Stimulation mit Tunicamycin 10nM und/oder LAM 10 μ g/ml für 24h. (n=4) Es wird deren Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

Die Stimulation mit Tunicamycin und LPS

Im Weiteren wurde das Verhalten von ungereiften THP1 Zellen auf die 24-stündige Stimulation mit 1µg/ml LPS und Tunicamycin, als auch mit deren Kombination untersucht. Zudem wurde die relative OS9 Expression und Zytokinproduktion bei Steigerung der Tunicamycinkonzentration von 10nM auf 1000nM beobachtet.

Es wurde gezeigt, das Tunicamycin und LPS jeweils die OS-9 Expression hoch regulieren, jedoch unabhängig von der Höhe der Konzentration an Tunicamycin oder einer Kombination der beiden Stimuli. (Abb.5.6)

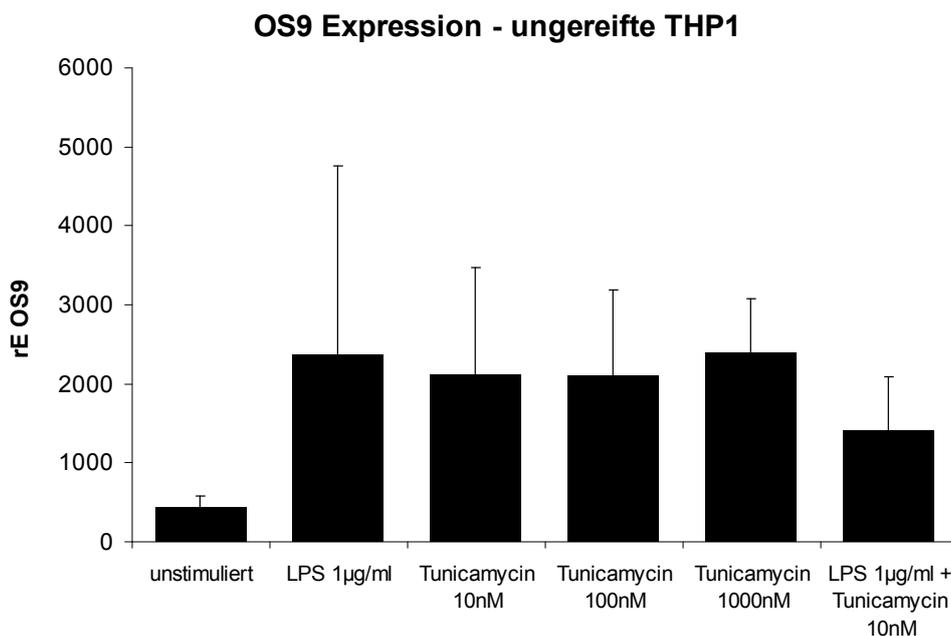


Abb.5.6 In der Abbildung zeigt sich die OS9 Expression ungereifter THP1 Zellen nach Stimulation mit LPS und Tunicamycin in verschiedenen Konzentrationen für 24 h. Der Versuch wurde vierfach durchgeführt. Es wird deren Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

Werden die Zytokinwerte nach Stimulation mit LPS und Tunicamycin für 24 Stunden betrachtet, zeigt sich durch eine niedrige Tunicamycinkonzentration eine Erhöhung der TNF- α -Produktion, die Stimulation mit höheren Konzentrationen an Tunicamycin TNF- α eine Erniedrigung. (Abb.5.7) In der Darstellung der Produktion an Interleukin-8 zeigt sich eine Steigerung der Produktion nach allen Stimulationen für 24h. (Abb.5.8)

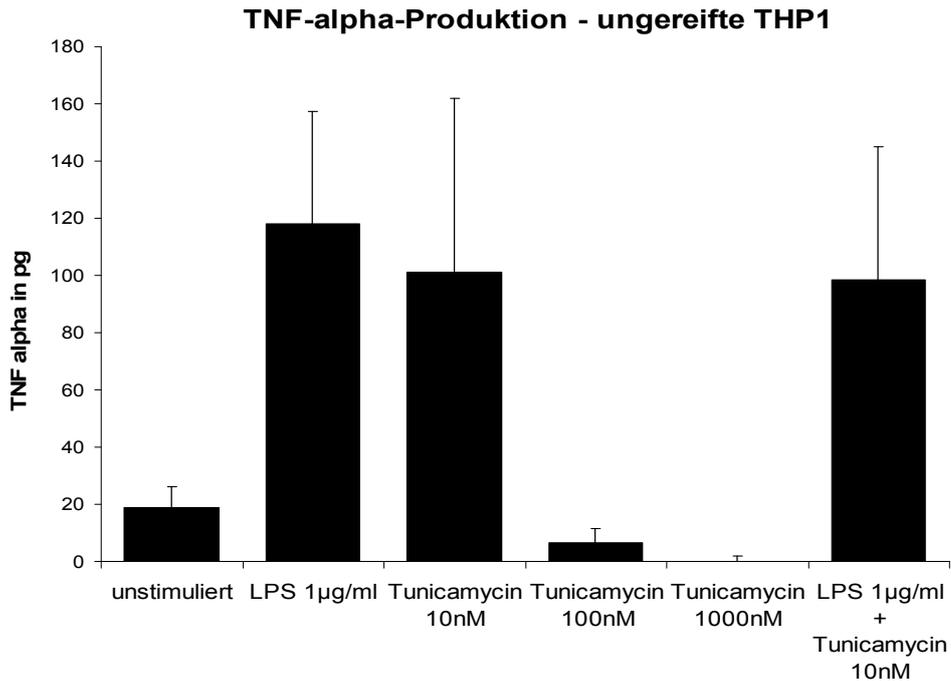


Abb.5.7 Das Säulendiagramm zeigt die Produktion an TNF- α durch ungereifte THP1-Zellen vor und nach Stimulation mit LPS 1µg/ml und verschiedenen Konzentrationen an Tunicamycin 10nM für 24h. Der Versuch wurde vierfach durchgeführt. Es wird deren Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

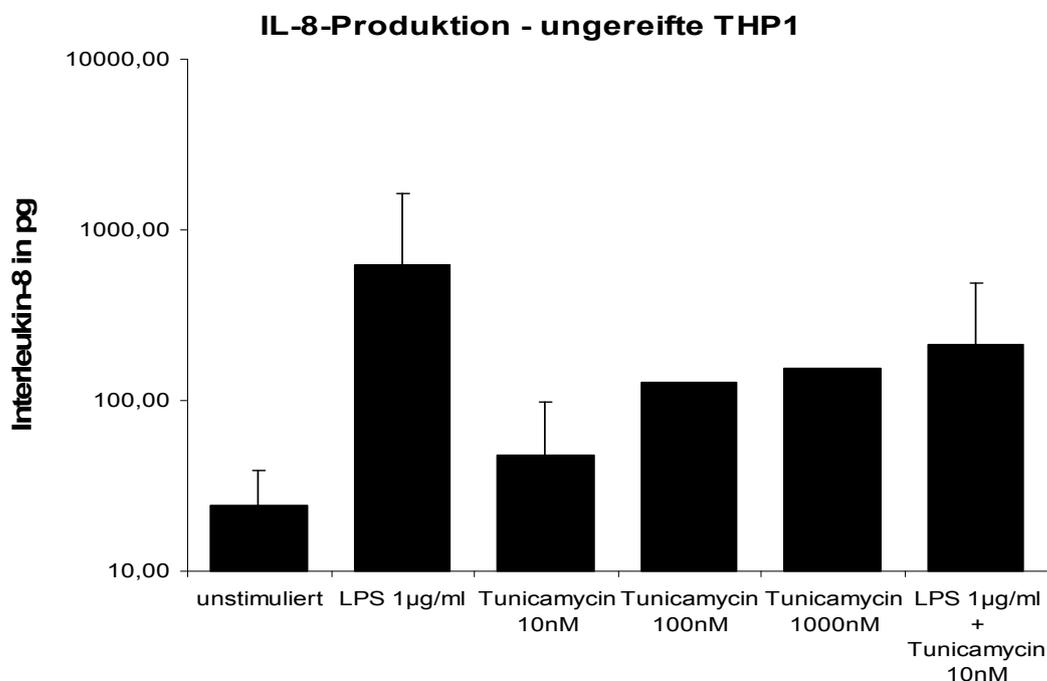


Abb.5.8 Das Säulendiagramm zeigt die Produktion an IL-8 durch ungereifte THP1-Zellen vor und nach Stimulation mit LPS 1µg/ml und verschiedenen Konzentrationen an Tunicamycin 10nM für 24h. Der Versuch wurde vierfach durchgeführt. Es wird deren Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

5.4 Das OS9-Expressionsverhalten und die Zytokinfreisetzung von gereiften THP1 Zellen

Um die Reaktion von Makrophagen auf verschiedene Stimuli noch genauer untersuchen und simulieren zu können, wurden die THP1 Zellen vor Beginn der Stimulation zur Reifung gebracht.

Die ausführlichen Versuche der Reifung von THP1-Zellen mit DMSO und Vitamin D waren nicht erfolgreich – die Reifung konnte auch durch unterschiedliche Konzentrationen und Versuchsansätze nicht erreicht werden.

Durch Zusatz des Phorbolesters PMA differenzierten die monozytären THP1-Zellen zu makrophagenähnlichen Zellen. Durch die Reifung wurden die THP1-Zellen adhärent und veränderten ihre Morphologie. In 12-well-Platten wurde die Differenzierung sowie Stimulation in verschiedenen Ansätzen getestet.

Zudem wurde ein Ansatz durchgeführt, der Reifung und Stimulation simultan vorsah. Die Ergebnisse wurden mit denen der ungereiften Zellen verglichen. Auch hier wurde auf die OS9-Expression, sowie die TNF- α - und IL-8-Freisetzung der THP1-Zellen hin untersucht, um einen optimalen Ansatz zur Simulation der Reaktion von Makrophagen zu ermitteln.

Stimulation ungereifter THP1 Zellen für 24 h	ungereift
Reifung der Zellen mit PMA 50nM für 72h, dann Mediumwechsel und Stimulation für 24h	gereift-1
Reifung von THP1 mit PMA für 72h, dann Mediumwechsel und Ruhephase für 72h, dann erneuter Mediumwechsel und Stimulation für 24h	gereift-2
gleichzeitiger Zusatz von PMA und Stimulantien für 72h	simultan

Tab.5.9 Die Tabelle zeigt den Ablauf der verschiedenen Reifungs- und Stimulationsansätze für THP1-Zellen. Jeder Ansatz wurde dreifach durchgeführt.

5.4.1 Der Vergleich der verschiedenen Ansätze nach Reifung der THP1 Zellen

a) OS9-Expressionsverhalten

Die basale Expression an OS9 zeigte sich bei gereiften THP1 Zellen (gereift-1, gereift-2 und simultan) höher als bei ungereiften Zellen. Durch die Stimulationen mit 1µg/ml LPS und/oder 10nM Tunicamycin zeigt sich eine starke Varianz im OS9 Expressionsverhalten der Zellen. (Abb.5.10)

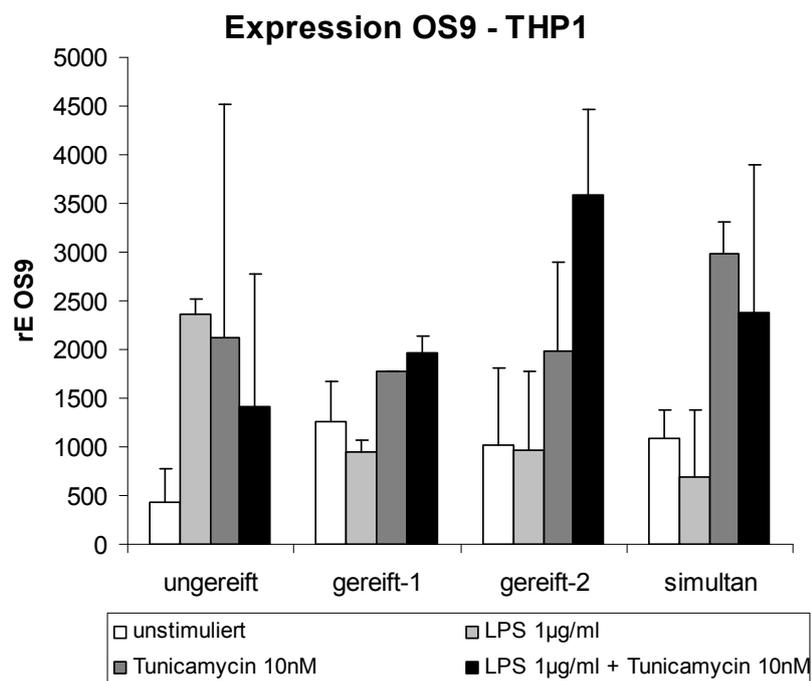


Abb.5.10 Die Abbildung zeigt die relative Expression an OS9 bei verschiedenen Versuchsansätzen zur Reifung von THP1 Zellen, sowie nach Stimulation mit LPS und/oder Tunicamycin für 24h. Die Versuchsreihe wurde dreifach durchgeführt, es wird der Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

Auch durch die Stimulation mit 10µg/ml M.tb und 10µg/ml LAM zeigt sich bei Betrachtung der OS9 Expression eine deutliche Varianz. (Abb.5.11)

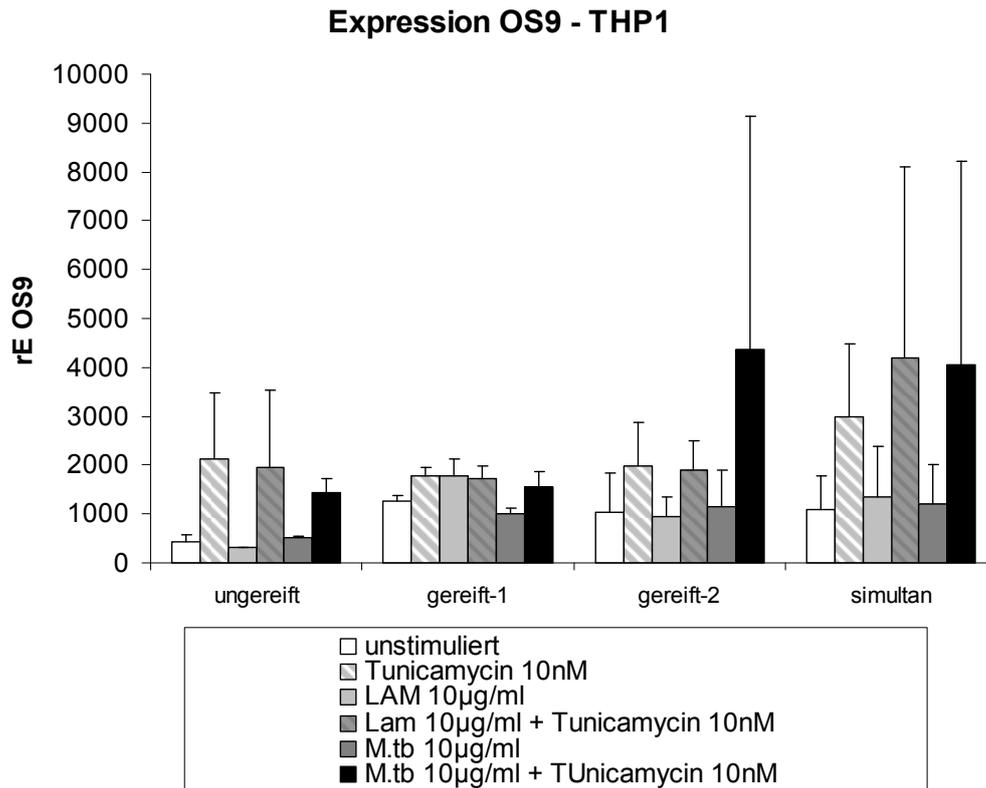


Abb.5.11 Die Abbildung zeigt die relative Expression an OS9 bei verschiedenen Versuchsansätzen zur Reifung von THP1 Zellen, sowie nach Stimulation mit LPS und/oder Tunicamycin für 24h. Die Versuchsreihe wurde dreifach durchgeführt, es wird der Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

b) Produktion an TNF- α und Interleukin 8

Die basale Freisetzung an TNF- α zeigt sich bei gereiften THP1 Zellen höher als bei ungerEIFten THP1-Zellen. (Abb.5.12) Die Produktion an TNF- α durch ungerEIFte THP1 Zellen wird durch fast alle Stimulationen nach 24h erhöht. Die Produktion an TNF- α durch gereifte THP1 Zellen zeigt lediglich durch die Stimulation mit 10µg/ml LPS und deren Kombination mit 10nM Tunicamycin eine Steigerung. (Abb.5.12) Die Stimulation durch andere Stimuli wie LAM oder M.tb lässt die Freisetzung an TNF- α durch gereifte THP1 Zellen annähernd unbeeinflusst. Die Produktion bleibt hier gleichbleibend hoch. (Abb.5.13)

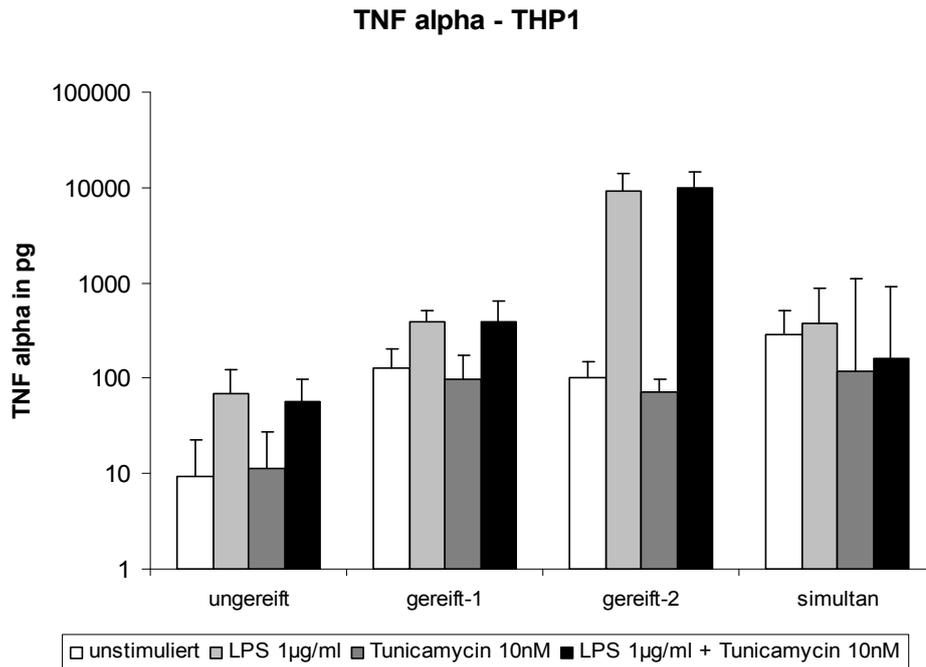


Abb.5.12 Die Abbildung zeigt die Freisetzung von TNF- α durch THP1-Zellen, die entweder ungerEIFt oder nach unterschiedlichen Ansätzen gereift eingesetzt wurden - nach Stimulation mit LPS und/oder Tunicamycin für 24h. Der Versuch wurde dreifach durchgeführt. (n=3)

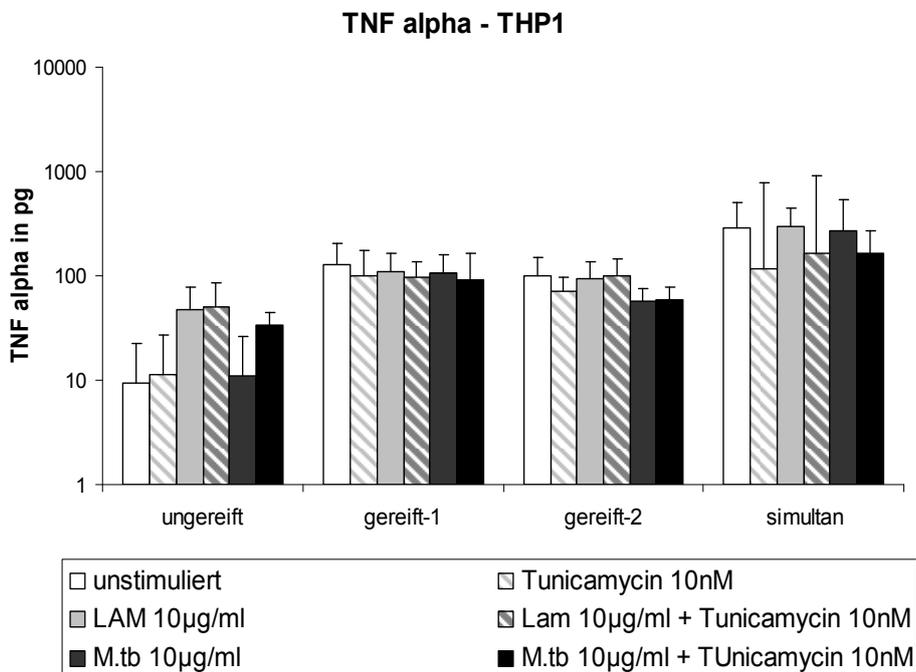


Abb.5.13 Die Abbildung zeigt die Freisetzung von TNF- α durch THP1-Zellen, die ungerEIFt oder nach unterschiedlichen Ansätzen gereift eingesetzt wurden, unstimuliert und nach Stimulationen mit Tunicamycin, LAM und M.tb , sowie deren Kombinationen. (n=3) Es wird ein Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

Die basale Produktion an Interleukin-8 durch gereifte THP1 Zellen zeigt sich höher als bei ungereiften THP1 Zellen. (Abb.5.14) Auch hier lässt sich bei ungereiften THP1 Zellen eine vermehrte IL-8 Produktion durch beinahe alle Stimulanzen beobachten. Gereifte Zellen weisen nach Stimulation mit LPS, Tunicamycin und deren Kombinationen eine vermehrte Zytokinproduktion auf. (Abb.5.15)

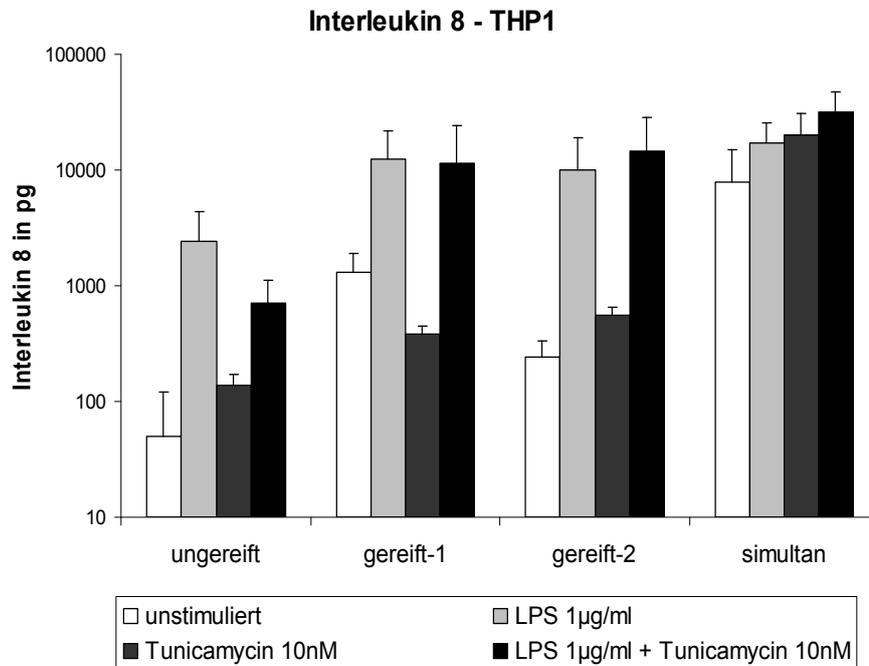


Abb.5.14 Die Abbildung zeigt die Freisetzung von IL-8 durch THP1-Zellen, die nach unterschiedlichen Ansätzen gereift bzw. nicht gereift wurden - nach Stimulation mit LPS und Tunicamycin für 24h. Der Versuch wurde vierfach durchgeführt. Es wird ein Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

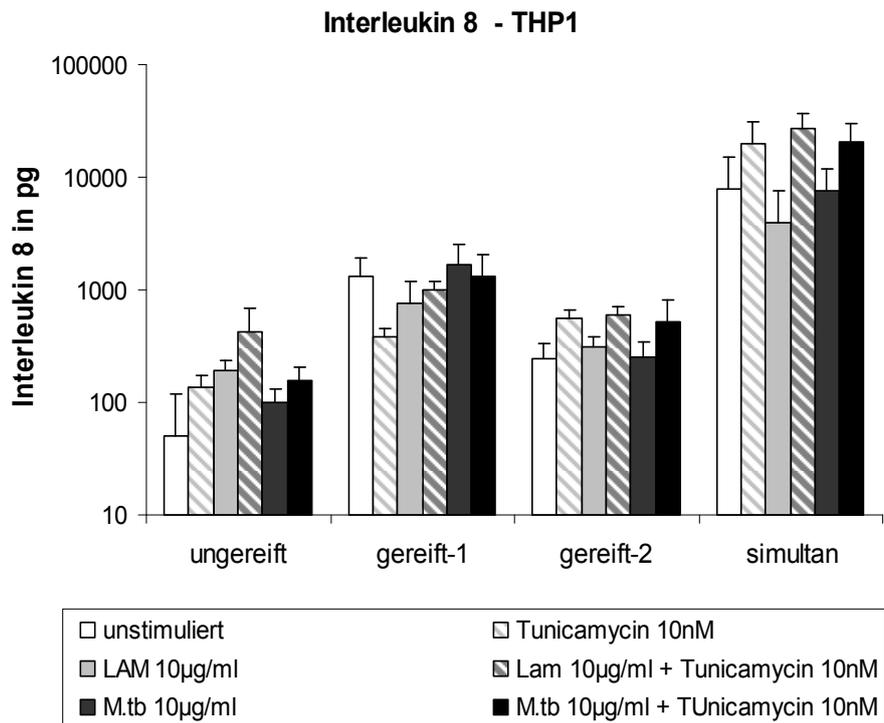


Abb.5.15 Die Abbildung zeigt die Freisetzung von IL-8 durch THP1-Zellen, die nach unterschiedlichen Ansätzen gereift wurden – unstimuliert und nach Stimulationen mit Tunicamycin, LAM und M.tb, sowie deren Kombinationen für 24h. Der Versuch wurde vierfach durchgeführt. Es wird ein Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

5.4.2 Reaktion von gereiften THP1 Zellen auf verschiedene Stimuli

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse, wurde Ansatz gereift-2 für weitere Untersuchungen gewählt. Die THP1 Zellen wurden für 72h mit 50nM PMA gereift und im Anschluss an einen Mediumwechsel für weitere 72h bei 37°C inkubiert. Nach dieser Ruhephase wurde nach erneutem Mediumwechsel für 24h stimuliert. Dabei wurden Einzelstimulanzen sowie deren Kombinationen verwendet. In den folgenden Tabellen werden die relativen Expressionen des OS9, sowie die dazugehörigen TNF- α - und IL-8-Werte einschließlich ihrer Standardabweichungen dargestellt. Die Versuche wurden insgesamt viermal durchgeführt.

a) Stimulation mit Tunicamycin und LPS

Die Stimulation der gereiften THP1 Zellen mit Tunicamycin induziert dosisabhängig die OS9 Expression – diese Dosisabhängigkeit ist signifikant ($p < 0,01$; Friedman Test). Durch Steigerung der Tunicamycinkonzentration von 10nM über 100nM auf 1000nM kommt es zu einer deutlichen Erhöhung der relativen OS9 Expression (Abb.5.16) Laut Wilcoxon signed-rank Test ist die Erhöhung bei 10 nM und 100 nM signifikant ($p < 0,01$), nicht aber bei einer Tunicamycinkonzentration von 1000 nM.

Die Expression an OS9 wird durch die Stimulation mit LPS 1 μ g/ml kaum beeinflusst. (Abb.5.17)

Die TNF- α Produktion stellt sich bei Steigerung der Tunicamycinkonzentration gleichbleibend niedrig dar und ist somit konzentrationsunabhängig. (Abb.5.18) Im Vergleich dazu wird nach Stimulation mit LPS 1 μ g/ml ein starker Anstieg an TNF- α sichtbar. (Abb.5.19)

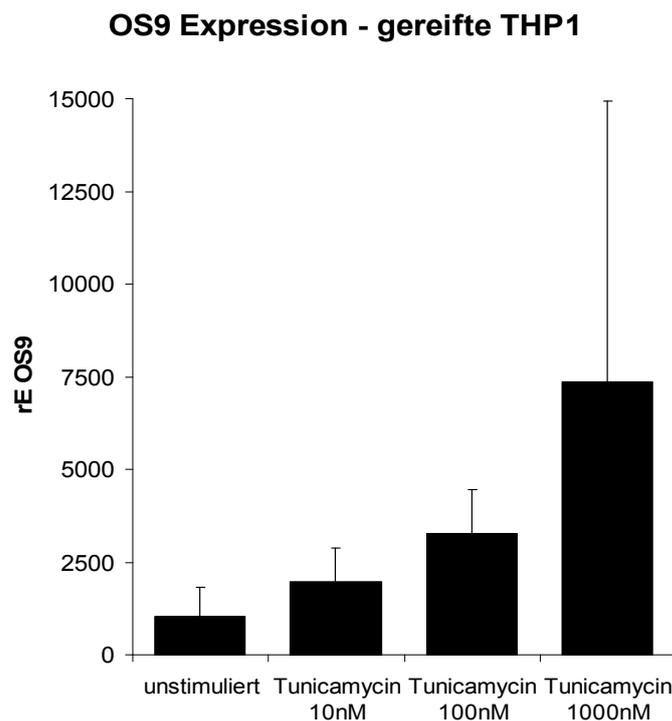


Abb.5.16 In der Tabelle wird die relative OS9 Expression gereifter THP1 Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Tunicamycinkonzentrationen für 24h dargestellt. Der Versuch wurde viermal wiederholt. Es wird der Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

OS9 Expression - gereifte THP1

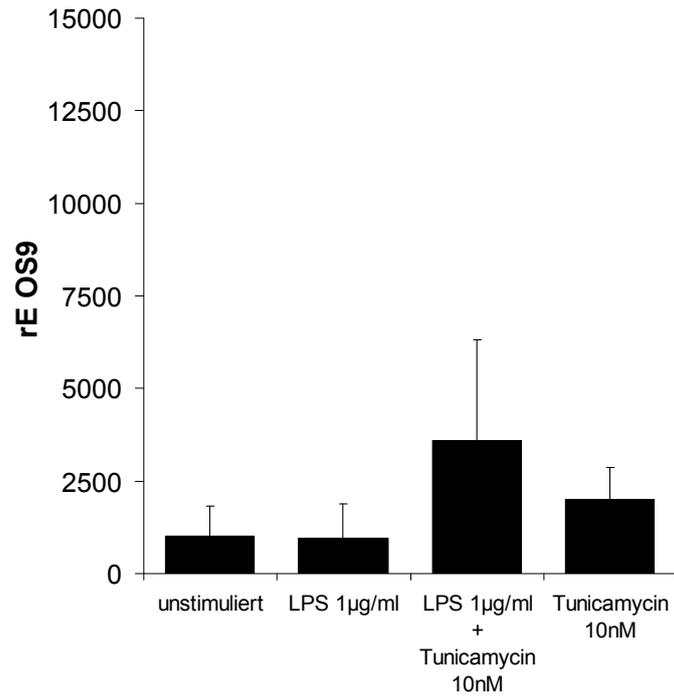


Abb.5.17 In der Tabelle wird die relative OS9 Expression gereifter THP1 Zellen nach Stimulation mit LPS 1 µg/ml und/oder Tunicamycin 10nM für 24h dargestellt. (n=4)

gereifte THP1 - TNF

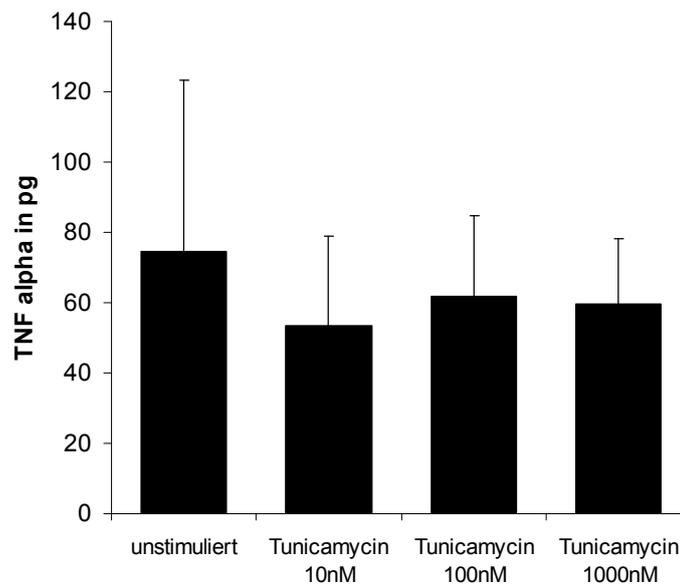


Abb.5.18 Dargestellt ist die TNF- α -Produktion gereifter THP1 Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen an Tunicamycin für 24h. Der Versuch wurde viermal wiederholt. Es wird der Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

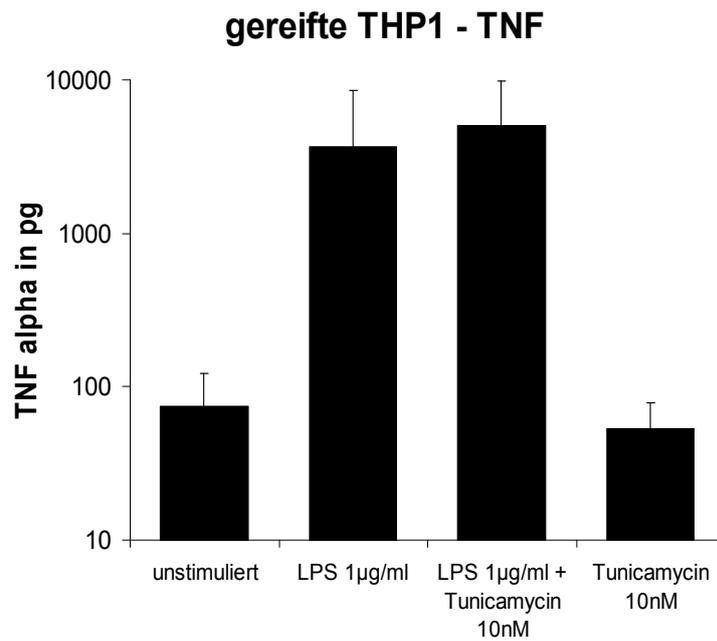


Abb.5.19 Dargestellt ist die TNF- α Produktion durch Stimulation von gereiften THP1 Zellen durch LPS 1 μ g/ml und/oder Tunicamycin 10nM für 24h. Der Versuch wurde viermal wiederholt. Es wird der Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben, die Darstellung ist logarithmisch gewählt.

Bei Betrachtung der Interleukin-8 Produktion zeigt sich eine konzentrationsabhängige Steigerung durch Tuincamycin. Es kommt zu einer signifikanten dosisabhängigen Induktion des Interleukin-8 durch Tunicamycin ($p < 0,05$). (Abb.5.20) Die Produktion wird bei einer Konzentration von 1000nM deutlich erhöht. Nach Stimulation mit LPS 1 μ g/ml und Tunicamycin 10nM wird ein Anstieg an Interleukin-8 sichtbar. (Abb.5.21)

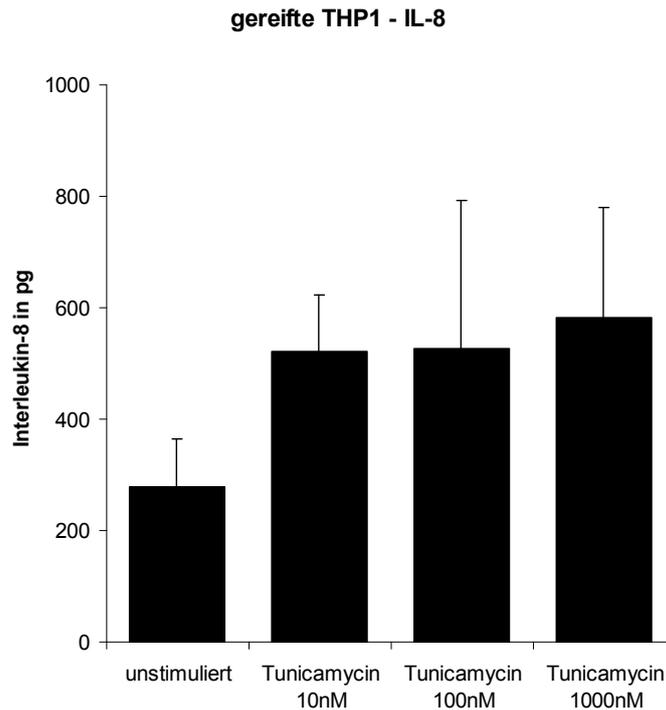


Abb.5.20 Es wird die Interleukin-8 Produktion gereifter THP1 Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Tunicamycinkonzentrationen für 24h dargestellt. Es zeigt sich eine signifikante Induktion des Interleukin-8. ($p < 0,05$) Der Versuch wurde vierfach wiederholt, es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

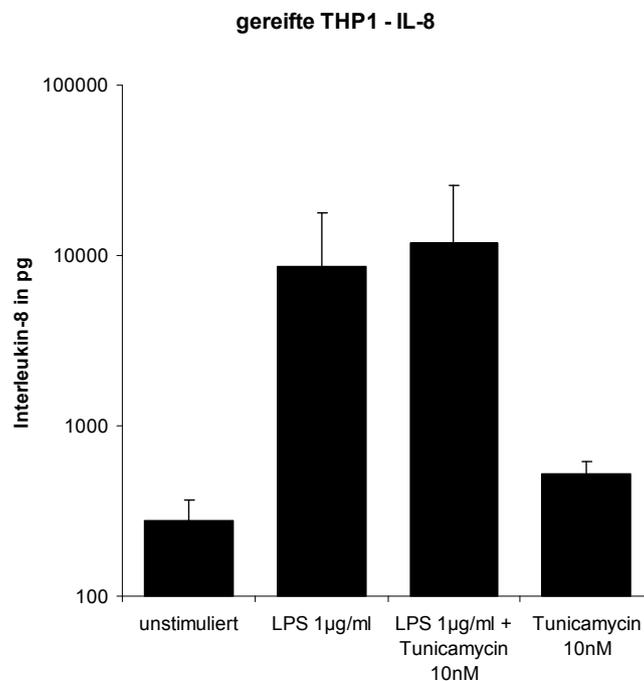


Abb.5.21 Es wird die IL-8 Produktion gereifter THP1 Zellen nach Stimulation mit LPS 1µg/ml und/oder Tunicamycin 10nM für 24h dargestellt. Der Versuch wurde vierfach wiederholt, es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Es wurde eine logarithmische Darstellung gewählt.

b) Stimulation mit LAM und Mycobacterium tuberculosis

Des Weiteren wurden gereifte THP1-Zellen mit je 10µg/ml LAM und 10µg/ml Mycobacterium tuberculosis (M.tb.), sowie beide zusätzlich in Kombination mit 10nM Tunicamycin stimuliert. Hierbei zeigten sich keine Veränderungen der Expression durch die alleinige Stimulation mit M.tb (Abb. 5.22) oder LAM (Abb.5.23). Es zeigte sich jedoch ein Effekt durch die Kombination von M.tb 10µg/ml mit Tunicamycin 10nM. (Abb.5.22) In 4 von 4 Experimenten wurde die Expression durch eine Kombination der Stimulanzen im Vergleich zur jeweiligen Einzelstimulation stark gesteigert.

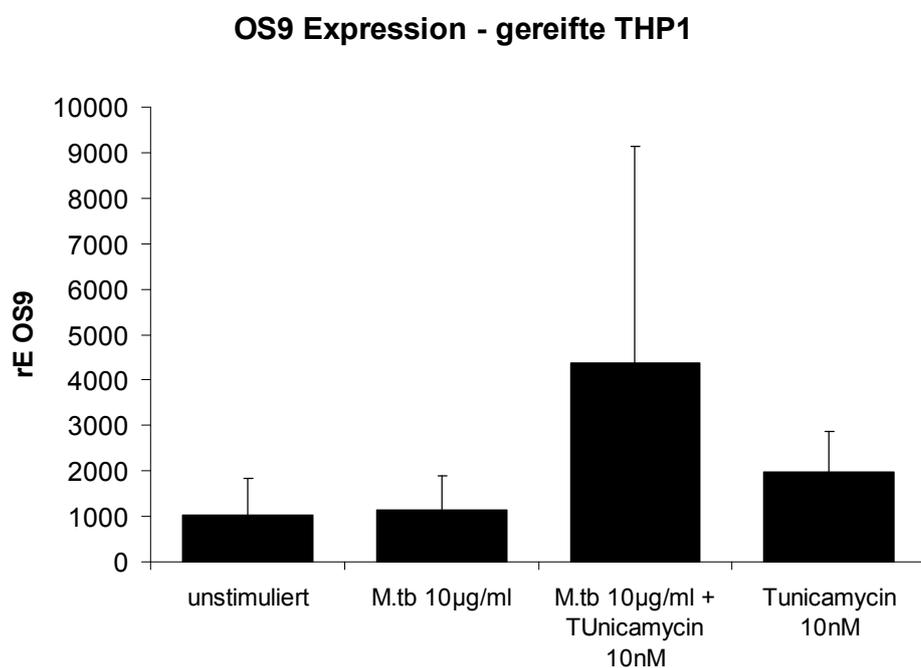


Abb.5.22 Das Säulendiagramm zeigt die relative Expression an OS9 nach Stimulation der gereiften THP1 Zellen mit M.tb. 10µg/ml und/oder Tunicamycin 10nM für 24h. Der Versuch wurde vierfach wiederholt, es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

OS9 Expression - gereifte THP1

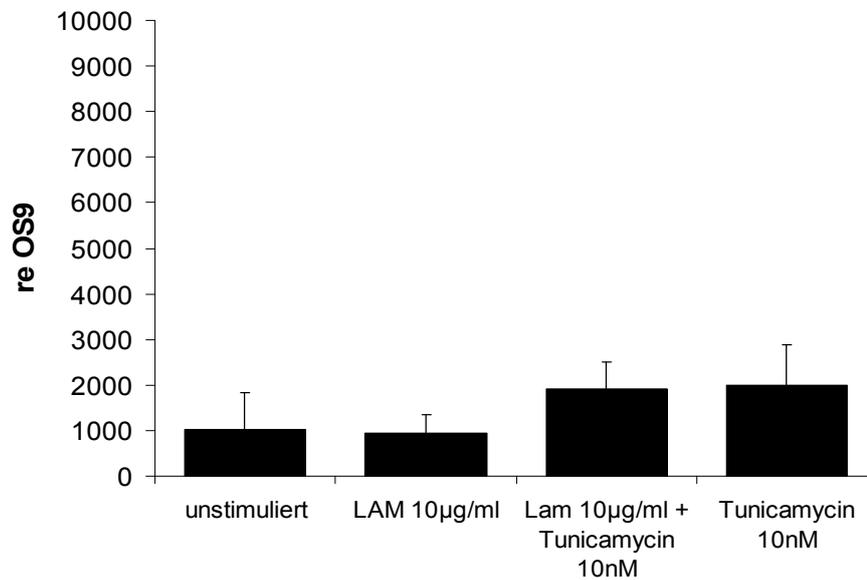


Abb.5.23 Zur Darstellung kommt die Expression an OS9 durch Stimulation gereifter THP1 Zellen mit LAM und einer Kombination mit Tunicamycin für 24h. Der Versuch wurde vierfach wiederholt, es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

Bei Untersuchung der Zytokinfreisetzung nach Stimulation mit LAM und M.tb. zeigten sich für TNF- α nur geringe Veränderungen im Vergleich zur unstimulierten THP1-Zelle. Lediglich durch Stimulation mit M.tb und dessen Kombination mit Tunicamycin konnte eine nicht signifikante Reduktion der TNF- α Freisetzung beobachtet werden. (Abb.5.24)

Bei Untersuchung der IL8 Produktion zeigte sich Erhöhung der IL-8 Freisetzung nach Stimulation der gereiften Zellen mit 10nM Tunicamycin und den Kombinationen Tunicamycin mit 10µg/ml LAM und 10µg/ml M.tb. Eine alleinige Stimulation durch M.tb oder LAM zeigte dagegen keinerlei Einfluss auf die Zytokinproduktion. (Abb.5.25)

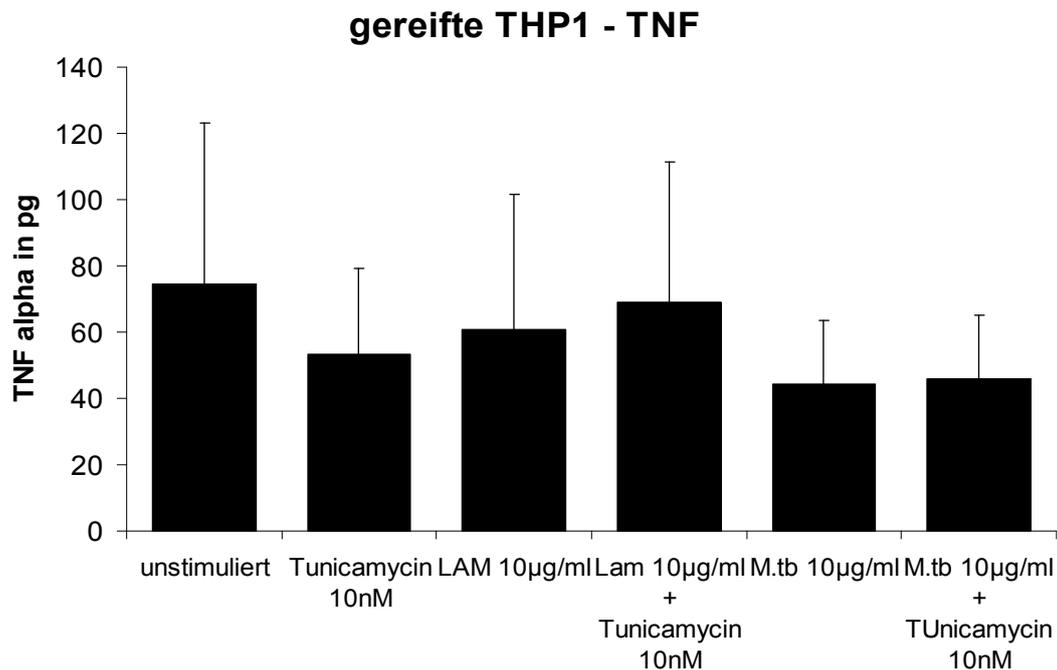


Abb.5.24 Es zeigt sich eine Darstellung der TNF- α Produktion durch gereifte THP1 Zellen nach Stimulation mit LAM 10nM, M.tb. 10µg/ml und/oder Tunicamycin 10nM für 24h. Der Versuch wurde vierfach wiederholt, es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

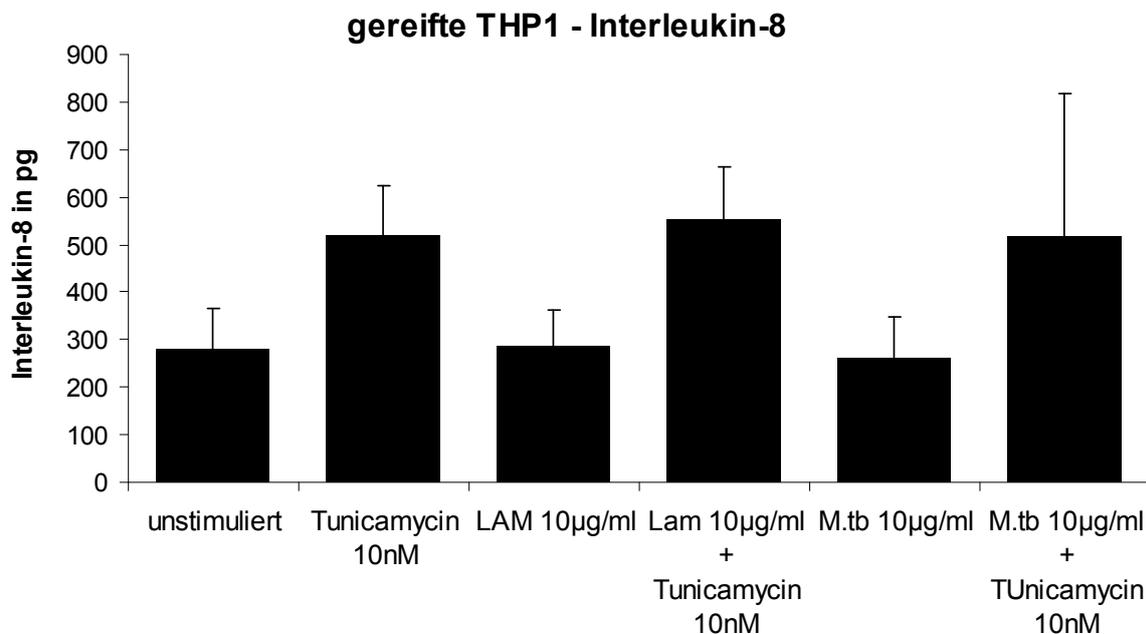


Abb.5.25 Die Tabelle zeigt die Interleukin-8-Freisetzung der gereiften THP1 Zellen nach Stimulation mit Tunicamycin 10nM, LAM 10µg/ml und/oder M.tb. 10µg/ml für 24h. Der Versuch wurde vierfach wiederholt, es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

c) Stimulation mit *P.acnes* und TDM (Cord factor)

Zuletzt wurde die Stimulation der gereiften THP1 Zellen mit Propionibakterien (10µg/ml *P.acnes*) und 5µg/ml TDM, sowie deren Kombination mit 10nM Tunicamycin untersucht. Die relative OS9 Expression wurde hier durch *P.acnes* (Abb.5.26) und TDM (Abb.5.27) erhöht.

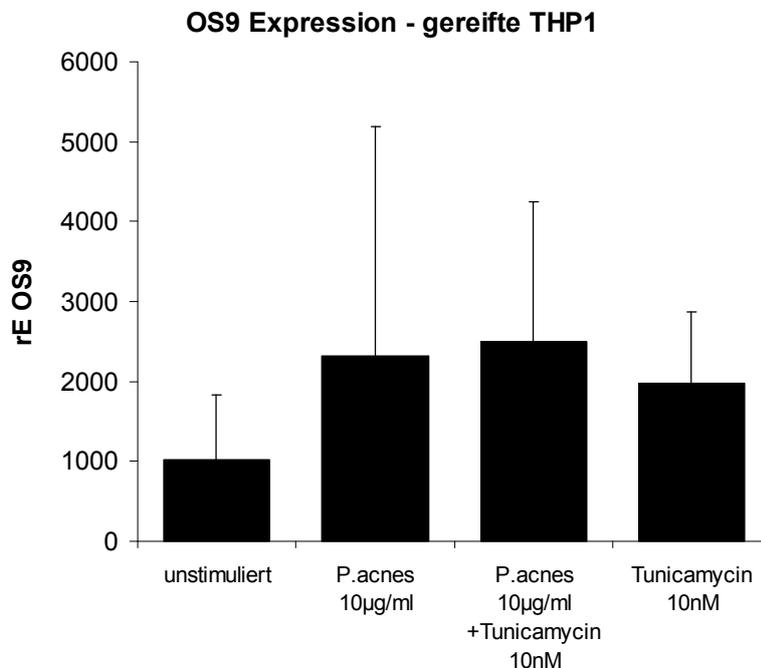


Abb.5.26 Das Säulendiagramm zeigt die relative Expression an OS9 gereifter THP1 Zellen nach Stimulation mit 10µg/ml *P.acnes* und/oder Tunicamycin 10nM für 24 h. Der Versuch wurde vierfach wiederholt (n=4), es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

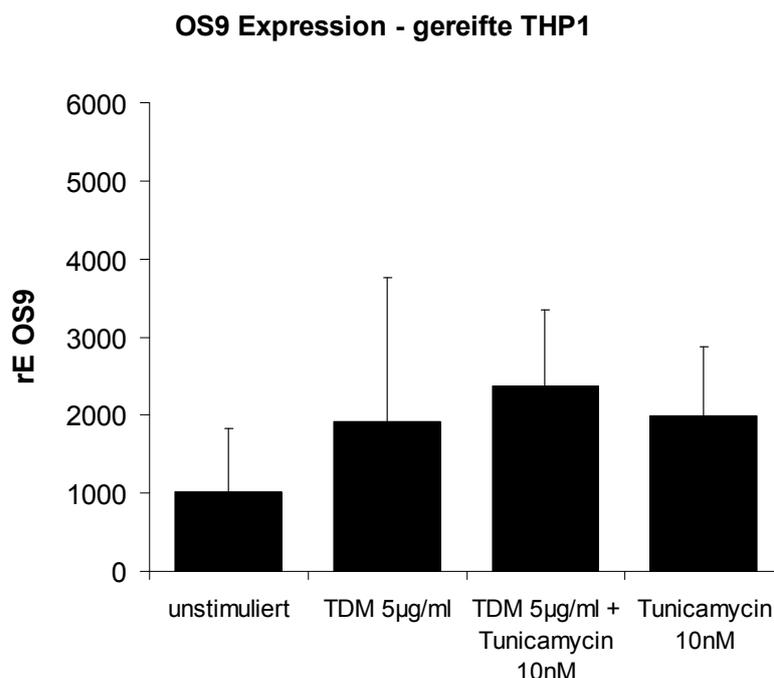


Abb.5.27 Das Säulendiagramm zeigt die relative Expression an OS9 der gereiften THP1 Zellen nach Stimulation mit 5µg/ml TDM und/oder Tunicamycin 10nM für 24 h. (n=4)

Bei Untersuchung der Zytokinproduktion der gereiften THP1 Zellen zeigten sich keine signifikanten Auswirkungen auf die Freisetzung von TNF- α . (Abb.5.28) Weder die Stimulation mit P.acnes noch mit TDM, sowie deren Kombination mit Tunicamycin ließen eine deutliche Tendenz erkennen.

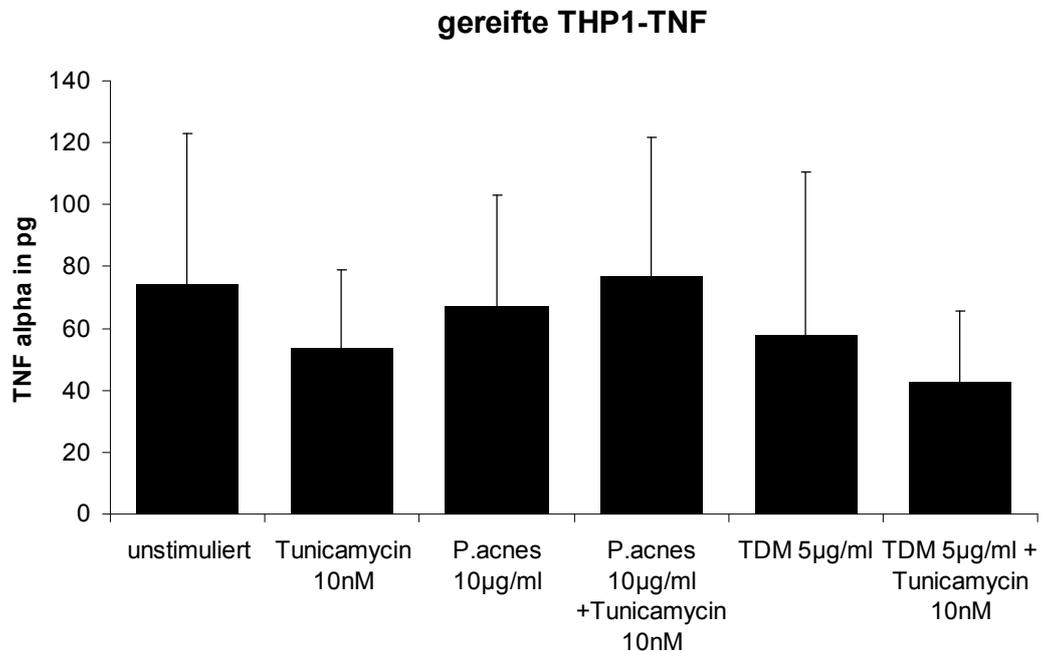


Abb.5.28 Dargestellt ist die Produktion an TNF- α gereifter THP1 Zellen nach Stimulation mit P.acnes, TDM und deren Kombinationen mit Tunicamycin für 24 h. Der Versuch wurde vierfach wiederholt, es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

Wird dagegen die IL-8 Produktion betrachtet, zeigt sich eine Steigerung der Zytokinfreisetzung durch Stimulation mit P.acnes und dessen Kombination mit Tunicamycin. Die Steigerung durch P.acnes erreicht dabei keine Signifikanz ($p=0,06$). (Abb.5.29) Auch durch TDM lässt sich die Interleukin 8 Freisetzung leicht erhöhen. (Abb.5.30)

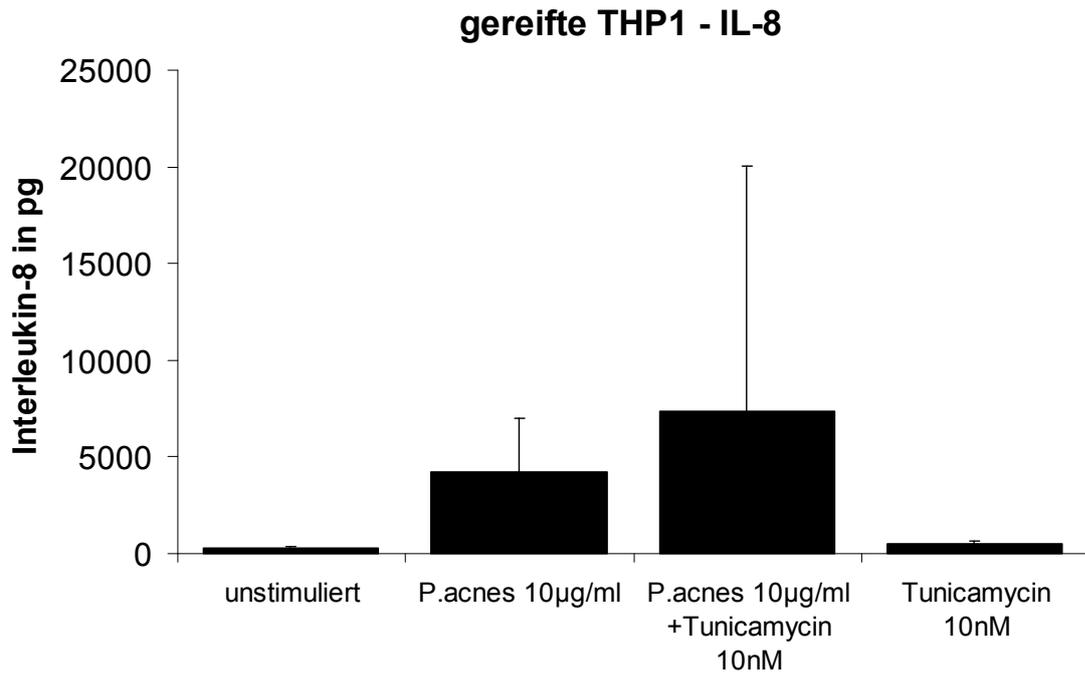


Abb.5.29 Dargestellt ist die Produktion an IL-8 durch gereifte THP1 Zellen nach Stimulation mit P.acnes und einer Kombination mit Tunicamycin für 24h. Der Versuch wurde vierfach wiederholt, es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

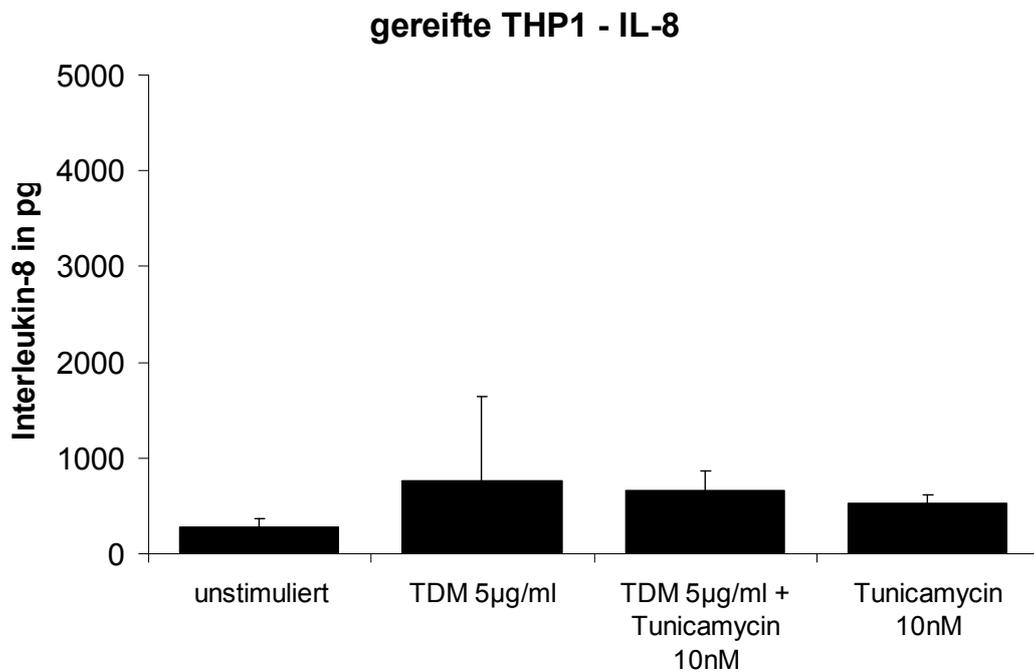


Abb.5.30 Dargestellt ist die Produktion an IL-8 durch gereifte THP1 Zellen nach Stimulation mit TDM 5µg/ml und einer Kombination mit Tunicamycin für 24h. Der Versuch wurde vierfach wiederholt, es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

5.5 Der Vergleich der Reaktion von Monozyten gegenüber THP1- und BAL-Zellen

Des Weiteren wurden die Reaktionen von Monozyten und BAL-Zellen auf verschiedene Stimulanzen beobachtet. Diese wurden im Vergleich zur Zellreihe THP1 betrachtet.

Es wurden BAL-Zellen und Monozyten von bekannten Sarkoidosepatienten untersucht - insgesamt BAL-Zellen von 22 Sarkoidosepatienten, sowie Monozytenproben von 12 Patienten. Als Stimulanzen wurden hierbei 1µg/ml LPS und Tunicamycinlösungen mit den Konzentrationen 10nM und 100nM verwendet. Die Ergebnisse wurden mit den Werten der ungeriffen sowie gereiften THP1 Zellen verglichen und in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt.

Werden die basalen relativen Expressionen von BAL-Zellen, Monozyten und THP1-Zellen verglichen, zeigt sich die geringste OS9 Expression bei ungeriffen THP1-Zellen, gefolgt von BAL-Zellen der Sarkoidosepatienten. Dagegen besitzen Monozyten und gereifte THP1-Zellen eine höhere basale Expression an OS9. (Abb.5.31, unstimuliert)

Durch Stimulation mit LPS zeigen Monozyten und gereifte THP1 Zellen eine leichte Verminderung der OS9 Expression, durch Tunicamycin eine konzentrationsabhängige Steigerung. Ungereifte THP1 Zellen weisen dagegen eine konzentrationsunabhängige Steigerung der Expression durch alle Stimuli auf. (Abbb.5.31, schwarze Säulen) BAL-Zellen bleiben durch LPS unbeeinflusst, steigern jedoch die OS9 Expression konzentrationsabhängig durch die Stimulation mit Tunicamycin. (Abb.5.31, weiße Säulen)

Vergleich OS9: BAL - MNC -THP1

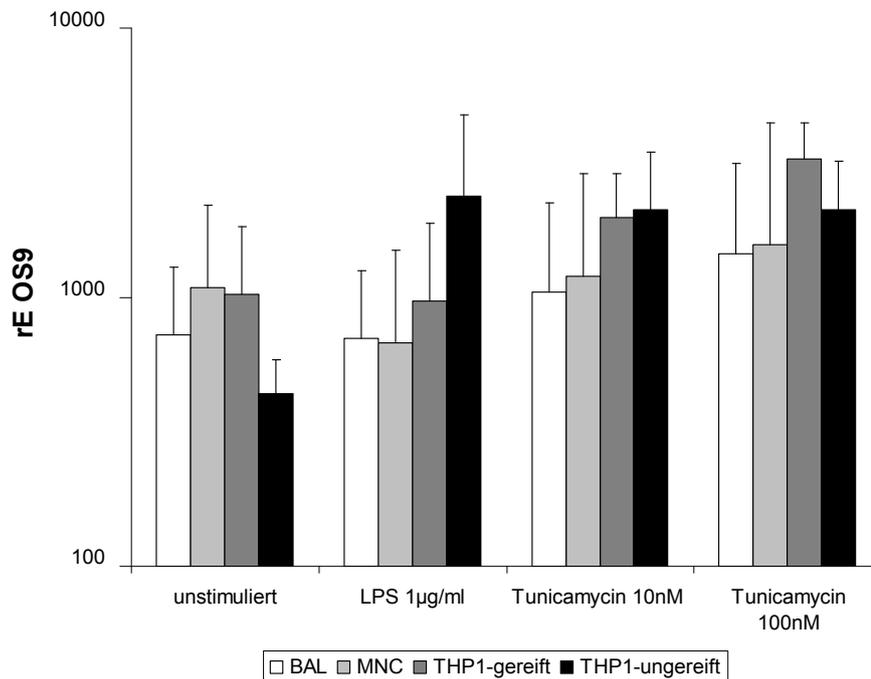


Abb.5.31: Es werden die OS9-Expressionen im unstimulierten Zustand und nach Stimulation mit LPS und Tunicamycin für 24h dargestellt – im Vergleich sind BAL-Zellen und Monozyten von Sarkoidosepatienten aufgeführt, sowie ungereifte und gereifte THP1-Zellen.

Bei Betrachtung der Zytokinproduktion weisen die BAL-Zellen von Sarkoidosepatienten eine deutlich höhere basale TNF- α -Produktion (Abb.5.32, unstimuliert) und eine deutlich höhere basale Interleukin-8-Produktion auf als etwa ungereifte THP1-Zellen. (Abb.5.33 unstimuliert) Durch LPS kommt es bei den BAL-Zellen zu einer leichten Erhöhung der TNF- α -Freisetzung und L-8 Produktion. Tunicamycin hat dagegen kaum Einfluss auf die Zytokinproduktion. (Abb.5.33)

Im Vergleich dazu produzieren die ungereiften THP1-Zellen durch Stimulation mit Tunicamycin und LPS vermehrt TNF- α und IL-8. Bei Steigerung der Tunicamycinkonzentration kommt es allerdings zu einem Absinken der TNF- α -Produktion, wohingegen die IL-8-Produktion konzentrationsabhängig leicht steigt. (Abb.5.32,5.33, schwarze Balken) Gereifte THP1-Zellen und Monozyten steigern ihre Produktion an TNF- α und Interleukin-8 besonders stark durch Stimulation mit LPS. Die Stimulation mit Tunicamycin hat jedoch keinen Einfluss. (Abb. 5.32,5.33, graue Balken)

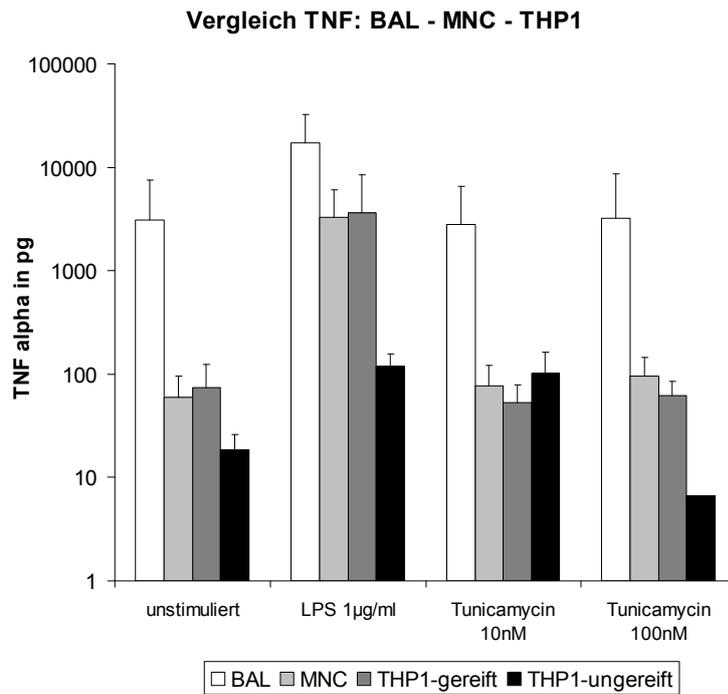


Abb.5.32: Das Diagramm zeigt die TNF- α Zytokinproduktion von BAL-Zellen, Monozyten und THP1-Zellen (gereift und ungereift) vor und nach Stimulation mit LPS und Tunicamycin für 24 h.

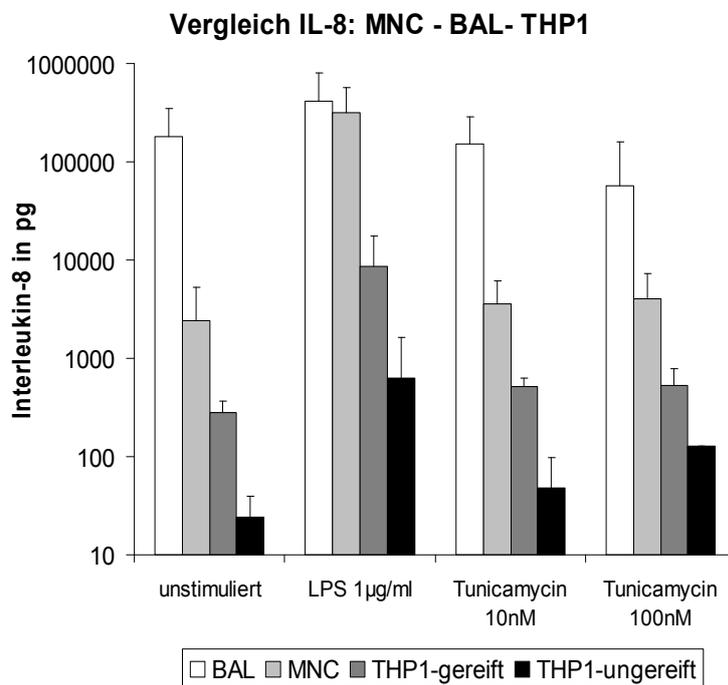


Abb.5.33: Das Diagramm zeigt die IL8 Zytokinproduktion von BAL-Zellen, Monozyten und THP1-Zellen (gereift und ungereift) vor und nach Stimulation mit LPS und Tunicamycin für 24h im Vergleich.

5.6 Die Transfektion der THP1 Zellen mit OS-9 siRNA

In einem Vorversuch wurde die Transfektion mit dem peqFECT Transfektionsreagenz nach bereits beschriebenen Verfahren optimiert. Es wurden verschiedene Konzentrationen an OS9-siRNA getestet und der optimale Stimulationszeitpunkt nach Transfektion bestimmt. Hierbei wurden gereifte THP1-Zellen verwendet, welche zuvor für 72h mit 50nM PMA zur Reifung gebracht wurden. Anschließend folgte eine Inkubationszeit von 24h, nach welcher die Transfektion gestartet wurde. Es wurden zwei verschiedene Endkonzentrationen in der Zellkultur getestet: 5nM – entsprechend 6pmol siRNA in 200µl RPMI, sowie 16,7nM – entsprechend 20pmol siRNA in 200µl RPMI. Zur Kontrolle wurde Wells ohne siRNA und mit scramble angesetzt. Die Stimulation wurde im Vorversuch einmal 24h und einmal 48h nach Transfektion durchgeführt.

Auf diese Weise konnte die optimale Endkonzentration an OS9-siRNA bestimmt werden - hier 16,7nM. Der perfekte Zeitpunkt für den Beginn der Stimulation konnte auf 48h nach Transfektion festgelegt werden.

Der Versuch zeigt ein Absinken der OS9 Expression auf beinahe $\frac{1}{4}$ der Ausgangsexpression bei einer OS9-siRNA Konzentration von 16,7nM genau 48h nach Zugabe des Transfektionsreagenz und der siRNA. (Abb.5.34)

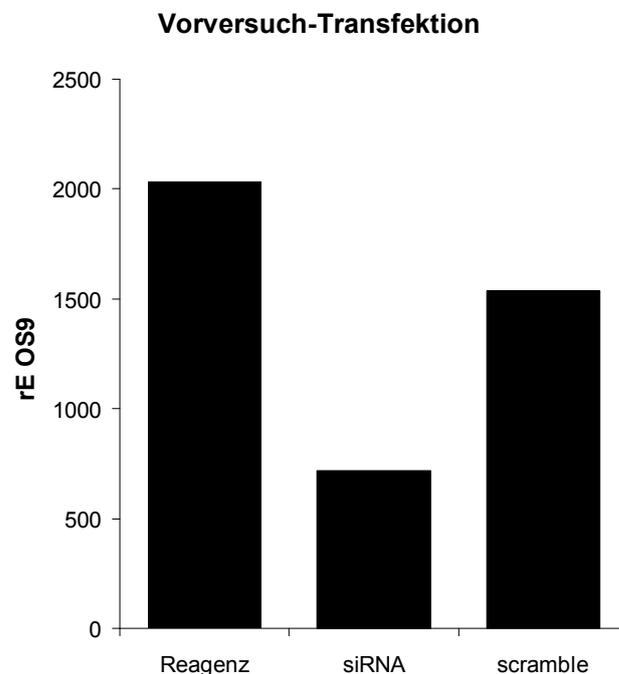


Abb.5.34 Die Abbildung zeigt die OS9 Expression gereifter THP1 Zellen nach Transfektion mit OS9 siRNA, einer scramble RNA (Kontroll-RNA), sowie einer Kontrolle, welche nur mit Reagenz versehen wurde. Es zeigt sich ein Absinken der relativen OS9 Expression um etwa 75% bei Transfektion mit OS9 siRNA.

Unter diesen verbesserten Bedingungen wurde die Transfektion mit anschließender Stimulation an den adhärenen gereiften THP1 Zellen durchgeführt. Die Stimulation wurde also 48h nach Transfektion der Zellen gestartet und nach weiteren 24h mit 200µl Trizol gestoppt.

Durch Zugabe verschiedener Stimulanzen, wie LPS, Tunicamycin, LAM und P.acnes kam es zu einer leichten Erhöhung der Expression an OS9 durch die transfizierten THP1-Zellen. Dabei stieg die Expression auf bis das doppelte der unstimulierten Zellen an (Abb. 5.35, schwarze Säulen). Die Reaktion der Zellen auf die Kontroll-RNA scramble zeigte sich kontrovers - während es bei einigen Stimuli zu einer Erhöhung der Expression kam, regulierten andere die Expression an OS9 herunter. (Abb.5.35, graue Säulen)

In allen Ansätzen sank die relative Expression an OS9 durch Transfektion mit OS9-siRNA (schwarze Säulen) im Vergleich zur Expression der nicht transfizierten Zellen (weiße Säulen) um etwa 50%. (Abb.5.35)

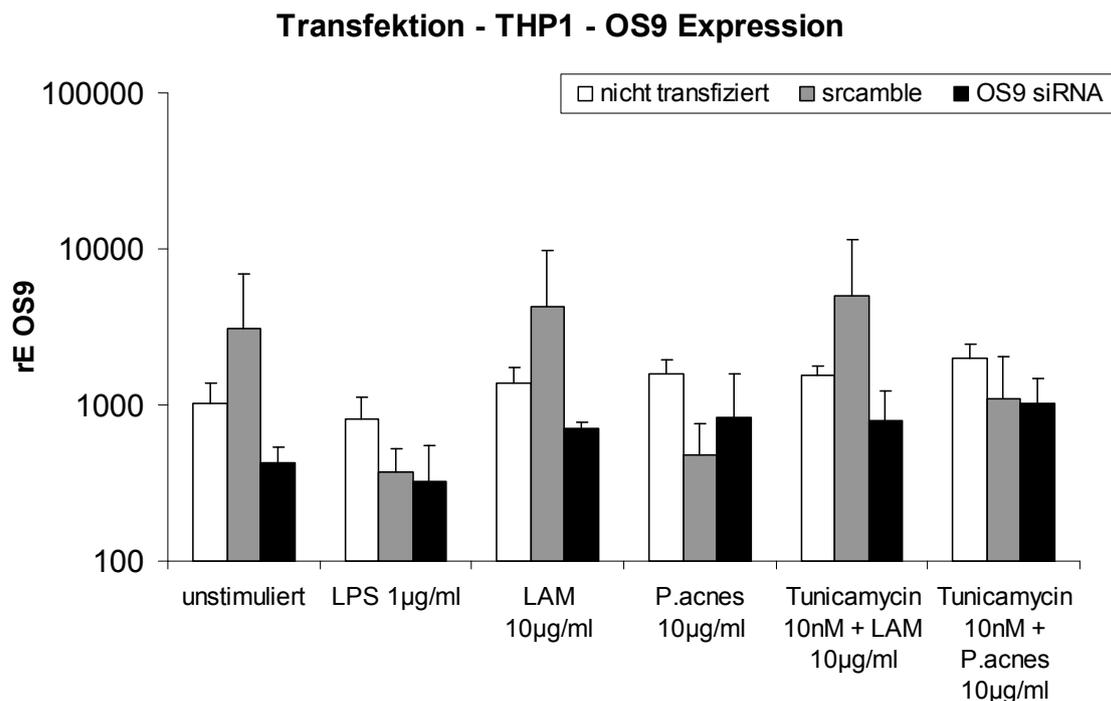


Abb 5.35 Die Abbildung zeigt die Auswirkungen der Transfektion mit siRNA auf gereifte THP1-Zellen. Es wurden die relative Expressionen von OS9 der Zellen im nicht transfizierten Zustand und nach Transfektion mit OS9-siRNA aufgeführt. Als Kontrolle wurde eine scramble RNA verwendet. (n=3)

Die TNF- α -Produktion nach Transfektion mit siRNA stieg im unstimulierten Zustand leicht an. (Abb.5.36, unstimuliert) Bei Stimulation mit 1 μ g/ml LPS kam es sogar zu einem leichten Absinken der Freisetzung von TNF- α durch transfizierte Zellen. Bei allen weiteren getesteten Stimulanzen zeigte sich eine annähernd gleichbleibende Produktion an TNF- α – unabhängig von Stimulus, scramble und OS-9 siRNA. (Abb. 5.36)

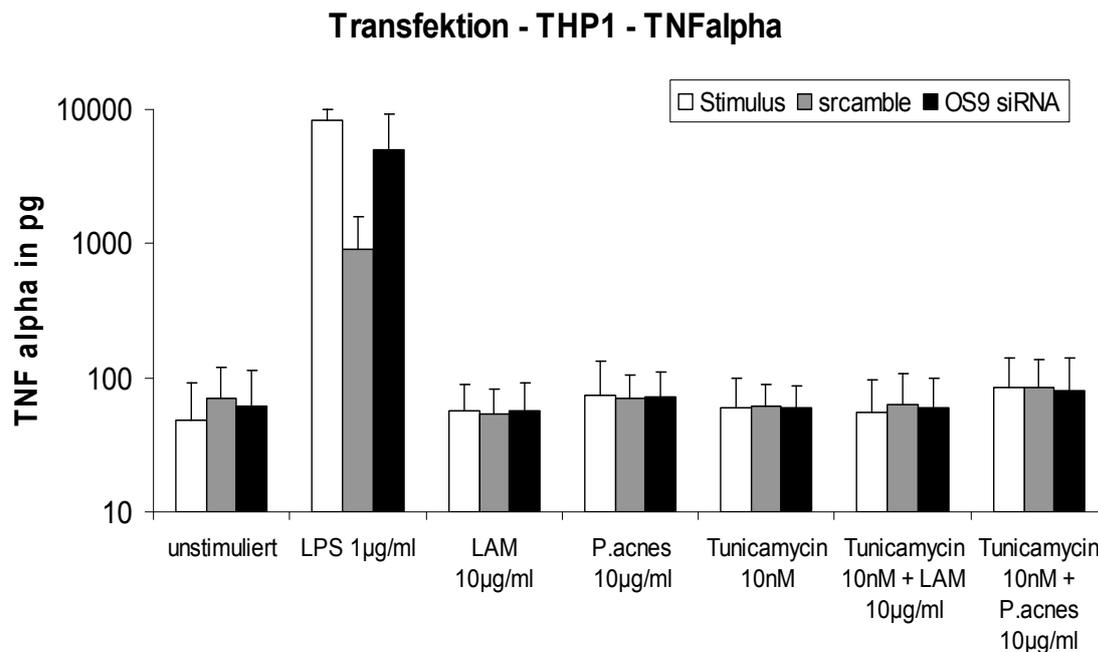


Abb.5.36 Das Diagramm zeigt die TNF- α -Zytokinproduktion von gereiften THP1 Zellen im nicht transfizierten Zustand (weiße Säulen) und transfizierten Zustand (schwarze Säulen). Zur Kontrolle wurden Zellen mit scramble RNA behandelt (graue Säulen). Dabei wird die Produktion in unstimulierten Zustand und nach verschiedenen Stimulationen für 24h gezeigt. Die Versuche wurden dreifach durchgeführt.

Werden transfizierte mit nicht transfizierten THP1 Zellen verglichen, zeigt sich die IL-8-Freisetzung im unstimulierten Zustand durch Zugabe der OS9-siRNA gesteigert. (Abb. 5.37, unstimuliert) Diese Steigerung lässt sich auch bei Stimulation mit Tunicamycin beobachten. Dagegen kommt es durch Stimulation mit 1 μ g/ml LPS und 10 μ g/ml LAM zu einem Abfall des Interleukin-8. Durch 10 μ g/ml P.acnes wird ebenfalls eine leichte Erniedrigung der IL-8-Produktion beobachtet. (Abb.5.37, Vergleich weiße und schwarze Säulen)

Durch die Kombination von Tunicamycin mit LAM kommt es zu einer annähernd gleich bleibenden IL-8-Produktion. Einzeln rufen diese Simulanzen jedoch gegensätzliche Reaktionen hervor. Die Kombination von Tunicamycin und P.acnes führt dagegen zu einem Anstieg der IL-8-Freisetzung. (Abb.5.37)

Transfektion - THP1 - Interleukin-8

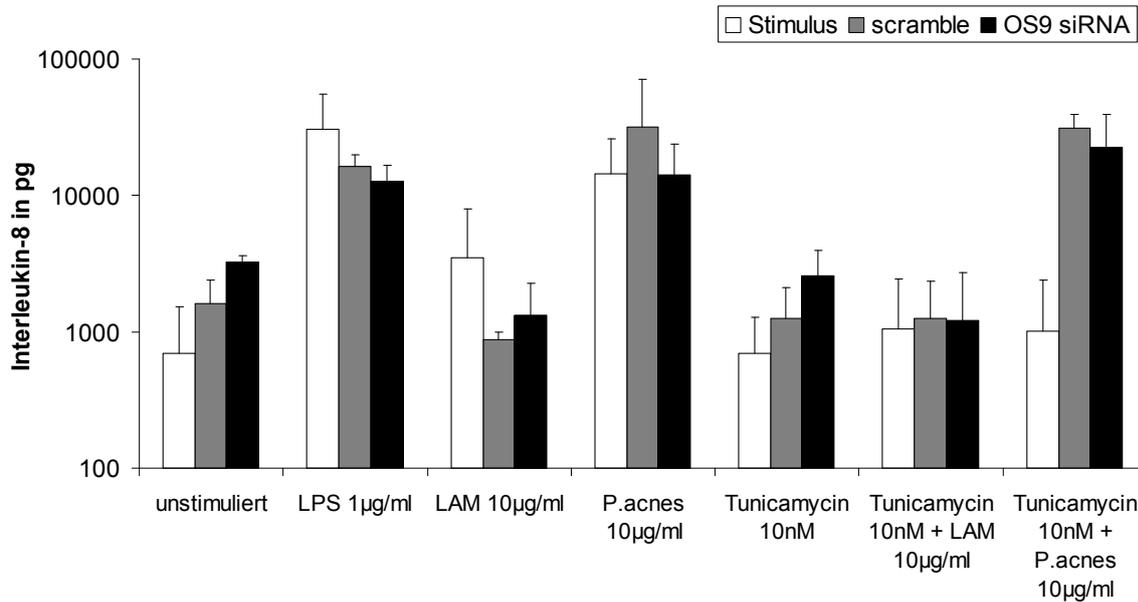


Abb.5.37 Die Diagramme zeigen die IL8-Zytokinproduktion von gereiften THP1 Zellen im nicht transfizierten Zustand (weiße Säulen) und transfizierten Zustand (schwarze Säulen). Zur Kontrolle wurden Zellen mit scramble RNA behandelt (graue Säulen). Dabei wird die Produktion in unstimulierten Zustand und nach verschiedenen Stimulationen für 24h gezeigt. Die Versuche wurden dreifach durchgeführt.

Da bereits die Transfektion der gereiften THP1 Zellen die Produktion an Interleukin-8 im unstimulierten Zustand beeinflusst, wurden die Ergebnisse ins Verhältnis zur Zytokinproduktion gesetzt. Hierfür wurden jeweils die Werte der unstimulierten Ansätze mit OS-9 siRNA und scramble als 100% gesetzt. Dabei zeigten sich einige Auffälligkeiten.

Sowohl bei nicht transfizierten Zellen als auch bei Transfektion mit scramble-RNA fand sich eine deutliche Stimulation der IL-8 Freisetzung nach Stimulation mit P.acnes. (Abb.5.38, Stimulus und scramble) Bei Hemmung der OS9 Expression durch siRNA zeigte sich dagegen eine deutlich niedrigere P.acnes-induzierte Interleukin-8 Freisetzung. (OS9-siRNA) Sie entspricht nur noch einem geringen Anteil der induzierten Zytokinproduktion durch nicht transfizierte Zellen (scramble) und der scramble-transfizierten Zellen. (Abb.5.38)

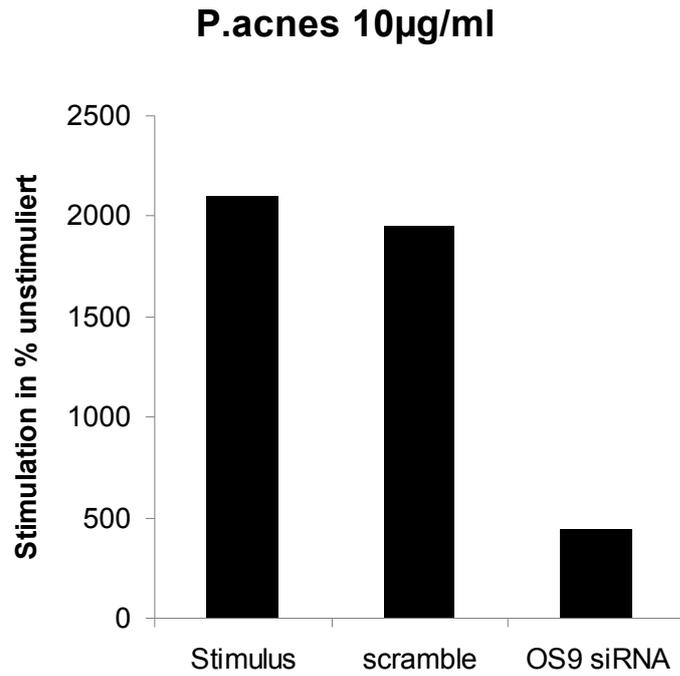


Abb.5.38 Dargestellt ist die Interleukin-8 Produktion nach Stimulation von THP1 Zellen mit P.acnes für 24h im nichttransfizierten Zustand bzw. nach Transfektion mit scramble oder OS-9 siRNA. Die Ergebnisse wurden ins Verhältnis zur Zytokinproduktion im unstimulierten Zustand gesetzt (jeweils siRNA und scramble unstimuliert =100%).

5.7 Die Reaktion von BAL-Zellen auf verschiedene Stimuli im Vergleich: Sarkoidosepatienten zu Kontrollpatienten

Zur Untersuchung der Reaktion von BAL-Zellen auf verschiedene Stimuli wurden die OS9 Expression, sowie die Freisetzung von TNF- α und Interleukin-8 gemessen. Dabei wurden die Reaktionen der BAL-Zellen von Sarkoidosepatienten mit denen von Kontrollpatienten verglichen. Insgesamt wurden hierbei 12 Sarkoidosen und 5 Kontrollen untersucht. Auch hier fand eine 24-stündige Stimulation mit mehreren Stimulanzen statt.

Sarkoidosepatienten zeigten hier eine höhere basale OS9-Expression als Patienten ohne Sarkoidose. (Abb.5.39) Während Sarkoidosepatienten durch Stimulation mit Tunicamycin und dessen Kombination mit LPS ein Absinken des OS9 aufweisen (Abb.5.39, schwarze Balken), kommt es bei Kontrollpatienten sogar zu einem leichten Anstieg der Expression an OS9. (Abb.5.39, weiße Balken)

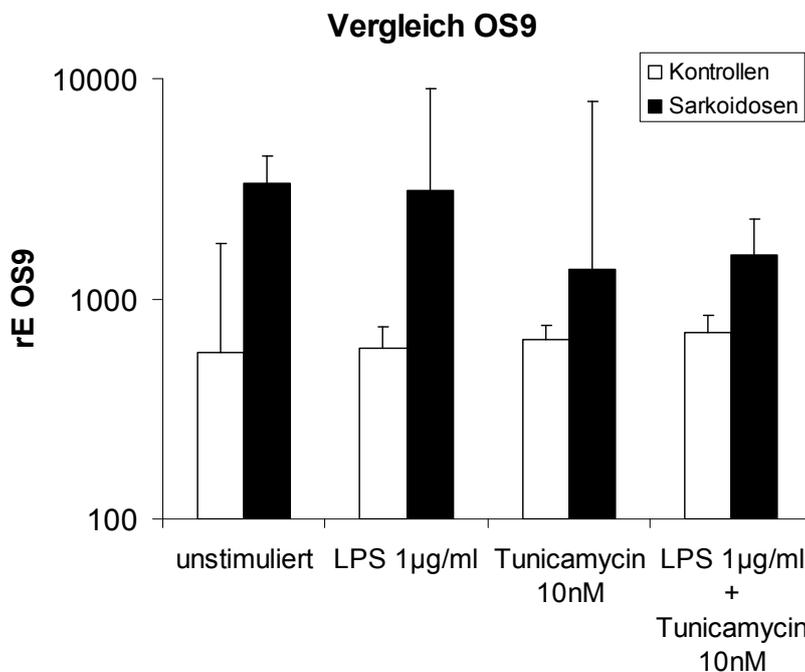


Abb.5.39 Zur Darstellung kommt die Expression an OS9 durch BAL-Zellen von Sarkoidose- und Kontrollpatienten – hier im unstimulierten Zustand, sowie nach Stimulation mit LPS und Tunicamycin für 24h.

Dieses Verhalten zeigt sich auch bei Stimulation mit LAM, M.tb, P.acnes und TDM. (Abb.5.40) Es kommt auch hier zu einem Absinken der OS9 Expression bei Sarkoidosepatienten (Abb.5.40, schwarze Säulen), wohingegen die OS9 Expression bei Kontrollpatienten nahezu konstant bleibt. (Abb.5.40, weiße Säulen).

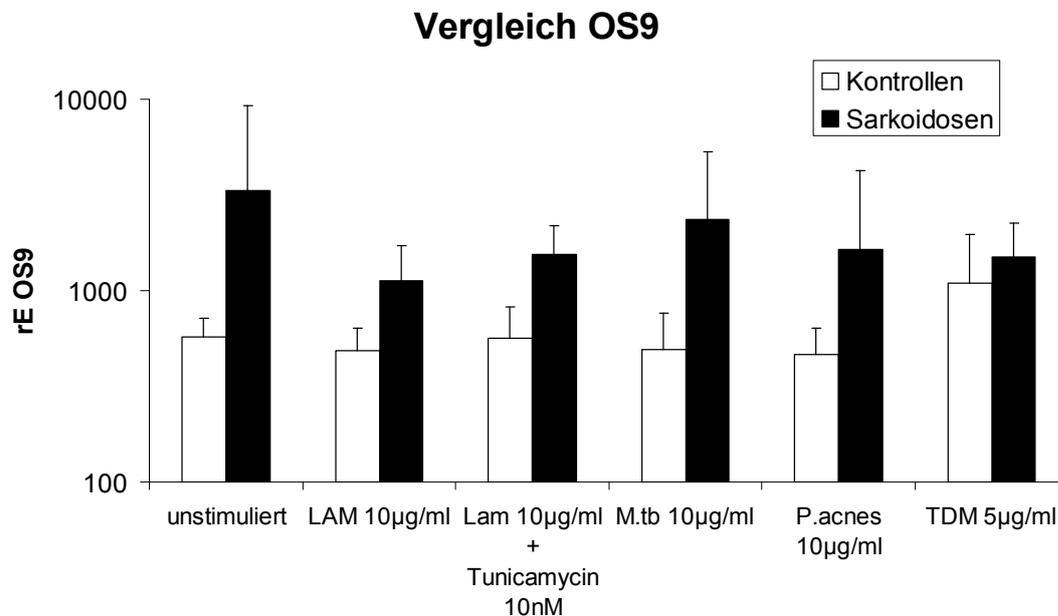


Abb.5.40 Die Abbildung zeigt das OS9 Expressionsverhalten der BAL-Zellen von Sarkoidosepatienten und Kontrollen im Vergleich. Aufgeführt wird die Expression in unstimulierten Zustand und nach 24-stündiger Stimulation mit verschiedenen Stimulanzen.

Des Weiteren wurde die Produktion an TNF- α der BAL-Zellen bestimmt. Dabei zeigte sich eine minimal höhere basale TNF- α -Produktion durch Kontrollpatienten im Vergleich zu den hier ausgewählten Sarkoidosepatienten. Bei beiden Gruppen kommt es zu einem Anstieg der TNF- α Freisetzung durch LPS. (Abb.5.41) Auch durch weitere getestete Stimulanzen, wie P.acnes ließ sich eine Erhöhung der TNF- α Rate erreichen. (Abb.5.42)

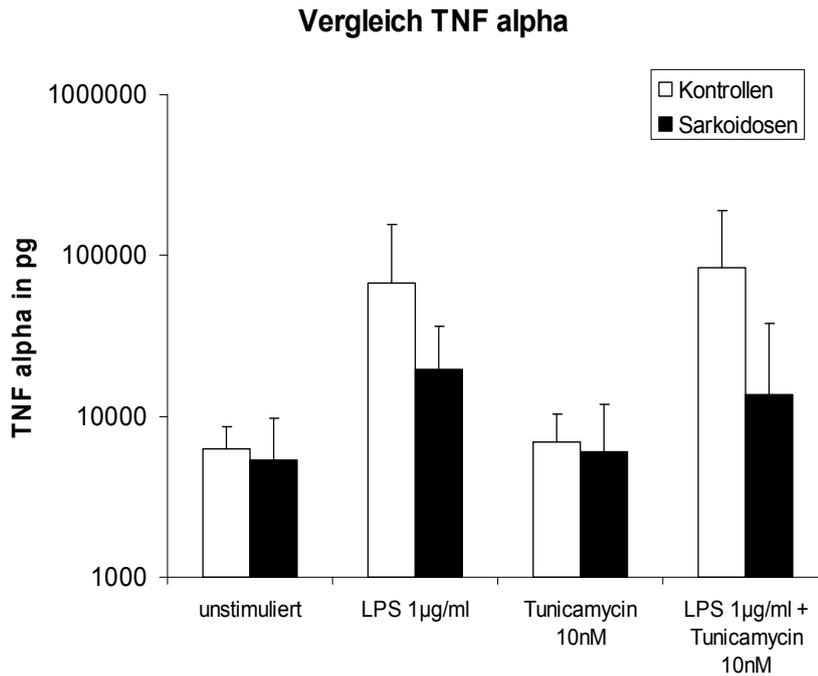


Abb.5.41 Die Tabelle zeigt die Produktion an TNF- α durch BAL-Zellen von Sarkoidose- und Kontrollpatienten im unstimulierten Zustand, sowie nach Stimulation mit LPS und Tunicamycin für 24h. Es wrden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen angegeben.

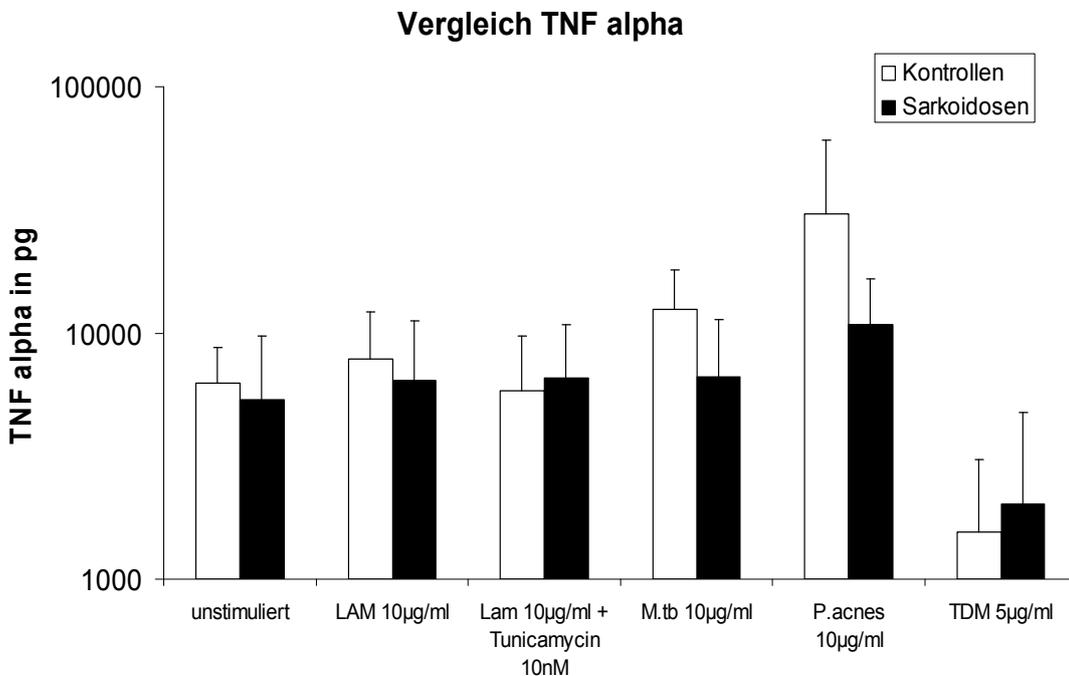


Abb.5.42 Die Abbildung zeigt die Freisetzung an TNF- α durch BAL-Zellen. Im direkten Vergleich wurde hier die Zytokinfreisetzung der BAL-Zellen von Sarkoidose- und Kontrollpatienten im unstimulierten Zustand und nach verschiedenen Stimulationen für 24h aufgeführt.

Die Interleukin-8 Produktion der BAL Zellen im unstimulierten Zustand zeigt sich bei Kontrollpatienten höher als bei Sarkoidosepatienten. Durch LPS wird in beiden Gruppen vermehrt IL-8 produziert. (Abb.5.43) Während Sarkoidosepatienten durch weitere Stimuli ihre Interleukin-8-Freisetzung annähernd konstant halten, kommt es bei Kontrollpatienten zu einem leichten Anstieg. Ausnahme bildet die Stimulation durch P.acnes – hier steigern beide Gruppen die IL-8-Produktion. (Abb.5.44)

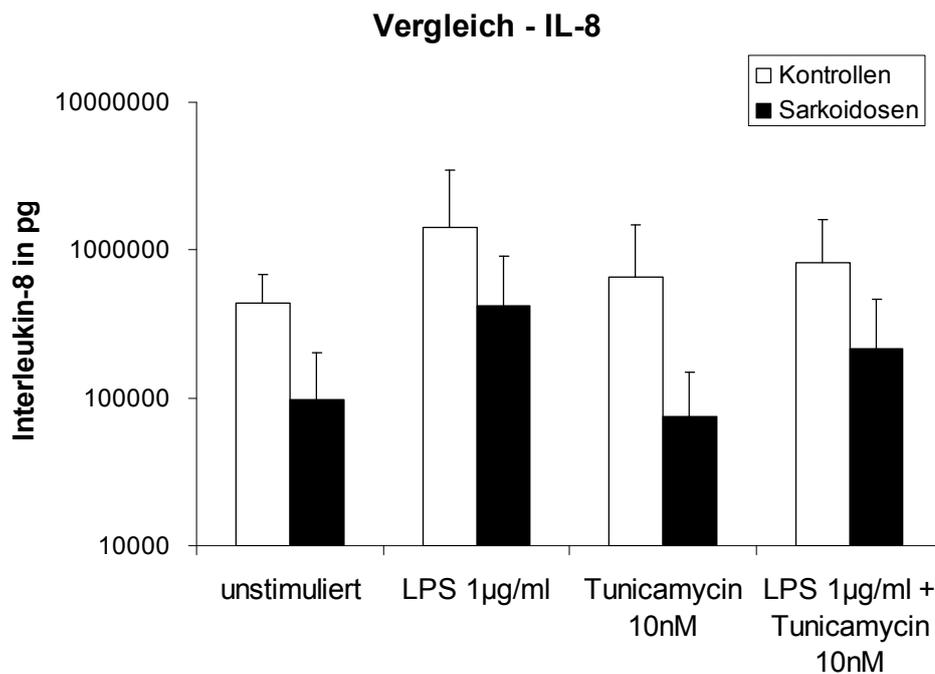


Abb.5.43 Die Abbildung zeigt die Produktion an Interleukin-8 durch BAL-Zellen von Sarkoidose- und Kontrollpatienten im unstimulierten Zustand, sowie nach Stimulation mit LPS und Tunicamycin für 24h. Es werden Mittelwerte und ihre Standardabweichungen angegeben.

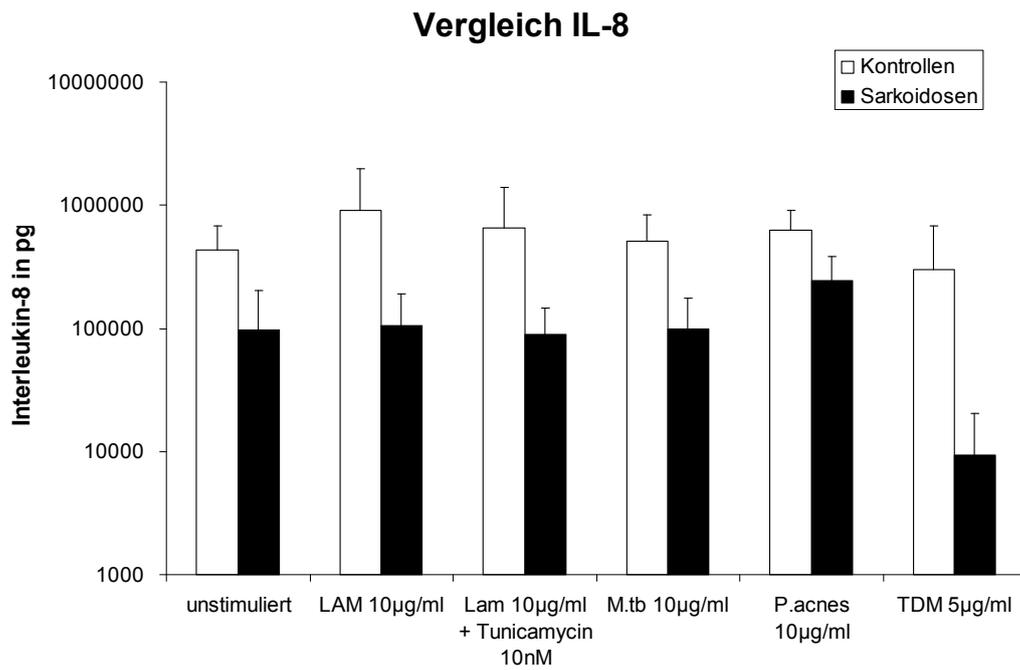


Abb.5.44 Die Abbildung zeigt die Freisetzung an Interleukin-8 durch BAL-Zellen. Im direkten Vergleich wurde hier die Zytokinfreisetzung der BAL-Zellen von Sarkoidosepatienten und Kontrollpatienten im unstimulierten Zustand und nach Stimulation mit verschiedenen Stimulanzen für 24h aufgeführt.

5.8 Die Frage nach Korrelation zwischen Genotyp der Sarkoidosepatienten und OS9 Expression

In diesem Versuch wurden BAL-Zellen von insgesamt 24 Sarkoidosepatienten untersucht. Zudem wurde der Genotyp der Patienten für das OS9 Gen bestimmt.

Die BAL-Zellen der Sarkoidosepatienten wurden für 24h mit LPS 1µg/ml stimuliert und dann mit Trizol gestoppt. Die Expression der Zellen an OS9 wurde im unstimulierten Zustand bestimmt. Die Überstände wurden auf die Produktion an TNF-α im unstimulierten und stimulierten Zustand hin untersucht.

Im Folgenden wird die Verteilung der Genotypen innerhalb der untersuchten Patientengruppe dargestellt. (Abb.5.45) Dabei gibt es einen Anteil von etwa 20% der Sarkoidosepatienten mit Genotyp TT, sowie jeweils etwa 40% mit Genotyp TC und CC.

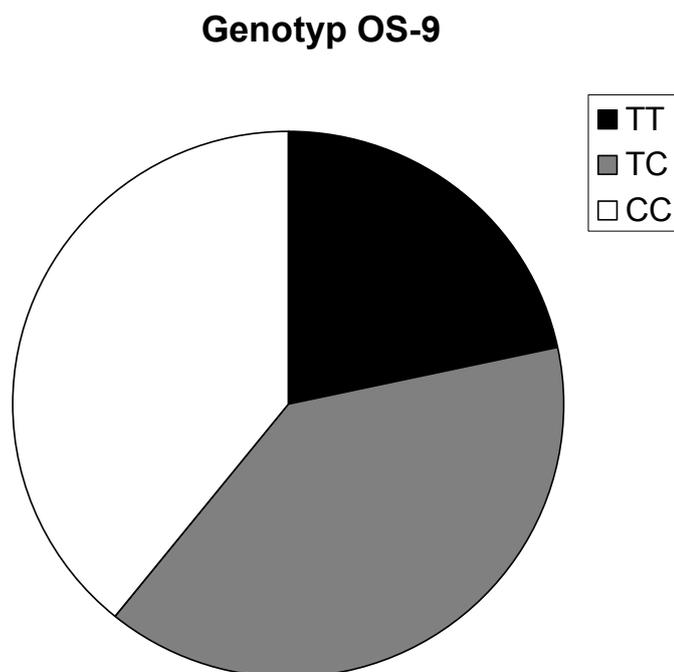


Abb.5.45 Die Abbildung zeigt die Verteilung der Genotypen der Sarkoidosepatienten. In der untersuchten Patientengruppe befinden sich 20% der Patienten mit dem Genotyp TT, sowie jeweils 40% mit Genotyp TC und CC.

Zudem wurde die mittlere basale Expression an OS9 in Abhängigkeit des Genotyps bestimmt. Dabei zeigte sich im Mittel, dass Patienten mit Genotyp CC die geringere basale Expression an OS9 besitzen, während Patienten mit Genotyp TT die höhere Expression besitzen. (Abb.5.46) Innerhalb der Genotypen zeigt sich eine hohe Varianz der basalen OS9 Expression.

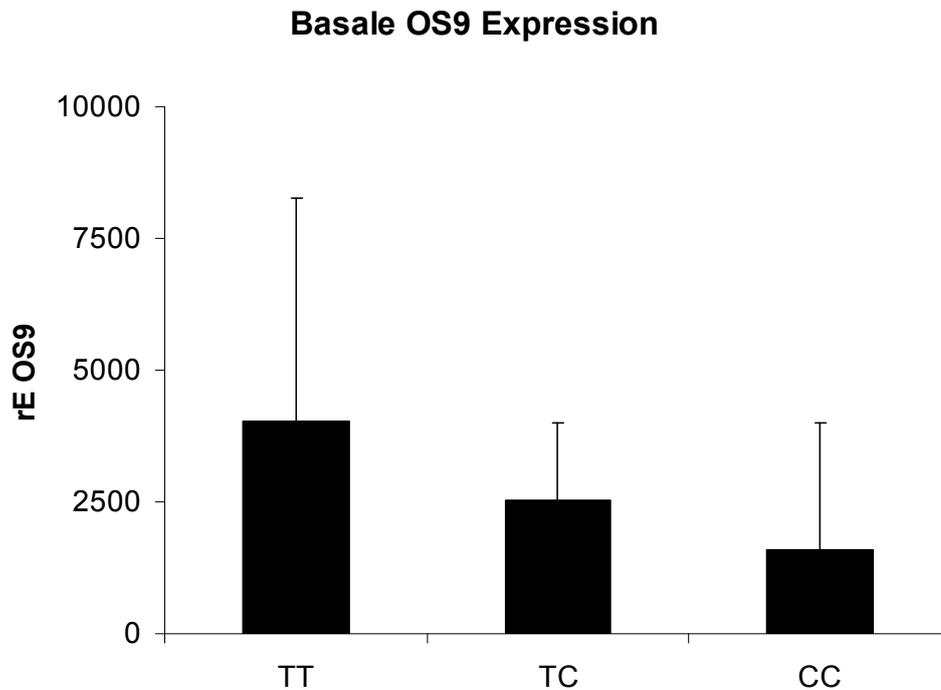


Abb.5.46 Die Abbildung zeigt die basale relative Expression an OS9 der BAL Zellen von Sarkoidosepatienten in Abhängigkeit des Genotyps. Es werden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen dargestellt.

Bei Betrachtung der basalen Produktion an TNF- α in Abhängigkeit des Genotyps zeigt sich, dass Patienten mit Genotyp CC im Mittel die höchste basale TNF- α Freisetzung aufweisen. Patienten mit Genotyp TT dagegen die geringste. (Abb.5.47) Patienten mit der geringsten basalen OS9 Expression, produzieren am stärksten das Zytokin TNF- α . Es zeigen sich jedoch hohe Standardabweichungen.

Nach Stimulation der Zellen mit 1 μ g/ml LPS steigern alle Patienten die Produktion an TNF- α . (Abb.5.48) Auch hier lassen sich insbesondere bei Untersuchung der Zytokinproduktion der Patientengruppe mit Genotyp CC hohe Standardabweichungen verzeichnen.

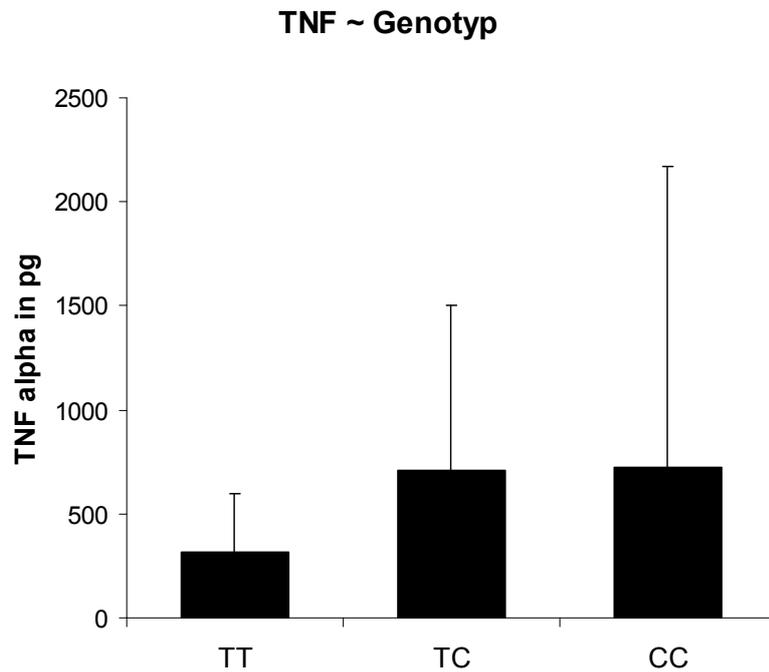


Abb.5.47 Die Abbildung zeigt die basale TNF- α Produktion der BAL-Zellen von Sarkoidosepatienten in Abhängigkeit des Genotyps für das OS9. Es werden Mittelwerte und ihre Standardabweichungen dargestellt.

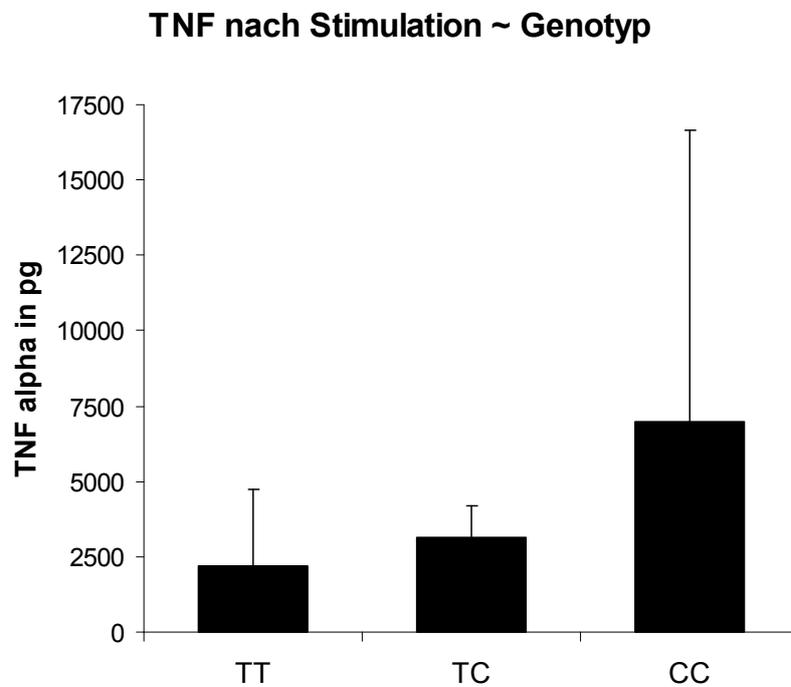


Abb.5.48 Die Abbildung zeigt die TNF- α Produktion der BAL-Zellen in pg nach Stimulation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS für 24h. Die Patientengruppe ist nach Genotyp aufgeteilt.

6. Diskussion

Die Sarkoidose ist eine Multisystemerkrankung unklarer Genese, die durch eine chronische Inflammation gekennzeichnet ist, welche zu mononukleären Zellinfiltrationen und Bildung von epitheloidzelligen Granulomen führen kann. [1, 2] Es wird ein Zusammenspiel von Umweltfaktoren und genetischen Faktoren vermutet. [2]

Es wird angenommen, dass eine übermäßige granulomatöse Reaktion nach Exposition mit einem nicht identifizierten Antigen bei Individuen mit einer genetischen Anfälligkeit die Erkrankung auslösen kann. [1, 7] Dabei handelt es sich wahrscheinlich um verschiedene, schlecht abbaubare Antigene infektiösen oder umweltbedingten Ursprungs, die diese Reaktion triggern. [7] Neben Mykobakterien und deren Bestandteilen [23, 27, 28], sowie *Propionibacterium acnes* [162], wird auch die Exposition zahlreicher verschiedener Schadstoffe der Umwelt diskutiert. So zeigte sich eine starke Zunahme der Inzidenz sarkoidoseähnlicher granulomatöser Lungenerkrankungen bei Helfern des 11. Septembers 2001, die dem Staub des World Trade Centers ausgesetzt waren. Im folgenden ersten Jahr stieg die Inzidenz auf 86 von 100 000 bei einer ursprünglich stabilen Inzidenz von 15 pro 100 000 Einwohner in den Jahren zuvor. [68] Ein eindeutiges „Sarkoidose-Antigen“ konnte jedoch bis heute nicht identifiziert werden und bleibt weiterhin Gegenstand aktueller Forschung.

Es wird zudem angenommen, dass prädisponierende genetische Faktoren einen Einfluss auf die Entstehung, den Verlauf und die Prognose der Erkrankung Sarkoidose haben. [18, 63] Diese Annahme wird zum einen durch die verschiedenen Inzidenz- und Prävalenzraten in unterschiedlichen Populationen und ethnischen Gruppen, als auch durch die familiäre Häufung der Sarkoidose bestärkt. [54, 79] Es wird vermutet, dass es protektive Allele gibt, die eine effiziente Immunantwort ermöglichen, die dann das „Sarkoidose-Antigen“ eliminieren und vor der Manifestation der Erkrankung schützen. [35] Hieraus lässt sich ableiten, dass durch verschiedenartige Veränderungen dieser protektiven Allele ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für betroffene Gruppen hervorgeht.

In vergangenen Studien wurden zahlreiche Untersuchungen zu den major histocompatibility complex genes (MHC) durchgeführt. Hierbei wurden bestimmte Allele des humanen Leukozyten-Antigens (HLA) in Zusammenhang mit der Sarkoidose gebracht. [44, 122] Zudem wurde in einer Studie von Valentonyte et al das BTLN2 Gen auf Chromosom 6, welches eine Rolle in der T-Zellaktivierung spielt, als möglicher Prädispositionslokus untersucht. [136]

In einer Studie von Hoffmann et al. wurde OS9 (osteosarcoma amplified 9) als ein wahrscheinlicher Risikofaktor für Sarkoidose ermittelt. [56, 57] Dieses Osteosarkom-Protein ist durch das OS9 Gen kodiert [78] und befindet sich als möglicher Prädispositionsloкус auf der chromosomalen Region 12q13.3-q14.1. [57] Neben der Annahme, dass Sarkoidosepatienten eine höhere OS9 Expression als Kontrollpersonen aufweisen, konnte auch eine signifikante negative Korrelation der OS9 Expression mit den homozygoten Trägern des Risikoallels rs1050045 festgestellt werden. Patienten mit Genotyp CC sind dabei stärker mit der akuten Form der Sarkoidose assoziiert. [56]

In dieser Arbeit wird die Induktion und Regulation des OS9 bei Sarkoidose- und Kontrollpatienten beobachtet, sowie die Funktion des OS9 mit Hilfe von monozytären Zelllinien untersucht. Dabei wurden auch die Auswirkungen einer Blockierung des OS9 durch siRNA untersucht und welchen Einfluss das Fehlen von OS9 auf den Umgang mit verschiedenen Stimulanzen hat.

6.1 Vergleich der OS9 Expression verschiedener myelozytärer Vorläuferzellen

Alveolarmakrophagen und Monozyten spielen sowohl in der Immunpathogenese als auch im Krankheitsverlauf der Sarkoidose eine entscheidende Rolle. [62] Alveolarmakrophagen sind durch Freisetzung zahlreicher Mediatoren und Zytokine [13, 88] an der Inflamationsreaktion und Entstehung der Alveolitis beteiligt. Zur Untersuchung der Rolle des OS9 im Rahmen der Sarkoidose wurden als in vitro Modelle der Alveolarmakrophagen verschiedene myelozytäre Vorläuferzellen untersucht - HL60-Zellen, U937-Zellen und THP1-Zellen. Im Verlauf der Hämatopoese können aus einer pluripotenten Stammzelle myeloide und lymphoide Stammzellen hervorgehen. In der weiteren Entwicklung der myeloiden Stammzellen können sich sogenannte myelo-monozytären Vorläuferzellen (GMP) bilden, welche in Makrophagen und Granulozyten differenzieren können. [103]

Dabei lassen sich die untersuchten Zelllinien einem Differenzierungsgrad der Monozyten zuordnen. Wie in Abbildung 6.1 zu sehen, befinden sich HL60-Zellen in einem Reifungsstadium, welches der Entwicklung der Blasten in Promonozyten bzw. Promyelozyten einzuordnen ist. Die U937-Zellreihe und die THP1-Zellen sind dagegen weiter differenziert.

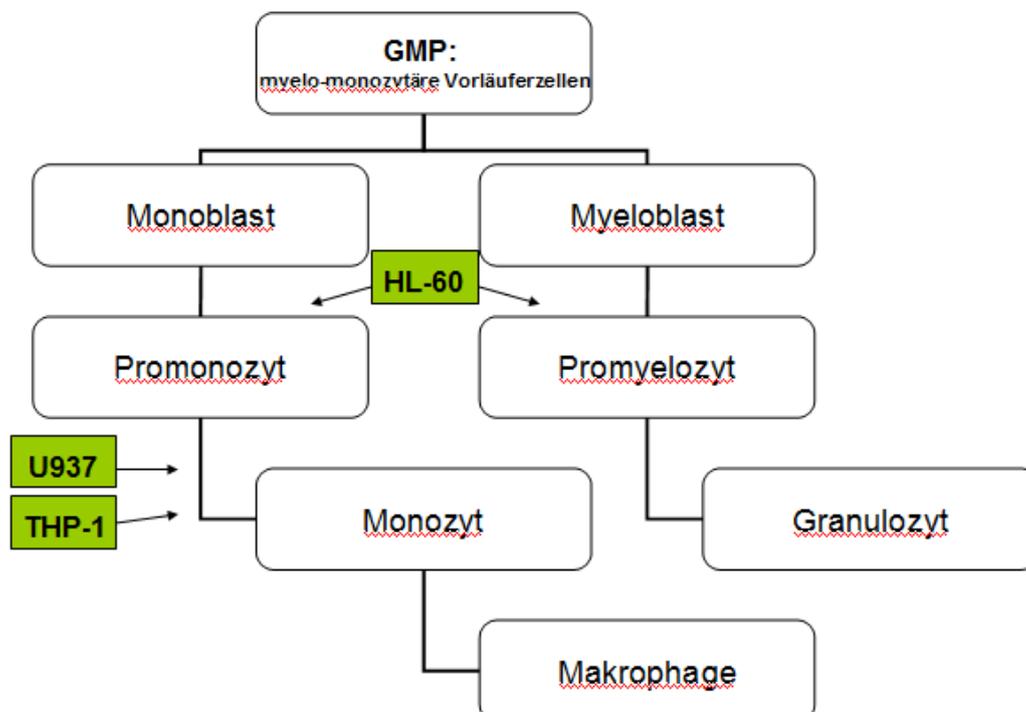


Abb.6.1 Differenzierung myelo-monozytärer Vorläuferzellen in Monozyten und Granulozyten

Die Ergebnisse des Vorversuchs zeigen, dass im unstimulierten Zustand die HL60-Zellreihe eine sehr niedrige OS9-Expression besitzt, die sich durch Stimulanzen nur gering steigern lässt. (Abb.5.1) Dagegen weist die U937 Reihe eine sehr hohe basale Expression an OS9 auf, jedoch ohne weitere Steigerungsfähigkeit. Die Stimulanzen bewirken hier sogar einen Abfall der Expression, was möglicherweise durch unzureichende Abwehrmechanismen der U937 Zellen gegen Zellstress erklärt werden kann. THP1-Zellen besitzen dagegen eine niedrige OS9 Expression im unstimulierten Zustand, welche sich durch Stimuli wie LPS und Tunicamycin gut steigern lässt. (Abb.5.1) Ihre Reaktion entspricht dem für Monozyten bzw. Makrophagen erwarteten Verhaltensmuster. Diese kann aufgrund bisheriger Erkenntnisse gut erklärt werden. Sowohl das Zellgift Tunicamycin als auch das Endotoxin LPS verursachen starken Zellstress und beeinflussen über Einleitung einer ER-Stressantwort verschiedene Genexpressionen. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, gehört dazu auch die Steigerung der OS9 Expression.

Aufgrund der Ergebnisse im Vorversuch scheint die THP1-Zellreihe ein optimales Versuchsmodell zu bieten, um die Reaktion von Makrophagen bzw. Monozyten simulieren zu können. Zudem konnte in anderen Arbeiten gezeigt werden, dass verglichen mit anderen humanen myeloischen Zelllinien, THP1-Zellen das bessere Modell darstellen, um das Verhalten von Makrophagen in vitro zu untersuchen. [3] Angesichts dieser Erfahrungen und der Ergebnisse wurde die THP1-Zellreihe für die weiteren Experimente ausgewählt.

6.2 PMA gereifte THP1 Zellen als Modell für Makrophagen

Die Versuche zur Untersuchung des Expressions- und Stressverhaltens von THP1-Zellen wurden im ungereiften und gereiften Zustand der THP1-Zellen durchgeführt. Dabei simulieren ungereifte THP1-Zellen als monozytäre Vorläuferzellen am ehesten die Reaktion von Monozyten. Diese wurden in zahlreichen Studien als Vertreter für humane Monozyten gewählt. [49, 61, 112] Dagegen bringt eine Reifung der THP1-Zellen makrophagenähnliche Zellen hervor. [81] Die Reifung der Monozyten zu makrophagenähnlichen Zellen mittels PMA [15], konnte hier erfolgreich durchgeführt werden. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die mittels PMA gereiften THP1-Zellen ähnliche morphologische und physiologische Charakteristika wie Makrophagen besitzen. [81] In einer Veröffentlichung konnte zudem nachgewiesen werden, dass bestimmte Gene, die in Makrophagen exprimiert werden, wie Apolipoprotein E, Matrix-Metalloproteinase 9 und α 2-Makroglobuline auch in gereiften THP1 Zellen induziert werden. [81]

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch Reifung von THP1 Zellen mit PMA zahlreiche weitere Faktoren und Proteine induziert werden, wie etwa Toll-like-Rezeptoren (TLR4 und TLR2). [132] Die morphologischen Veränderungen der Reifung von THP1 Zellen konnten in diesem Versuch lichtmikroskopisch beobachtet werden, da die Zellen als deutlichstes Zeichen der Reifung adhärent wurden. (Abb.5.2) Zur Feststellung einer optimalen Reifung der THP1 Zellen, hätten hier weitere Untersuchungen erfolgen können, wie etwa die Messung der Expression verschiedener Proteine, Zytokine oder Rezeptoren gereifter THP1 Zellen.

In dieser Arbeit konnten neben ungereiften THP1 Zellen als Monozytenmodell auch gereifte THP1-Zellen repräsentativ als Modell für die Reaktion von Makrophagen genutzt werden.

6.3 Expressionsverhalten und Mediatorfreisetzung von THP1 Zellen nach Exposition mit verschiedenen Granulom-assoziierten Stimuli

Zur Untersuchung des Expressions- und Stressverhaltens von Monozyten bzw. Makrophagen wurden gereifte und ungereifte THP1-Zellen mit verschiedenen Granulom-assoziierten Agenzien stimuliert. Bei diesen Agenzien handelt es sich um mögliche Induktoren von Zellstress, einer Inflammationsreaktion oder Granulombildung. Der Mehrzahl dieser Stimulanzen wird, wie bereits beschrieben, eine Rolle in der Ätiologie der Sarkoidose zugeschrieben.

6.3.1 Reaktion ungereifter THP1 Zellen auf verschiedene Stimuli

In diesem Abschnitt wurde das Expressions- und Stressverhalten ungereifter THP1 Zellen auf die Stimulanzen Tunicamycin, Lipopolysaccharid (LPS) und Lipoarabinomanan (LAM) untersucht. Es zeigt sich eine deutliche Hochregulierung der OS9 Expression durch das Nukleosid-Antibiotikum Tunicamycin. (Abb.5.3) Dies lässt sich im Rahmen der Auslösung einer UPR der Zellen gut erklären. [9] Wie bereits in mehreren Studien nachgewiesen, stört das Zellgift Tunicamycin die N-Glycosylierung verschiedener Proteine, wodurch es zu einer vermehrten Missfaltung von Proteinen kommt, welche letztendlich durch Auslösung einer ER-Stressantwort zu einer Hochregulation verschiedener Gene führt. [110, 148]

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dies auch für OS9 gilt. Zudem konnte beobachtet werden, dass diese Regulation unabhängig von der Konzentration an Tunicamycin geschieht. Auch durch eine Erhöhung der Tunicamycinkonzentration ist keine weitere Steigerung der OS9-Expression möglich. (Abb.5.6) Dies legt die Vermutung nahe, dass das Zellgift zwar einen enormen Stress in der Zelle verursacht, aber die unreife Zelle keine weiteren regulativen Maßnahmen einleiten kann, als die Auslösung der UPR.

Diese führt bereits bei niedriger Tunicamycinkonzentration zu einer maximal möglichen Erhöhung des OS9.

Wird die TNF- α -Produktion betrachtet, zeigt sich dagegen eine konzentrationsabhängige Steigerung. Während geringe Konzentrationen an Tunicamycin TNF- α hoch regulieren, wird durch hohe Tunicamycinkonzentrationen eine geringere TNF- α -Freisetzung beobachtet. (Abb.5.7) Studien zeigen, dass Tunicamycin-vermittelter ER-Stress eine erhöhte Anfälligkeit der THP1 Zellen für Apoptose mit sich bringt. [82] Hier kann ein Zelltod durch eine zu hohe Konzentration an Tunicamycin als Erklärung nicht ausgeschlossen werden. Eine Kontrolle der Zellzahl in Hinblick auf möglichen Zelltod der Zellen wäre hier sinnvoll gewesen, um eine Aussage bezüglich der Hemmung der OS9 Expression durch Tunicamycin machen zu können. Eventuell sind aber auch hier die Möglichkeiten der TNF- α -Freisetzung durch eine allgemeine Stressreaktion der noch unreifen Zelle begrenzt. Zudem löst Zellstress eine Vielzahl von Regulationsmechanismen aus, die möglicherweise eine TNF α Freisetzung vermindern bzw. inhibieren. Es wurde die Vermutung geäußert, dass der Transkriptionsfaktor XBP1 (Xbox binding protein) im Rahmen der UPR TNF- α unterdrücken kann. [156] So könnte erklärt werden, warum niedrige Tunicamycinkonzentrationen über geringen ER-Stress und ungenügende XBP1 Produktion vermehrt TNF- α freisetzen und hohe Tunicamycinkonzentrationen wiederum über großen ER-Stress und erhöhte XBP1 Produktion TNF- α inhibieren. Bei Erhöhung der Tunicamycinkonzentration lässt sich ein Anstieg der Interleukin-8-Produktion beobachten. (Abb.5.8)

Eine weitere Stimulation der ungereiften THP1 Zellen wurde mit dem Endotoxin LPS durchgeführt, welches zu einem starken Anstieg der OS9 Expression (Abb.5.6), sowie der Zytokinfreisetzung führt. (Abb.5.7,5.8) Die Ergebnisse stützen die in verschiedenen Studien gezeigte Wirkung des LPS auf Zellen über NF κ B vermehrt TNF- α freizusetzen. [119] Zudem wird durch Produktion an reaktiven Sauerstoffspezies enormer Zellstress ausgelöst, welcher wiederum die UPR hervorruft. [157] Auch hier kann also eine Erhöhung der OS9 Expression durch Auslösung einer ER-Stressantwort beobachtet werden.

Bei LAM (Lipoarabinomannan) handelt es sich um ein Glykolipid, welches Bestandteil in der äußeren Wandschicht von Mykobakterien ist und eine entscheidende Rolle in der Erkennung der Bakterien durch TLRs der Makrophagen spielt. [138]

In dieser Arbeit konnte ein Anstieg der Zytokine TNF- α und IL-8 gezeigt werden. (Abb.5.4,5.5) Dieser lässt annehmen, dass hier eine Aktivierung der Makrophagen stattfindet und eine vermehrte Zytokinfreisetzung verursacht. In vorherigen Studien konnte bisher gezeigt werden, dass LAM durch einen transmembranären Signalweg zu einer Aktivierung von Zellen führt. [129] Dies geschieht mit Hilfe von Toll-like-Rezeptoren, welche auch wie hier gezeigt, zu einer vermehrten Zytokinproduktion führen. [139]

Bei dieser ligandenvermittelten Aktivierung der Zelle scheint jedoch keine Einleitung des ERAD oder der UPR statt zu finden.

Des Weiteren besitzt LAM einen Mannosylrest, [59] welcher als Ligand für die MRH-Domäne des OS9 dienen kann und so direkt am ERAD beteiligt sein könnte. OS9 ist in der Lage im Rahmen der Qualitätskontrolle von Proteinen verschiedene N-Glykane, die terminal einen α -1,6-verknüpften Mannoserest besitzen, zu binden. [105] Im durchgeführten Experiment konnte jedoch kein Einfluss von LAM auf die OS9 Expression unreifer THP1 Zellen beobachtet werden. (Abb.5.3) Die Ergebnisse lassen annehmen, dass LAM trotz Mannosylrest nicht von OS9 gebunden werden kann. Möglicherweise kann OS9 LAM deshalb nicht binden, da es sich bei LAM um ein Lipid handelt und zudem nicht in das ER der Zelle gelangen könnte.

Auch eine Kombination von LAM mit Tunicamycin verändert die OS9 Expression im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Tunicamycin nicht. (Abb.5.3) Die verschiedenen Wege der Aktivierung der THP1 Zelle scheinen sich in Hinblick auf die OS9 Expression also nicht zu beeinflussen. Bei Betrachtung der Zytokinfreisetzung zeigt sich jedoch ein deutlicher verstärkender Effekt bezüglich der TNF- α -Freisetzung durch eine kombinierte Stimulation mit Tunicamycin und LAM. (Abb.5.4) Es wird also über verschiedene Mechanismen eine vermehrte TNF- α -Produktion veranlasst (UPR, NF κ B), die eine gegenseitige Beeinflussung vermuten lässt.

Die Ergebnisse der Versuchsreihe mit unreifen THP1 Zellen als Modell für Monozyten lassen den Folgeschluss zu, dass durch die Stimulation mit einigen Sarkoidose-assoziierten Stimulanzen eine Aktivierung der Zelle erfolgt. Im Rahmen dieser wird neben der Erhöhung der OS9 Expression durch Einleitung einer UPR auch eine Immunreaktion der Zelle hervorgerufen. Die Versuche zeigen eine vermehrte Freisetzung an Zytokinen, durch welche weitere Immunprozesse eingeleitet werden können. Diese Aktivierung und Mediatorfreisetzung der Zellen ist ein entscheidender Mechanismus in der Pathogenese der Sarkoidose. Es kommt zur Rekrutierung und Aktivierung von weiteren Immunzellen. [2] Diese Immunantwort verursacht eine Alveolitis, welche durch weitere Zytokine und regulatorische T-Zellen, sogenannte Tregs, entweder zu einer Spontanremission oder einer Progredienz der Erkrankung führt. In einigen Fällen zeigt sich zwar eine Steigerung der TNF- α Freisetzung bei niedriger OS9 Expression. Eine eindeutige Abhängigkeit der OS9 Expression zur Zytokinfreisetzung lässt sich jedoch für die unreifen THP1 Zellen nicht beobachten.

6.3.2 Selektion des optimalen Reifungs-/Stimulationsansatzes für THP1 Zellen

Um einen optimalen Ansatz zur Simulation der Reaktion von Makrophagen zu ermitteln, wurden vorab verschiedene Ansätze zur Reifung und Stimulation der THP1 Zellen durchgeführt. (Abb.5.9) Aufgrund der aufgeführten Ergebnisse der verschiedenen Ansätze erscheint die Reifung für 72 Stunden mit anschließender 72-stündiger Ruhephase (gereift-2), sowie eine simultane Reifung mit Stimulation die besten Ergebnisse zu liefern.

Es zeigt sich eine erhöhte basale OS9 Expression, welche sich durch verschiedene Stimuli beeinflussen lässt. Dabei zeigt sich das Verhalten stark variant, was sich an den Standardabweichungen bemerkbar macht (Abb.5.10, 5.11) Die Zytokinproduktion zeigt sich im unstimulierten Zustand im Vergleich zu ungereiften THP1 Zellen leicht erhöht. (Abb.5.12-5.15)

Die Annahme, dass Tunicamycin-induzierter ER-Stress die Differenzierung der THP1 Zellen in Makrophagen durch PMA gestört wird [82], konnte hier nicht bestätigt werden. Eine Störung der Reifung durch simultane Stimulierung mit Tunicamycin ließ sich nicht beobachten. Durch simultane Reifung mittels PMA und Stimulation mit Tunicamycin zeigten sich jedoch stark gestresste Zellen. Es fand eine starke Erhöhung der OS9 Expression und enorme Erhöhung der IL-8 Zytokinfreisetzung statt. (Abb.5.11/5.15, simultan)

Aufgrund der Ergebnisse und im Hinblick auf eine geplante Transfektion der gereiften THP1 Zellen mit OS9 siRNA, wurde Ansatz „gereift-2“ für die weiteren Versuche gewählt. Dieser Ansatz bietet zudem im Gegensatz zum simultanen Ansatz die Möglichkeit, die Zellen vor der Stimulation zu transfizieren.

6.3.3 Reaktion gereifter THP1 Zellen auf verschiedene Stimuli

Als makrophagenähnliche Zellen wurden gereifte THP1 Zellen in Hinblick auf die Expression von OS9 und ihre Zytokinproduktion mit zahlreichen Stimulanzien stimuliert. Zu diesen zählen Tunicamycin, Lipopolysaccharid (LPS), Lipoarabinomanan (LAM), Mycobacterium tuberculosis (M.tb.), P.acnes und der Cord-Faktor (TDM).

Durch Inkubation gereifter THP1 Zellen mit Tunicamycin wurde eine erhöhte OS9-Expression hervorgerufen. Dies kann durch den bereits beschriebenen Mechanismus im Rahmen der „unfolded protein reaction“ der Zelle erklärt werden. Hier schaffen es die Zellen jedoch die OS9-Expression bei erhöhter Tunicamycinkonzentration weiter zu steigern. (Abb.5.16)

Die OS9-Expression lässt sich also bei den gereiften THP1 Zellen im Gegensatz zur Expression bei ungereiften THP1 Zellen konzentrationsabhängig erhöhen. Ursächlich hierfür könnte der Grad der Entwicklung der gereiften THP1 Zellen sein und die damit verbundenen besseren Regulationsmechanismen der Zelle im Umgang mit Stress. Durch die Stimulation der Zelle wurde zudem vermehrt TNF- α und Interleukin 8 freigesetzt. (Abb.5.18/5.20) Es kommt zu einem leichten Anstieg, der jedoch nur bei Interleukin 8 durch höhere Tunicamycinkonzentrationen weiter steigt. (Abb.5.20)

Diese dosisabhängige Induktion des IL-8 zeigt sich im Versuch signifikant. Als mögliche Erklärung hierfür dienen die im Rahmen des ERAD bzw. des UPR induzierten Abwehrmechanismen, in deren Verlauf vermehrt OS9 exprimiert wird. Diese vermindern den durch Tunicamycin verursachten Zellstress und unterbinden so eine erhöhte Freisetzung an TNF- α . Das Niveau der Zytokinfreisetzung bleibt hier trotz höherer Tunicamycinkonzentration gleich. Es lässt spekulieren, dass es sich bei OS9 um einen protektiven Faktor gegen Zellstress handelt.

Diese Ergebnisse liefern erste Hinweise auf den Einfluss der OS9 Expression auf den Umgang der Zelle mit Stress. Hier zeigt sich durch Erhöhung der OS9 Expression eine verminderte bzw. stabile Mediatorfreisetzung, welche wiederum für eine nachfolgende Immunreaktion der Zelle verantwortlich wäre.

Der bakterielle Zellwandbestandteil LPS, sowie Tunicamycin haben einen leichten Einfluss auf die Expression des OS9 der gereiften THP1. (Abb.5.17) Zudem zeigt sich dabei ein Anstieg der TNF- α und Interleukin-8 Produktion. (Abb.5.19/5.21) Dieser wird durch Auslösung einer Signaltransduktionskette vermittelt. LPS veranlasst über CD14/TLR4 die Bildung verschiedener Zytokine wie TNF- α , Interleukin-1 und Interleukin-6. [85] Der Stress der Zelle ist hier also immens.

Auch bei gereiften THP1 Zellen zeigt LAM keinen nennenswerten Einfluss auf die Expression des OS9. (Abb.5.23) Zusätzlich bleibt hier auch die Produktion der Zytokine nahezu gleich. (Abb.5.24/5.25) Diese eingeschränkte Reaktion der gereiften THP1 Zellen auf LAM kann eventuell auf Grundlage einer Studie erklärt werden. In dieser konnte ein zellulärer Mechanismus identifiziert werden, in der die Fähigkeit des M.tb. Zellwandbestandteils LAM untersucht wurde, die Biosynthese von TNF- α in humanen Makrophagen zu blockieren. [107] Durch diese Blockade wird dem Bakterium eine Immunität vermittelt und seine Virulenz so erhöht. [107]

Diese Ergebnisse widersprechen jedoch anderen Studien, in welchen sowohl LAM als auch M.tb. als Induktoren für die Freisetzung an Zytokinen identifiziert wurden. [129, 139] Dies konnte auch in dieser Arbeit im Rahmen der Stimulation ungereifter THP1 Zellen gezeigt werden.

In zahlreichen Studien wurden Mykobakterien als mögliche infektiöse Antigene für Sarkoidose gehandelt. [23, 27] Auch hier nutzen die Bakterien einen Signalweg über Toll-like-Rezeptoren [41] In unserem Versuch zeigte sich jedoch keine Beeinflussung der OS9 Expression. (Abb.5.23) Auch die Zytokinfreisetzung blieb durch die Mykobakterien annähernd unbeeinflusst. (Abb.5.24/25) Ein weiterer Bestandteil der mykobakteriellen Zellwand, der sogenannte Cord Faktor (Trehalose-di-mycolat: TDM) wurde zur Stimulation der gereiften THP1 Zellen verwendet. Bisher wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass TDM neben der Beeinflussung der Infektion und Immunantwort betroffener Zellen auch an der pulmonalen Granulombildung beteiligt ist. [38, 65, 113] In dieser Arbeit konnte eine leichte Erhöhung der OS9 Expression beobachtet werden (Abb.5.27), sowie ein leichter Anstieg der IL-8 Produktion durch gereifte THP1 Zellen. (Abb.5.30) Es zeigte sich jedoch keine Beeinflussung der TNF- α -Werte.

Das Propionibacterium acnes steht im Verdacht an der Immunpathogenese der Sarkoidose im Rahmen der pulmonalen Granulombildung beteiligt zu sein. [29, 73, 96] Es könnte zudem an der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-8 beteiligt sein. [75]

Die Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit lassen erkennen, dass die Stimulation mit P.acnes zwar keinerlei Auswirkungen auf TNF- α hat, dafür wird aber die IL-8 Produktion deutlich gesteigert. (Abb.5.28/29) Warum TNF- α hier keine Reaktion aufweist, kann nur unzureichend erklärt werden. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass P.acnes die IL-8-Produktion in THP1-Zellen induzieren kann. [16] Die Expression in humanen monozytären Zellen konnte direkt und über mRNA Expression induziert werden – und zwar über einen Mechanismus mit Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. [16] Über Hemmung dieses Faktors, etwa durch ein Makrolid, konnte die Freisetzung des IL8 demnach wieder reduziert werden. [76] Im Rahmen der Untersuchung der inflammatorischen Akne konnte gezeigt werden, dass P.acnes eine massive neutrophile Infiltration verursacht. Dabei scheint IL-8, ein neutrophiles Chemokin, eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie zu spielen. In dieser Arbeit konnte ein Einfluss von P.acnes auf die IL-8 Produktion von THP1 Zellen nachgewiesen werden. (Abb.5.29)

Auch in der Immunpathogenese der Sarkoidose spielt eine neutrophile Alveolitis eine Rolle. IL-8 steigt auch hier bei Fortschreiten der Erkrankung stark an. [165] Die Exposition mit Propionibacterium acnes, einem Bakterium der natürlichen Hautflora, löst demnach eine Immunantwort aus, die die Manifestation der Sarkoidose fördern könnte. Demnach kann angenommen werden, dass Patienten, die P.acnes nicht in ausreichendem Maße abwehren können, ein erhöhtes Risiko für eine latente systemische Infektion haben. In vorangegangenen Studien wurde die Vermutung geäußert, dass eine solche latente Infektion durch weitere Trigger zu einer systemischen Sarkoidose führen kann. [31]

6.3.4 Unterschiede der Reaktionen durch gereifte und ungereifte THP1 Zellen

Aktivierete Monozyten und Makrophagen werden zu den sekretorisch sehr aktiven Zellen gezählt. Als Teil des angeborenen Immunsystems wehren sie mit Hilfe von Zytokinen eingedrungene Mikroorganismen ab. Werden gereifte und ungereifte THP1 Zellen im Vergleich betrachtet, lassen sich Unterschiede in der basalen OS9 Expression, sowie in der Zytokinproduktion feststellen. Zudem zeigen sich einige Unterschiede im Stress- und Expressionsverhalten dieser Modellzellen für Monozyten bzw. Makrophagen auf verschiedene Stimuli.

So weisen gereifte THP1 Zellen eine höhere OS9 Expression als ungereifte THP1-Zellen auf. (Abb.5.10) Ferner besitzen diese eine höhere basale TNF- α -Produktion und Interleukin-8-Produktion als ungereifte THP1 Zellen im unstimulierten Zustand. (Abb.5.12/14) Die niedrige basale Expression an OS9, aber auch die geringere Produktion des TNF- α und IL-8 von ungereiften THP1 Zellen lässt verschiedene Erklärungen zu. Zum einen könnte diese durch eine erhöhte Anfälligkeit der unreifen Zellen für Apoptose und damit einer Reduktion der Zellzahl nach Stimulation erklärt werden. Zum anderen etwa dadurch, dass diese als Modell für Monozyten einen geringen Differenzierungsgrad aufweisen. Monozyten entwickeln sich durch weitere Reifung gewebeabhängig in reife Makrophagen.

Dieser Vorgang ist mit markanten morphologischen und biochemischen Veränderungen verbunden. So ändert sich etwa die Art der Zytokinproduktion – auch in Abhängigkeit des Gewebetyps. Die wesentlichen Zytokine der Makrophagen sind IL-1, TNF- α , IL-6, IL-12 und IL-8. Die Alveolarmakrophagen zählen zum mononukleärem Phagozytensystem (MPS) und sezernieren in der Lunge vermehrt das Zytokin TNF- α . In vitro wurde dieser Reifungsprozess an den THP1 Zellen durch Zusatz des PMA simuliert. Diese gereiften THP1 Zellen sind also weiter differenziert und so besser in der Lage, vermehrt Zytokine zu produzieren. [152] Es lassen sich zudem Unterschiede im Expressions- und Stressverhalten der THP1 Zellen finden.

Diese Arbeit zeigt, dass sich die Expression an OS9 bei ungereiften THP1 Zellen im Gegensatz zu gereiften THP1 Zellen durch Stimulation mit LPS steigern lässt. Neben zahlreichen Veränderungen, die mit einer THP1 Reifung einhergehen und so das Expressions- und Stressverhalten der Zellen beeinflussen können, kann dem Oberflächenprotein Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) eine mögliche Beteiligung an diesem veränderten Verhalten zugeschrieben werden.

Dieser stellt einen zentralen Bestandteil des LPS-Rezeptors dar und kommt somit eine bedeutende Rolle bei der Erkennung von Krankheitserregern durch das angeborene Immunsystem zu.

Er ist für die Aktivierung von Zellen durch LPS unentbehrlich und löst biochemische Signaltransduktionsketten aus, die der Abwehr von Krankheitserregern mittels der „angeborenen Immunität“ dient. Die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber LPS ist dabei von der Anzahl der TLR4-Moleküle auf der Zelloberfläche abhängig. [104]

Eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Verhalten der gereiften gegenüber den ungereiften THP1 Zellen im Hinblick auf die OS9 Expression kann demnach eine unterschiedliche Anzahl dieser Rezeptoren auf der Zelloberfläche sein, welche sich durch einen unterschiedlichen Reifegrad erklärt. Diese Induktion der TLR4 Rezeptoren durch Reifung von THP1 Zellen mit PMA konnte in einer Studie von Tiwari et al gezeigt werden. [132] Jedoch finden sich auch Studien, die keinen Unterschied der TLR4 Expression bei Monozyten und Makrophagen feststellen können. [72]

Toll-like-Rezeptoren wurden in Hinblick auf die Pathogenese und die Verlaufsform der Sarkoidose untersucht.

So konnte eine höhere Prävalenz der funktionellen Mutationen Asp299Gly und Thr399Ile des TLR4 Gens bei Sarkoidosepatienten nachgewiesen werden als in gesunden Kontrollgruppen. Eine signifikante Assoziation der Mutation konnte für die chronische Verlaufsform der Sarkoidose festgestellt werden. [101] Dies lässt annehmen, dass es sich bei TLRs um Faktoren handelt, die den Verlauf der Erkrankung beeinflussen können. Zudem wurde eine abnorme Antwort der Rezeptoren auf bakterielle Bestandteile im Rahmen der Erkrankung untersucht. [41, 108, 143]

Gereifte und ungereifte THP1 Zellen setzen durch LPS vermehrt Zytokine frei. Dabei steigern gereifte THP1 Zellen die Zytokinfreisetzung deutlich stärker als ungereifte THP1 Zellen. (Abb.5.7/5.8, Abb.5.19-5.21) Der Mechanismus über NFκB und CD14, der zur vermehrten Zytokinproduktion führt, wurde bereits beschrieben. Die gereiften THP1 Zellen können hierbei eine noch stärkere Induktion bewirken.

Ein weiterer Unterschied zeigt sich im Expressionsverhalten der Zellen auf die Stimulation mit Tunicamycin. Während ungereifte THP1 Zellen OS9 konzentrationsunabhängig auf ein niedriges Niveau anheben, kommt es bei gereiften Zellen zu einem dosisabhängigen Anstieg der OS9 Expression durch Steigerung der Tunicamycinkonzentrationen. (Abb.5.16) Die gereiften Zellen scheinen hier durch den Grad der Entwicklung bessere Regulationsmechanismen zu besitzen, während ungereifte Zellen bereits bei niedriger Tunicamycinkonzentration eine maximal mögliche Erhöhung des OS9 veranlassen.

Ungereifte THP1 Zellen besitzen zudem nur begrenzte Möglichkeiten TNF- α zu steigern. Bei geringen Tunicamycinkonzentrationen kommt es zu einer Hochregulation, während hohe Konzentrationen zu einer geringeren TNF- α Freisetzung führen. (Abb. 5.7) Dabei kann ein Zelltod als Erklärung der verminderten TNF- α Freisetzung nicht ausgeschlossen werden. Wird die Freisetzung des IL8 betrachtet, zeigt sich eine gleich bleibende, zum Teil auch ansteigende Produktion. Gereifte THP1 Zellen sind dagegen in der Lage die Freisetzung von TNF- α bei unterschiedlichen Konzentrationen konstant zu halten. (Abb.5.21) Sie scheinen dem Zellstress durch Erhöhung der OS9 Expression entgegengewirkt zu haben. (Abb.5.19) Der Einfluss dieser Erhöhung zeigt sich bei den gereiften THP1 Zellen auch in der Zytokinfreisetzung. (Abb. 5.21/23)

Insgesamt betrachtet, zeigen ungereifte THP1 Zellen durch verschiedene Stimulanzen eine stärkere Stressreaktion. Sie steigern ihre Zytokinfreisetzung bei fast allen Stimulanzen, ob einzeln oder in Kombinationen. Es scheint, als ob sie den Stimuli nur wenig entgegensetzen können. Dagegen bleibt die TNF- α - und IL-8-Freisetzung durch gereifte THP1 Zellen nach Zugabe beinahe aller Stimulanzen annähernd konstant. Ihr fortgeschrittener Reifungszustand scheint den Zellen zu helfen, den Stimulus-assoziierten Stress über Abwehrmechanismen kontrollieren zu können.

Dabei kann die Expression an OS9 als möglicher Teil dieser Abwehrmechanismen diskutiert werden. Diese Versuche liefern somit Hinweise zur Funktion des OS9 im Rahmen der Immunreaktion der THP1 Zellen, insbesondere der als Makrophagenmodell verwendeten gereiften THP1 Zellen.

6.4 Auswirkungen der OS9 siRNA auf die Mediatorfreisetzung von THP1 Zellen

Zur Untersuchung des Einflusses von OS9 auf die Mediatorfreisetzung der gereiften THP1 Zellen wurde eine Transfektion mit OS9-siRNA durchgeführt. Nach Optimierung der Transfektionsbedingungen konnte eine erfolgreiche Senkung der OS9 Expression auf 25% des Ausgangswerts erreicht werden.

Im anschließenden Transfektionsversuch wurden die THP1 Zellen mit verschiedenen Stimulanzen versetzt. Wie in vorangegangenen Versuchen bereits gezeigt, wurde hierdurch eine leichte Erhöhung der OS9 Expression erreicht. Es konnte jedoch bei allen Ansätzen eine Senkung der Expression durch siRNA um etwa die Hälfte ihrer Expression im nicht transfizierten Zustand gezeigt werden. Zur Kontrolle wurde eine Kontroll-RNA, die sogenannte scramble, getestet. Über die Gründe, warum die Transfektion mit „scramble“ RNA eine Steigerung der OS9 Expression hervorruft, lässt sich derzeit nur spekulieren. Eventuell kommt es durch die eingeführte „scramble“ RNA als Fremd-RNA zur Simulation einer Virus-RNA, auf die die Zelle mit Abwehrmaßnahmen reagiert.

In den durchgeführten ELISA sollte nun getestet werden, in wieweit die Senkung der OS9 Expression eine veränderte Mediatorfreisetzung bedingt. Dafür wurden die TNF- α - und IL-8-Werte der transfizierten Zellen mit denen der nicht transfizierten Zellen verglichen.

Die TNF- α -Produktion stieg nach Transfektion mit OS9 siRNA im unstimulierten Zustand an. Eine mögliche Erklärung könnte die Annahme sein, dass eine verminderte OS9 Expression die Zelle daran hindert, im Rahmen des ERAD falsch gefaltete Proteine oder andere spontan anfallende Stressoren abzubauen. Eine Anreicherung etwa falsch gefalteter Proteine kann somit Zellstress verursachen, der sich durch eine vermehrte TNF- α -Freisetzung bemerkbar macht. Werden die Zellen aber stimuliert, zeigt sich kein nachweisbarer Einfluss der verminderten OS9 Expression auf die TNF- α -Freisetzung. Die TNF- α -Freisetzung bleibt unabhängig von Stimulus, scramble oder siRNA annähernd gleich auf dem Niveau der unstimulierten Kontrolle. Zwar lässt sich durch LPS die TNF- α -Freisetzung wie gewohnt steigern, allerdings lässt sich kein Einfluss der siRNA erkennen.

Dahingegen zeigt die Transfektion der Zellen mit OS9-siRNA Auswirkungen auf die Produktion von Interleukin-8. Hier zeigt sich nach Transfektion mit OS9-siRNA eine Steigerung der IL-8-Freisetzung durch THP1 Zellen. Diese Steigerung kann ähnlich dem beschriebenen Mechanismus für TNF- α erklärt werden. Auch die Interleukin 8-Freisetzung lässt sich durch zelluläre Stressfaktoren erhöhen, welche möglicherweise durch eine verminderte OS9 Expression verstärkt wird.

Die Proteinbiosynthese von Interleukin 8 kann grundsätzlich durch mehrere Faktoren induziert werden. So etwa durch andere Interleukine oder wie hier auch durch TNF- α und andere zelluläre Stressoren. [4] Ein ähnlicher Effekt zeigt sich durch Stimulation mit Tunicamycin. Hier kommt es durch Transfektion der Zellen zu einem Anstieg des IL-8. Es kann vermutet werden, dass eine verminderte OS9 Expression hier eine verstärkte stressbedingte Zytokinfreisetzung der Zelle bewirkt.

Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass es durch Fehlen des OS9, zu einer vermehrten Stressreaktion der Zellen kommt. Durch die verminderte Expression des OS9 kann dieses seiner Funktion im Rahmen der „unfolded protein reaction“ nicht mehr nachkommen. OS9 ist notwendig, um missgefaltete Proteine zu erkennen, bei der Ubiquitinierung zu assistieren und Proteasombestandteile zu transportieren. [60, 86, 115] Bleibt dieser Mechanismus aus, kommt es zur Akkumulation von falsch gefalteten Proteinen, was zu Zellschäden und Immunreaktionen führen kann. Wie in diesem Versuch gezeigt, kommt es hier zu einer vermehrten Interleukin 8 Freisetzung. Diese fördert wiederum die Entstehung einer neutrophilen Alveolitis im Rahmen der Sarkoidose. Zudem hat eine vermehrte IL-8 Freisetzung Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung. [165]

Im Unterschied zur Reaktion auf die Stimulation mit Tunicamycin, zeigen sich durch Stimulationen mit LPS und LAM gegenläufige Reaktionen nach der Transfektion. Während die Stimulation mit P.acnes alleine die IL-8 Freisetzung kaum beeinflusst, führt eine Kombination von P.acnes mit Tunicamycin zu einer enormen Potenzierung. P.acnes scheint hier auf die bereits durch Tunicamycin gestressten Zellen stärkeren Einfluss nehmen zu können.

Wird der Effekt von P.acnes auf die IL-8 Freisetzung vor und nach Transfektion verglichen, zeigen sich zudem deutliche Unterschiede. (Abb.5.38) Während eine Stimulation mit P.acnes bei nicht transfizierten und scramble behandelten Zellen eine deutliche Steigerung der IL-8 Freisetzung bewirken, zeigt sich nach Transfektion der Zellen mit deutlicher Reduktion der OS9 Expression ein deutlich geringerer Effekt auf die IL-8 Freisetzung. Es scheint, dass eine hohe Expression an OS9 hier keine protektive Funktion übernimmt, sondern stattdessen einen enormen Stress der Zelle anzeigt und die gesteigerte Freisetzung an IL-8 durch Stimulation mit P.acnes zulässt. Dies widerspricht den bereits beschriebenen Erklärungsmodellen vorangehender Ergebnisse.

Der Einfluss der OS9 Expression auf das Stressverhalten bzw. die Zytokinproduktion zeigt sich im Hinblick auf TNF- α lediglich in der basalen Produktion. Hier kann durch eine verminderte OS9 Expression ein Anstieg des Zytokins beobachtet werden. Der Effekt kann jedoch nach Zugabe verschiedener Stimulanzen wie LPS nicht mehr gezeigt werden.

OS9 scheint eine Rolle in der Regulation der TNF- α Produktion zu spielen, jedoch ist dieser gering oder kann durch die hier erreichte Reduktion der OS9 Expression um 50% nicht gezeigt werden. Bei Beobachtung der Interleukin-8 Freisetzung zeigt sich auch hier eine erhöhte basale Produktion nach Transfektion. Im Gegensatz zur Reaktion des TNF- α , weist IL-8 durch verschiedene Stimulanzen unterschiedliche Reaktionen nach Transfektion auf. Diese zeigen sich gegenläufig. Auch hier kann kein richtungsweisendes Erklärungsmodell angewandt werden.

6.5 Verhalten von Monozyten im Vergleich

Werden Monozyten und BAL-Zellen von Sarkoidosepatienten und THP1-Zellen (ungereifte und gereifte) verglichen, lassen sich Monozyten und BAL-Zellen im Hinblick auf die basale OS9 Expression und ihre Zytokinfreisetzung am ehesten mit gereiften THP1 Zellen vergleichen. Sie zeigen ähnlich hohe basale OS9 Expressionen und weisen eine fast identische Mediatorfreisetzung auf. (Abb.5.31-5.33) Dagegen zeigen ungereifte THP1 Zellen eine sehr geringe OS9 Expression und steigern diese konzentrationsunabhängig durch beinahe alle Stimulanzen, wie bereits in vorangegangenen Versuchen ausführlich beschrieben. Auch die basale Zytokinfreisetzung der ungereiften THP1 Zellen ist hier um ein Vielfaches geringer als etwa bei BAL-Zellen.

Die Unterschiede der basalen OS9 Expression und Zytokinfreisetzung lässt sich höchstwahrscheinlich dadurch erklären, dass ungereifte THP1 Zellen einen geringeren Differenzierungsgrad aufweisen. Durch die fehlende Reifung ist die basale Expressions- und Produktionsleistung geringer als etwa bei BAL-Zellen. Diese Ergebnisse bekräftigen erneut den Vorteil der Verwendung der gereiften gegenüber den nicht gereiften THP1 Zellen als in vitro Modell für Makrophagen.

Grundsätzlich induziert LPS zahlreiche Genexpressionen in Alveolarmakrophagen – dabei können diese hoch oder runter reguliert werden. [108] LPS stimuliert mit Hilfe des LPS-bindenden Proteins (LBP) und CD14 den Toll-like-Rezeptor-4 [116] und kann so verschiedene Signalwege aktivieren. Einen Einfluss auf die OS9 Expression scheint jedoch vor allem bei ungereiften THP1 Zellen vorzuliegen, welche ihre basale Expression durch Stimulation mit LPS steigert.

Diese Steigerung kann bei Monozyten, BAL-Zellen und gereiften THP1 Zellen nicht beobachtet werden. Diese haben bereits im unstimulierten Zustand eine höhere OS9 Expression, eventuell liegt hierin auch die Erklärung für den fehlenden Anstieg.

Monozyten zeigen auch in der Zytokinfreisetzung eine ähnliche Reaktion auf verschiedene Stimuli wie gereifte THP1 Zellen und BAL-Zellen. LPS führt nach oben beschriebenen Mechanismus zu einer starken Erhöhung der IL-8- und TNF- α -Produktion. (Abb.5.33/34)

Bei Betrachtung der Zytokinproduktion weisen die BAL-Zellen von Sarkoidosepatienten jedoch eine höhere basale TNF- α -Produktion und eine basale Interleukin-8-Produktion auf als etwa ungeriffte THP1-Zellen. Diese Ergebnisse lassen sich zum einen durch die Tatsache erklären, dass es sich um Makrophagen im Vergleich zu weniger differenzierten Monozyten oder monozytären Zellreihen handelt. Des Weiteren konnte bisher beobachtet werden, dass Alveolarmakrophagen von Sarkoidosepatienten eine erhöhte Transkription an TNF- α aufweisen. [164]

In dieser Versuchsreihe zeigt sich eine enorme Zytokinfreisetzung. Durch Freisetzung zahlreicher Mediatoren sind Alveolarmakrophagen entscheidend an der Inflammationsreaktion und somit an der Immunpathogenese der Sarkoidose beteiligt. Die Ergebnisse zeigen, dass eine erhöhte Zytokinfreisetzung im Rahmen der Inflammationsreaktion der Zellen vorliegt. Diese ist charakteristisch für die inflammatorische Antwort der Sarkoidose. [2] Auch für den Verlauf der Erkrankung spielt die Höhe der Zytokinproduktion eine wichtige Rolle. Ziegenhagen et al. konnten zeigen, dass TNF- α und Interleukin 8 bei Patienten mit progressivem Krankheitsverlauf signifikant mehr freigesetzt wurden als bei Patienten mit stabilem Krankheitsbild. [165] Es kann die Vermutung gemacht werden, dass auch hier eine genetische Prädisposition entscheidet, inwieweit die Zelle Stress abwehren kann und in welchem unterschiedlichen Maße Zytokine produziert werden.

Zudem wurde beobachtet, dass Patienten mit höheren TNF- α Werten ein signifikant höheres Risiko einer Krankheitsprogredienz besitzen als Patienten mit niedrigeren Werten. [165] So kann TNF- α als prognostischer Parameter für den weiteren Krankheitsverlauf genutzt werden. [163] Ob sich eine akute oder eine chronische Verlaufsform zeigt, hängt aufgrund der vorliegenden Ergebnisse, vermutlich von der Art und Ausprägung der Inflammationsreaktion und Abwehr der Zellen ab. Diese wiederum unterscheidet sich zwischen den Patientengruppen, welche wahrscheinlich durch genetische Prädisposition beeinflusst wird. Demnach ist eine genetische Untersuchung für das Verständnis der Entstehung und den Verlauf der Sarkoidose entscheidend. Auch in den Therapieoptionen der Sarkoidose wurde TNF- α als Angriffspunkt verwendet. So wurde etwa Infliximab, ein Antikörper gegen TNF- α , eingesetzt. Die Erfolgsergebnisse variieren jedoch sehr. [19]

Auch hier erscheint eine genetische Untersuchung der Patienten sinnvoll, um ein Ansprechen auf eine Therapie mit TNF- α -Blockern abschätzen zu können und so Einfluss auf die Therapiewahl nehmen zu können.

6.6 Unterschiede zwischen Sarkoidose- und Kontrollpatienten im Hinblick auf OS9

Hoffmann et al. konnten in einer Studie einen neuen Prädispositionsloкус für Sarkoidose auf Chromosom 12q13.3-q14.1 identifizieren. Dabei scheint OS9 der wahrscheinlichste Kandidat für eine grundlegende Prädisposition zu sein. OS9 ist an der Unfolded protein reaction durch Erkennung missgefalteter Proteine und dem ER-assoziierten Proteinabbau beteiligt. Durch Stressoren, wie Hypoxie, Zigarettenrauch, Umweltfaktoren oder auch Infektionen kommt es zu einer erhöhten Rate an falsch gefalteten Proteinen, welche dem Signalweg des ERAD zugeführt werden [8, 144]

Aufgrund der bisher beschriebenen Funktionen des OS9, wird die Vermutung geäußert, dass es durch Fehlfunktion des OS9 zur Akkumulation von Proteinen und damit zur Zellschädigung kommt. In dieser Studie wurde zudem beschrieben, dass bei Sarkoidosepatienten im Vergleich zu Kontrollpersonen eine erhöhte OS9 Expression vorliegt. Dies konnte insbesondere bei Patienten mit der akuten Verlaufsform der Sarkoidose festgestellt werden. [56] In der hier vorgelegten Arbeit konnte eine höhere basale OS9-Expression bei Sarkoidosepatienten als bei gesunden Patienten gezeigt werden. (Abb.5.39) Jedoch zeigen sich deutliche Unterschiede innerhalb der Gruppen. Dieses Ergebnis unterstützt das bereits beobachtete OS9 Expressionsverhalten der Sarkoidosepatienten in der vorangegangenen Studie. [56] Dagegen erscheint die chronische und weniger aktive Verlaufsform der Sarkoidose nach Hofmann et al mit einem Mangel an OS9 assoziiert zu sein. Bei homozygoten Trägern des Risikoallels rs1050045 zeigte sich eine signifikante Reduktion der OS9 Expression. [56]

In dieser Versuchsreihe scheinen verschiedene Stimulanzen die Expression von OS9 bei BAL-Zellen von Patienten mit Sarkoidose zu reduzieren. Bei der Gruppe der Sarkoidosen und der Kontrollen kommt es zu einem Anstieg der TNF- α Freisetzung durch verschiedene Stimulanzen. Die Interleukin-8 Produktion lässt sich bei Sarkoidosepatienten nur durch einen Teil der Stimulanzen anheben. Dieses Verhalten lässt sich nur unzureichend erklären. Die Ergebnisse lassen am ehesten vermuten, dass ein Teil der Zellen durch die Stimuli zugrunde ging. Dies würde neben dem Absinken der OS9 Expression, auch den geringen Zytokinanstieg der Sarkoidosen erklären. Kontrollen zeigen dagegen eine höhere OS9 Expression, was auf eine Stress-induzierte UPR hinweist. Dieser wird in Form der Zytokinsteigerung deutlich.

Bei Betrachtung der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass alle Sarkoidosepatienten, unabhängig des Genotyps für OS9 und der Verlaufsform, eingeschlossen wurden. Da nach bisheriger Studienlage davon ausgegangen werden kann, dass diese Untergruppen verschieden reagieren, sind die Ergebnisse hier nicht eindeutig zu verwerthen. Dies erklärt zudem die hohen Standardabweichungen der Ergebnisse. Zur genaueren Untersuchung sollten weitere Versuche mit höherer Personenzahl erfolgen, die eine Bildung von Subgruppen in Abhängigkeit des Genotyps und Phänotyps erlaubt.

6.7 Korrelation zwischen Genotyp der Sarkoidosepatienten und OS9 Expression, sowie Zytokinfreisetzung

Bei der Untersuchung der BAL-Zellen von Sarkoidosen in Abhängigkeit vom Genotyp zeigte der SNP rs 1050045 eine signifikante negative Korrelation von Expression der OS9 mRNA mit dem Genotyp CC. Patienten mit Genotyp CC sind homozygote Träger des Risiko-Allels rs 1050045. Daneben existieren noch die Genotypen TT und TC.

In einer Studie von Hofmann et al konnte eine Allel-spezifische Expression an OS9 gezeigt werden. In einer subphenotyp-spezifischen Analyse konnte zudem eine stärkere Assoziation dieses SNP mit der akuten Form der Sarkoidose als mit anderen Krankheitsverläufen festgestellt werden. [56] Das mutmaßliche Risikogen des OS9 spielt eine wichtige Rolle in der ERAD von un- oder missgefalteten Proteinen. [60, 86, 115]

In den durchgeführten Versuchen konnte beobachtet werden, dass Patienten mit Genotyp CC im Mittel die geringste basale Expression an OS9 zeigen, während Patienten mit Genotyp TT die höchste Expression vorweisen. (Abb.5.46) Dabei zeigt sich jedoch eine deutliche Varianz innerhalb der Subgruppen. Verfolgt man diesen Ansatz weiter, zeigen Patienten mit homozygoten Risikogenotyp CC also eine negative Korrelation zur OS9 Expression. In dieser Arbeit konnte des Weiteren gezeigt werden, dass Patienten mit Genotyp CC die höhere basale TNF- α Produktion aufweisen. Patienten mit Genotyp TT dagegen die geringste. (Abb.5.47) Hierdurch würde sich eine umgekehrte Korrelation der TNF- α Produktion zur OS9 Expression ergeben. Patienten mit der geringsten basalen OS9 Expression, produzieren am stärksten das Zytokin TNF- α . Doch auch hier zeigt sich eine Varianz der Produktion an TNF. Lässt man die Annahme der umgekehrten Korrelation der Zytokinproduktion zur OS9 Expression zu, scheint die geringe OS9 Expression der homozygoten Risikogenotypen CC für eine verminderte Abwehr der Zelle verantwortlich zu sein. Es kommt zu vermehrte Akkumulation falsch gefalteter Proteine, Zellschädigung und Immunreaktion der Zelle, die hier durch vermehrte Produktion des TNF- α deutlich wird.

Sarkoidosepatienten mit einer höheren Freisetzung an TNF- α haben jedoch ein signifikant höheres Risiko des Fortschreitens der Erkrankung als Patienten mit normaler TNF α -Produktion. Dies ist der Grund, warum TNF- α als prädiktiver Parameter für die Krankheitsprogression verwendet wird. [163] Im Folgeschluss kann spekuliert werden, dass Patienten mit Genotyp CC und damit Träger zweier Risikoallele des OS9 Gens, ein höheres Risiko für eine höhere Krankheitsaktivität und schnellere Progression der Erkrankung aufweisen. Im Vergleich sind Patienten mit Genotyp TT mit einer höheren OS9 Expression assoziiert.

Es kann vermutet werden, dass diese Patienten bessere Möglichkeiten haben Sarkoidose-assoziierte Stimulanzen über ERAD abzuwehren. Bei Patienten mit aktiver Sarkoidose kommt es zudem häufiger zu einer Spontanremission. Es kann spekuliert werden, ob die Immunreaktion der Zelle über OS9 via ERAD und eventuell noch weitere unbekannte Mechanismen in der Lage ist, nicht nur den Stress besser zu bewältigen, sondern sogar zu beseitigen. Aufgrund der hohen Standardabweichungen, lässt sich hier jedoch keine eindeutige Aussage treffen. Hierfür sind größere Kohorten und Subgruppen notwendig.

In weiteren Versuchen dieser Arbeit konnte die Reaktion der Zellen auf LPS beobachtet werden. Hierbei lässt sich bei allen Genotypen die Produktion an TNF- α mit LPS-Stimulation steigern. (Abb.5.48) Jedoch weisen Patienten mit Genotyp CC eine höhere Steigerung der Zytokinproduktion auf als Patienten mit Genotyp TT und Genotyp TC.

Dies lässt vermuten, dass die Zellen auf Stressstimuli empfindlicher reagieren und dem Stress durch geringere Expression an OS9 weniger entgegenwirken können. Das Ausmaß des Zellstress wird auch hier durch die Zytokinfreisetzung deutlich. Patienten mit einer höheren Expression an OS9 bzw. anderem Genotyp scheinen den Zellstress besser bewältigen zu können. Patienten mit Genotyp CC produzieren jedoch bei Minderexpression des OS9 vermehrt TNF- α . Dies passt wieder zu den von Ziegenhagen et al bereits gezeigten Daten, dass Patienten mit höherem TNF- α Werten ein höheres Risiko der Krankheitsprogredienz besitzen. [165]

Der Genotyp der Patienten scheint also eine Rolle in der Abwehr von Sarkoidose-assoziierten Stimuli zu spielen. Somit hätte OS9 als prädisponierender Faktor demnach einen Einfluss auf die Krankheitsentstehung, sowie die Aktivität und den Verlauf der Sarkoidose zu haben.

Die hier vorgestellten Ergebnisse erhärten die Annahme, dass es sich bei der Multisystemerkrankung Sarkoidose um eine Erkrankung handelt, die durch ein Zusammenwirken von genetischer Prädisposition und der Exposition eines Triggers aus der Umwelt entsteht. Dies kann eine Erklärung liefern, warum manche Menschen nach Exposition Sarkoidose-assoziiierter Agenzien, wie etwa des *Propionibacterium acnes* oder des World Trade Center Staubs, erkrankten, andere wiederum keine Zeichen einer Lungenerkrankung entwickelten.

Zudem kann spekuliert werden, dass der Einfluss genetischer Faktoren erklären kann, warum es im Rahmen der Sarkoidose verschiedene Erscheinungsbilder der Erkrankung gibt. Während ein Teil der Patienten an einer akuten Sarkoidose erkrankt, die häufig eine Spontanremission erfährt, kommt es beim anderen Teil der Patienten zu einer chronischen, häufig progredienten Verlaufsform.

Genauere Untersuchungen der genetischen Voraussetzungen zum Umgang mit verschiedenen Sarkoidose-assoziierten Stimulanzen sind essentiell. Zudem sollten klinische Studien durchgeführt werden, um mögliche Unterschiede der Krankheitsverläufe und des Therapieansprechens in Abhängigkeit des Genotyps zu untersuchen. Hierdurch können Risikoprofile erstellt werden, die prognostische Informationen liefern und eine Entscheidungshilfe zur Optimierung der Behandlung bilden.

7. Zusammenfassung

Die Sarkoidose ist eine Multisystemerkrankung unklarer Genese, die durch eine chronische Inflammation gekennzeichnet ist, welche zu mononukleären Zellinfiltrationen und Bildung von Granulomen führen kann. [1,2] Es wird von einem Zusammenspiel von Umweltfaktoren und genetischen Faktoren ausgegangen. [2] In der hier vorgelegten Arbeit wird die Funktion des OS9 (osteosarcoma amplified 9) als wahrscheinlicher genetischer Risikofaktor untersucht. Bei Untersuchung der THP1-Zelllinie als Modell für Monozyten bzw. Makrophagen konnte gezeigt werden, dass eine UPR vermittelte Steigerung der OS9 Expression Teil einer ER-Stressantwort bildet. Dabei scheinen THP1 Zellen den Stimuli-assoziierten Stress umso besser abwehren zu können, je fortgeschrittener ihr Reifungszustand ist. Im Rahmen dieser Abwehrreaktion wird zudem eine Immunreaktion der Zelle hervorgerufen. Die Versuchsergebnisse der gereiften THP1 Zellen lassen vermuten, dass die OS9 Expression einen Einfluss auf den Umgang der Zelle mit Stress hat und liefern Hinweise zur möglichen Funktion des OS9 im Rahmen einer Immunreaktion. Durch Blockierung des OS9 durch siRNA konnten weitere Effekte der verminderten OS9 Expression auf die Zytokinfreisetzung beobachtet werden. Eine genetische Prädisposition des OS9 Gen scheint demnach Einfluss auf die Abwehrreaktion der Zellen. Die Art und Ausprägung der Zytokinfreisetzung, sowie die Inflammationsreaktion sind wiederum entscheidend an der Immunpathogenese und dem Verlauf der Sarkoidose beteiligt. Weitere Versuchsergebnisse bezüglich Korrelation zwischen Genotyp der Sarkoidosepatienten, OS9 Expression und ihrer Zytokinproduktion, lassen spekulieren, dass Patienten mit Genotyp CC, also homozygoten Trägern des OS9 Risikoallels rs1050045, eine umgekehrte Korrelation der TNF- α Produktion zur OS9 Expression besitzen. Im Folgeschluss würde die geringe OS9 Expression der Risikogentypen CC eine verminderte Abwehr der Zelle bedingen. Es kommt zur vermehrten Akkumulation falsch gefalteter Proteine, Zellschädigung und Immunreaktion der Zelle. Der OS9 Genotyp der Patienten hätte also eine entscheidende Rolle in der Abwehr von Sarkoidose-assoziierten Stimuli. Zudem bringt die höhere TNF- α -Freisetzung der Patienten mit Genotyp CC wiederum ein größeres Risiko für eine höhere Krankheitsaktivität und schnellere Progression der Erkrankung mit sich. Als prädisponierender Faktor hätte OS9 demnach einen Einfluss auf die Entstehung, die Aktivität und den Verlauf der Sarkoidose. Die Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit lassen die Vermutung zu, dass eine ausreichende OS9 Expression eine protektive Funktion besitzt. Der Einfluss des OS9 Genotyps auf den Umgang mit verschiedenen Sarkoidose-assoziierten Stimulanzen, sowie auf Unterschiede der Krankheitsverläufe und des Therapieansprechens sollte in weiteren Studien genauer untersucht werden. Hierdurch können Risikoprofile erstellt werden, die prognostische Informationen liefern und eine Entscheidungshilfe zur Optimierung der Behandlung bilden.

8. Literaturverzeichnis

1. Alcock, F., Swanton, E. (2009): Mammalian OS-9 is upregulated in response to endoplasmic reticulum stress and facilitates ubiquitination of misfolded glycoproteins. *Journal of molecular biology* **385**(4), 1032–1042. doi: 10.1016/j.jmb.2008.11.045
2. Antoniu, S.A. (2006, 2007): Infliximab for the therapy of chronic sarcoidosis, Baughman RP, Drent M, Kavuru M et al.: Infliximab therapy in patients with chronic sarcoidosis and pulmonary involvement. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **174**(7):795-802. Expert opinion on investigational drugs **16**(5), 753–756. doi: 10.1517/13543784.16.5.753
3. Auwerx, J. (1991): The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* **47**(1), 22–31
4. Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B. (1994): Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Advances in immunology* **55**, 97–179
5. Bandyopadhyay, D., Panchabhai, T.S., Mehta, A.C. (2014): Mycobacterium and sarcoidosis: Old wine in a new bottle. *Lung India : official organ of Indian Chest Society* **31**(3), 205–207. doi: 10.4103/0970-2113.135752
6. Barton, A., Thomson, W., Ke, X., Eyre, S., Hinks, A., Bowes, J., Gibbons, L., Plant, D., Wilson, A.G., Marinou, I., Morgan, A., Emery, P., Steer, S., Hocking, L., Reid, D.M., Wordsworth, P., Harrison, P., Worthington, J. (2008): Re-evaluation of putative rheumatoid arthritis susceptibility genes in the post-genome wide association study era and hypothesis of a key pathway underlying susceptibility. *Human molecular genetics* **17**(15), 2274–2279. doi: 10.1093/hmg/ddn128
7. Bernales, S., Papa, F.R., Walter, P. (2006): Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annual review of cell and developmental biology* **22**, 487–508. doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.122303.120200
8. Bernasconi, R., Galli, C., Calanca, V., Nakajima, T., Molinari, M. (2010): Stringent requirement for HRD1, SEL1L, and OS-9/XTP3-B for disposal of ERAD-LS substrates. *The Journal of cell biology* **188**(2), 223–235. doi: 10.1083/jcb.200910042
9. Bull, V.H., Thiede, B. (2012): Proteome analysis of tunicamycin-induced ER stress. *Electrophoresis* **33**(12), 1814–1823. doi: 10.1002/elps.201100565
10. Caesar Peter Moeller Boeck (1970). Boeck's sarcoidosis. *JAMA* **211**(9), 1537–1538
11. Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., Ron, D. (2002): IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* **415**(6867), 92–96. doi: 10.1038/415092a
12. Cao, S.S., Kaufman, R.J. (2012): Unfolded protein response. *Current biology : CB* **22**(16), R622-6. doi: 10.1016/j.cub.2012.07.004
13. Car, B.D., Meloni, F., Luisetti, M., Semenzato, G., Gialdrone-Grassi, G., Walz, A. (1994): Elevated IL-8 and MCP-1 in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* **149**(3 Pt 1), 655–659. doi: 10.1164/ajrccm.149.3.8118632
14. Chen, E.S., Moller, D.R. (2015): Etiologies of Sarcoidosis. *Clinical reviews in allergy & immunology*. doi: 10.1007/s12016-015-8481-z
15. Chen, P.-Y., Yen, J.-H., Kao, R.-H., Chen, J.-H. (2013): Down-regulation of the oncogene PTTG1 via the KLF6 tumor suppressor during induction of myeloid differentiation. *PloS one* **8**(8), e71282. doi: 10.1371/journal.pone.0071282
16. Chen, Q., Koga, T., Uchi, H., Hara, H., Terao, H., Moroi, Y., Urabe, K., Furue, M. (2002): Propionibacterium acnes-induced IL-8 production may be mediated by NF-kappaB activation in human monocytes. *Journal of dermatological science* **29**(2), 97–103
17. Chistiakov, D.A., Sobenin, I.A., Orekhov, A.N., Bobryshev, Y.V. (2014): Role of endoplasmic reticulum stress in atherosclerosis and diabetic macrovascular complications. *BioMed research international* **2014**, 610140. doi: 10.1155/2014/610140
18. Costabel, U., Hunninghake, G.W. (1999): ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. Sarcoidosis Statement Committee. American Thoracic Society. European Respiratory Society. World Association for Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders. *The European respiratory journal* **14**(4), 735–737

19. Crommelin, H.A., Vorselaars, Adriane D M, van Moorsel, Coline H M, Korenromp, Ingrid H E, Deneer, Vera H M, Grutters, J.C. (2014): Anti-TNF therapeutics for the treatment of sarcoidosis. *Immunotherapy* **6**(10), 1127–1143. doi: 10.2217/imt.14.65
20. Daigneault, M., Preston, J.A., Marriott, H.M., Whyte, Moira K B, Dockrell, D.H. (2010): The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PloS one* **5**(1), e8668. doi: 10.1371/journal.pone.0008668
21. Demay, Y., Perochon, J., Szuplewski, S., Mignotte, B., Gaumer, S. (2014): The PERK pathway independently triggers apoptosis and a Rac1/SIpr/JNK/Dilp8 signaling favoring tissue homeostasis in a chronic ER stress *Drosophila* model. *Cell death & disease* **5**, e1452. doi: 10.1038/cddis.2014.403
22. Drake, W.P., Dhason, M.S., Nadaf, M., Shepherd, B.E., Vadivelu, S., Hajizadeh, R., Newman, L.S., Kalams, S.A. (2007): Cellular recognition of Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 and KatG peptides in systemic sarcoidosis. *Infection and immunity* **75**(1), 527–530. doi: 10.1128/IAI.00732-06
23. Drake, W.P., Newman, L.S. (2006): Mycobacterial antigens may be important in sarcoidosis pathogenesis. *Current opinion in pulmonary medicine* **12**(5), 359–363. doi: 10.1097/01.mcp.0000239554.01068.94
24. Drake, W.P., Newman, L.S. (2006): Mycobacterial antigens may be important in sarcoidosis pathogenesis. *Current opinion in pulmonary medicine* **12**(5), 359–363. doi: 10.1097/01.mcp.0000239554.01068.94
25. Dubaniewicz, A. (2010): Mycobacterium tuberculosis heat shock proteins and autoimmunity in sarcoidosis. *Autoimmunity reviews* **9**(6), 419–424. doi: 10.1016/j.autrev.2009.11.015
26. Dubaniewicz, A., Holownia, A., Kalinowski, L., Wybieralska, M., Dobrucki, I.T., Singh, M. (2013): Is mycobacterial heat shock protein 16 kDa, a marker of the dormant stage of Mycobacterium tuberculosis, a sarcoid antigen? *Human immunology* **74**(1), 45–51. doi: 10.1016/j.humimm.2012.10.007
27. Dubaniewicz, A., Holownia, A., Kalinowski, L., Wybieralska, M., Dobrucki, I.T., Singh, M. (2013): Is mycobacterial heat shock protein 16 kDa, a marker of the dormant stage of Mycobacterium tuberculosis, a sarcoid antigen? *Human immunology* **74**(1), 45–51. doi: 10.1016/j.humimm.2012.10.007
28. Dubaniewicz, A., Zimmermann, A., Smigielska, M., Dubaniewicz-Wybieralska, M., Moszkowska, G., Wysocka, J., Adamczyk-Bak, K., Slominski, J.M., Deeg, P. (2013): Sarcoidosis and tuberculosis: a connection to the human leukocyte antigen system. *Advances in experimental medicine and biology* **756**, 229–237. doi: 10.1007/978-94-007-4549-0_29
29. Eishi, Y., Suga, M., Ishige, I., Kobayashi, D., Yamada, T., Takemura, T., Takizawa, T., Koike, M., Kudoh, S., Costabel, U., Guzman, J., Rizzato, G., Gambacorta, M., Du Bois, R., Nicholson, A.G., Sharma, O.P., Ando, M. (2002): Quantitative analysis of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese and European patients with sarcoidosis. *Journal of clinical microbiology* **40**(1), 198–204
30. Eishi, Y., Suga, M., Ishige, I., Kobayashi, D., Yamada, T., Takemura, T., Takizawa, T., Koike, M., Kudoh, S., Costabel, U., Guzman, J., Rizzato, G., Gambacorta, M., Du Bois, R., Nicholson, A.G., Sharma, O.P., Ando, M. (2002): Quantitative analysis of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese and European patients with sarcoidosis. *Journal of clinical microbiology* **40**(1), 198–204
31. Eishi, Y. (2013): Etiologic aspect of sarcoidosis as an allergic endogenous infection caused by Propionibacterium acnes. *BioMed research international*, 935289 (2013). doi: 10.1155/2013/935289
32. Fang, L., Gong, J., Wang, Y., Liu, R., Li, Z., Wang, Z., Zhang, Y., Zhang, C., Song, C., Yang, A., Ting, J.P.-Y., Jin, B., Chen, L. (2014): MICA/B expression is inhibited by unfolded protein response and associated with poor prognosis in human hepatocellular carcinoma. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* **33**, 76. doi: 10.1186/s13046-014-0076-7

33. Fehrenbach, H., Zissel, G., Goldmann, T., Tschernig, T., Vollmer, E., Pabst, R., Müller-Quernheim, J. (2003): Alveolar macrophages are the main source for tumour necrosis factor-alpha in patients with sarcoidosis. *The European respiratory journal* **21**(3), 421–428
34. Fehrenbach, H., Zissel, G., Goldmann, T., Tschernig, T., Vollmer, E., Pabst, R., Müller-Quernheim, J. (2003): Alveolar macrophages are the main source for tumour necrosis factor-alpha in patients with sarcoidosis. *The European respiratory journal* **21**(3), 421–428
35. Fischer, A., Grunewald, J., Spagnolo, P., Nebel, A., Schreiber, S., Müller-Quernheim, J. (2014): Genetics of sarcoidosis. *Seminars in respiratory and critical care medicine* **35**(3), 296–306. doi: 10.1055/s-0034-1376860
36. Fischer, A., Zissel, G., Nebel, A., Müller-Quernheim, J. (2014): Genetisches Risikoprofil der Sarkoidose (Genetic risk profile of sarcoidosis). *Der Internist* **55**(2), 135–140. doi: 10.1007/s00108-013-3308-6
37. Fujita, Y., Naka, T., McNeil, M.R., Yano, I. (2005): Intact molecular characterization of cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) from nine species of mycobacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *Microbiology (Reading, England)* **151**(Pt 10), 3403–3416 doi: 10.1099/mic.0.28158-0
38. Fujita, Y., Naka, T., McNeil, M.R., Yano, I. (2005): Intact molecular characterization of cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) from nine species of mycobacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *Microbiology (Reading, England)* **151**(Pt 10), 3403–3416 doi: 10.1099/mic.0.28158-0
39. Fukuda, T., Matsumura, T., Ato, M., Hamasaki, M., Nishiuchi, Y., Murakami, Y., Maeda, Y., Yoshimori, T., Matsumoto, S., Kobayashi, K., Kinoshita, T., Morita, Y.S. (2013): Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis. *mBio* **4**(1), e00472-12. doi: 10.1128/mBio.00472-12
40. Fung, E Y M G, Smyth, D.J., Howson, J M M, Cooper, J.D., Walker, N.M., Stevens, H., Wicker, L.S., Todd, J.A. (2009): Analysis of 17 autoimmune disease-associated variants in type 1 diabetes identifies 6q23/TNFAIP3 as a susceptibility locus. *Genes and immunity* **10**(2), 188–191. doi: 10.1038/gene.2008.99
41. Gabrilovich, M.I., Walrath, J., van Lunteren, J., Nethery, D., Seifu, M., Kern, J.A., Harding, C.V., Tuscano, L., Lee, H., Williams, S.D., Mackay, W., Tomaszefski, J.F., Silver, R.F. (2013): Disordered Toll-like receptor 2 responses in the pathogenesis of pulmonary sarcoidosis. *Clinical and experimental immunology* **173**(3), 512–522. doi: 10.1111/cei.12138
42. Gabrilovich, M.I., Walrath, J., van Lunteren, J., Nethery, D., Seifu, M., Kern, J.A., Harding, C.V., Tuscano, L., Lee, H., Williams, S.D., Mackay, W., Tomaszefski, J.F., Silver, R.F. (2013): Disordered Toll-like receptor 2 responses in the pathogenesis of pulmonary sarcoidosis. *Clinical and experimental immunology* **173**(3), 512–522. doi: 10.1111/cei.12138
43. Genome-wide association study identifies new multiple sclerosis susceptibility loci on chromosomes 12 and 20. *Nature genetics* **41**(7), 824–828 (2009). doi: 10.1038/ng.396
44. Grunewald, J., Spagnolo, P., Wahlström, J., Eklund, A. (2015): Immunogenetics of Disease-Causing Inflammation in Sarcoidosis. *Clinical reviews in allergy & immunology*. doi: 10.1007/s12016-015-8477-8
45. Gupta, D., Agarwal, R., Aggarwal, A.N., Jindal, S.K.(2007): Molecular evidence for the role of mycobacteria in sarcoidosis: a meta-analysis. *The European respiratory journal* **30**(3), 508–516. doi: 10.1183/09031936.00002607
46. Gupta, D., Agarwal, R., Aggarwal, A.N., Jindal, S.K. (2012): Sarcoidosis and tuberculosis: the same disease with different manifestations or similar manifestations of different disorders. *Current opinion in pulmonary medicine* **18**(5), 506–516. doi: 10.1097/MCP.0b013e3283560809
47. Hance, A.J., Douches, S., Winchester, R.J., Ferrans, V.J., Crystal, R.G. (1985): Characterization of mononuclear phagocyte subpopulations in the human lung by using monoclonal antibodies: changes in alveolar macrophage phenotype associated with pulmonary sarcoidosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **134**(1), 284–292

48. Harding, H.P., Zhang, Y., Ron, D. (1999): Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* **397**(6716), 271–274. doi: 10.1038/16729
49. Heil, T.L., Volkmann, K.R., Wataha, J.C., Lockwood, P.E. (2002): Human peripheral blood monocytes versus THP-1 monocytes for in vitro biocompatibility testing of dental material components. *Journal of oral rehabilitation* **29**(5), 401–407
50. Helenius, A., Aebi, M.: (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annual review of biochemistry* **73**, 1019–1049. doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073752
51. Helmut Hahn, Stefan H.E. Kaufmann (2012): *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*
52. Herold, G. (ed.) (2014): *Innere Medizin*
53. Hetz, C. (2012): The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology* **13**(2), 89–102. doi: 10.1038/nrm3270
54. Hillerdal, G., Nöu, E., Osterman, K., Schmekel, B. (1984): Sarcoidosis: epidemiology and prognosis. A 15-year European study. *The American review of respiratory disease* **130**(1), 29–32
55. Hiramatsu, J.-i., Kataoka, M., Nakata, Y., Okazaki, K., Tada, S., Tanimoto, M., Eishi, Y. (2003): Propionibacterium acnes DNA detected in bronchoalveolar lavage cells from patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases : official journal of WASOG / World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders* **20**(3), 197–203
56. Hofmann, S., Fischer, A., Nothnagel, M., Jacobs, G., Schmid, B., Wittig, M., Franke, A., Gaede, K.I., Schürmann, M., Petrek, M., Mrazek, F., Pabst, S., Grohé, C., Grunewald, J., Ronninger, M., Eklund, A., Rosenstiel, P., Höhne, K., Zissel, G., Müller-Quernheim, J., Schreiber, S. (2013): Genome-wide association analysis reveals 12q13.3-q14.1 as new risk locus for sarcoidosis. *The European respiratory journal* **41**(4), 888–900. doi: 10.1183/09031936.00033812
57. Hofmann, S., Fischer, A., Till, A., Müller-Quernheim, J., Häsler, R., Franke, A., Gäde, K.I., Schaarschmidt, H., Rosenstiel, P., Nebel, A., Schürmann, M., Nothnagel, M., Schreiber, S. (2011): A genome-wide association study reveals evidence of association with sarcoidosis at 6p12.1. *The European respiratory journal* **38**(5), 1127–1135. doi: 10.1183/09031936.00001711
58. Homma, J.Y., Abe, C., Chosa, H., Ueda, K., Saegusa, J., Nakayama, M., Homma, H., Washizaki, M., Okano, H. (1978): Bacteriological investigation on biopsy specimens from patients with sarcoidosis. *The Japanese journal of experimental medicine* **48**(3), 251–255
59. Hosokawa, N., Kamiya, Y., Kamiya, D., Kato, K., Nagata, K. (2009): Human OS-9, a lectin required for glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation, recognizes mannose-trimmed N-glycans. *The Journal of biological chemistry* **284**(25), 17061–17068. doi: 10.1074/jbc.M809725200
60. Hosokawa, N., Kato, K., Kamiya, Y. (2010): Mannose 6-phosphate receptor homology domain-containing lectins in mammalian endoplasmic reticulum-associated degradation. *Methods in enzymology* **480**, 181–197. doi: 10.1016/S0076-6879(10)80010-2
61. Hu, J., Wang, G., Liu, X., Zhou, L., Jiang, M., Yang, L. (2013): Polo-like kinase 1 (PLK1) is involved in toll-like receptor (TLR)-mediated TNF- α production in monocytic THP-1 cells. *PloS one* **8**(10), e78832. doi: 10.1371/journal.pone.0078832
62. Hunninghake, G.W. (1986): Role of alveolar macrophage- and lung T cell-derived mediators in pulmonary sarcoidosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **465**, 82–90
63. Iannuzzi, M.C., Rybicki, B.A., Teirstein, A.S. (2007): Sarcoidosis. *The New England journal of medicine* **357**(21), 2153–2165 doi: 10.1056/NEJMra071714
64. Iannuzzi, M.C., Rybicki, B.A., Teirstein, A.S. (2007): Sarcoidosis. *The New England journal of medicine* **357**(21), 2153–2165. doi: 10.1056/NEJMra071714

65. Indrigo, J., Hunter, R.L., Actor, J.K. (2003): Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. *Microbiology (Reading, England)* **149**(Pt 8), 2049–2059
66. Indrigo, J., Hunter, R.L., Actor, J.K. (2003): Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. *Microbiology (Reading, England)* **149**(Pt 8), 2049–2059
67. Ishige, I., Eishi, Y., Takemura, T., Kobayashi, I., Nakata, K., Tanaka, I., Nagaoka, S., Iwai, K., Watanabe, K., Takizawa, T., Koike, M. (2005): *Propionibacterium acnes* is the most common bacterium commensal in peripheral lung tissue and mediastinal lymph nodes from subjects without sarcoidosis. *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases : official journal of WASOG / World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders* **22**(1), 33–42
68. Izbicki, G., Chavko, R., Banauch, G.I., Weiden, M.D., Berger, K.I., Aldrich, T.K., Hall, C., Kelly, K.J., Prezant, D.J. (2007): World Trade Center "sarcoid-like" granulomatous pulmonary disease in New York City Fire Department rescue workers. *Chest* **131**(5), 1414–1423. doi: 10.1378/chest.06-2114
69. Jäger, R., Bertrand, Mathieu J M, Gorman, A.M., Vandenabeele, P., Samali, A. (2012): The unfolded protein response at the crossroads of cellular life and death during endoplasmic reticulum stress. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **104**(5), 259–270. doi: 10.1111/boc.201100055
70. James, G.D. (2001): Pioneers of sarcoidosis. Ernest Henri Besnier (1831-1909). *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases : official journal of WASOG / World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders* **18**(1), 84
71. Jansen, Bastiaan J H, Eleveld-Trancikova, D., Sanecka, A., van Hout-Kuijper, M., Hendriks, Ilona A M, Looman, Maaike G W, Leusen, Jeanette H W, Adema, G.J. (2009): OS9 interacts with DC-STAMP and modulates its intracellular localization in response to TLR ligation. *Molecular immunology* **46**(4), 505–515. doi: 10.1016/j.molimm.2008.06.032
72. Juarez, E., Nuñez, C., Sada, E., Ellner, J.J., Schwander, S.K., Torres, M. (2010): Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes. *Respiratory research* **11**, 2. doi: 10.1186/1465-9921-11-2
73. Kamata, M., Tada, Y., Mitsui, A., Shibata, S., Miyagaki, T., Asano, Y., Sugaya, M., Kadono, T., Sato, S. (2013): ICAM-1 deficiency exacerbates sarcoid-like granulomatosis induced by *Propionibacterium acnes* through impaired IL-10 production by regulatory T cells. *The American journal of pathology* **183**(6), 1731–1739. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.08.021
74. Karten Gülow, B.-Z., Heidelberg, Ingrid G.Haas (2001): Zellulärer Stressabbau - Alles eine Frage der Regulation. MPI für Immunbiologie Freiburg, vol.
75. Kim, S.S., Kim, J.E., Hyun, C.-G., Lee, N.H. (2011): *Neolitsea aciculata* essential oil inhibits drug-resistant skin pathogen growth and *Propionibacterium acnes*-induced inflammatory effects of human monocyte leukemia. *Natural product communications* **6**(8), 1193–1198
76. Kim, S.S., Kim, J.E., Hyun, C.-G., Lee, N.H. (2011): *Neolitsea aciculata* essential oil inhibits drug-resistant skin pathogen growth and *Propionibacterium acnes*-induced inflammatory effects of human monocyte leukemia. *Natural product communications* **6**(8), 1193–1198
77. Kim, S.-S., Kim, J.-Y., Lee, N.H., Hyun, C.-G. (2008): Antibacterial and anti-inflammatory effects of Jeju medicinal plants against acne-inducing bacteria. *The Journal of general and applied microbiology* **54**(2), 101–106
78. Kimura, Y., Nakazawa, M., Tsuchiya, N., Asakawa, S., Shimizu, N., Yamada, M. (1997): Genomic organization of the OS-9 gene amplified in human sarcomas. *Journal of biochemistry* **122**(6), 1190–1195
79. Kirsten, D. (1995): Sarkoidose in Deutschland. Analyse einer Fragebogenaktion im Jahre 1992 bei Patienten der Deutschen Sarkoidose Vereinigung (Sarcoidosis in Germany. Analysis of a questionnaire survey in 1992 of patients of the German Sarcoidosis Group). *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* **49**(6), 378–382

80. Kirsten, D.H., Magnussen (ed.) (2001): Sarkoidose - up date 2000. Interpneu Verlag
81. Kohro, T., Tanaka, T., Murakami, T., Wada, Y., Aburatani, H., Hamakubo, T., Kodama, T. (2004): A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* **11**(2), 88–97
82. Komura, T., Sakai, Y., Honda, M., Takamura, T., Wada, T., Kaneko, S. (2013): ER stress induced impaired TLR signaling and macrophage differentiation of human monocytes. *Cellular immunology* **282**(1), 44–52. doi: 10.1016/j.cellimm.2013.04.006
83. Kudo, T. (2012): [ER stress and neuropsychiatric disease]. *Seishin shinkeigaku zasshi = Psychiatria et neurologia Japonica* **114**(2), 115–123
84. Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., Ohashi, P.S. (2008): LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **42**(2), 145–151. doi: 10.1016/j.cyto.2008.01.006
85. Meng, F., Lowell, C.A. (1997): Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. *The Journal of experimental medicine* **185**(9), 1661–1670
86. Mikami, K., Yamaguchi, D., Tateno, H., Hu, D., Qin, S.-Y., Kawasaki, N., Yamada, M., Matsumoto, N., Hirabayashi, J., Ito, Y., Yamamoto, K. (2010): The sugar-binding ability of human OS-9 and its involvement in ER-associated degradation. *Glycobiology* **20**(3), 310–321. doi: 10.1093/glycob/cwp175
87. Minami, J., Eishi, Y., Ishige, Y., Kobayashi, I., Ishige, I., Kobayashi, D., Ando, N., Uchida, K., Ikeda, S., Sorimachi, N., Karasuyama, H., Takemura, T., Takizawa, T., Koike, M. (2003): Pulmonary granulomas caused experimentally in mice by a recombinant trigger-factor protein of *Propionibacterium acnes*. *Journal of medical and dental sciences* **50**(4), 265–274
88. Ming, W.J., Bersani, L., Mantovani, A. (1987): Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **138**(5), 1469–1474
89. Moller, D.R., Forman, J.D., Liu, M.C., Noble, P.W., Greenlee, B.M., Vyas, P., Holden, D.A., Forrester, J.M., Lazarus, A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Karp, C. (1996): Enhanced expression of IL-12 associated with Th1 cytokine profiles in active pulmonary sarcoidosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **156**(12), 4952–4960
90. Moreno, J.A., Halliday, M., Molloy, C., Radford, H., Verity, N., Axten, J.M., Ortori, C.A., Willis, A.E., Fischer, P.M., Barrett, D.A., Mallucci, G.R. (2013): Oral treatment targeting the unfolded protein response prevents neurodegeneration and clinical disease in prion-infected mice. *Science translational medicine* **5**(206), 206ra138. doi: 10.1126/scitranslmed.3006767
91. Mornex, J.F., Leroux, C., Greenland, T., Ecochard, D. (1994): From granuloma to fibrosis in interstitial lung diseases: molecular and cellular interactions. *The European respiratory journal* **7**(4), 779–785
92. Mortaz, E., Masjedi, M.R., Tabarsi, P., Pourabdollah, M., Adcock, I.M. (2014): Immunopathology of sarcoidosis. *Iranian journal of allergy, asthma, and immunology* **13**(5), 300–306
93. Müller-Quernheim, J., Pfeifer, S., Männel, D., Strausz, J., Ferlinz, R. (1992): Lung-restricted activation of the alveolar macrophage/monocyte system in pulmonary sarcoidosis. *The American review of respiratory disease* **145**(1), 187–192. doi: 10.1164/ajrccm/145.1.187
94. Müller-Quernheim, J. (1998): Sarcoidosis: immunopathogenetic concepts and their clinical application. *The European respiratory journal* **12**(3), 716–738
95. Nakajima, S., Kitamura, M. (2013): Bidirectional regulation of NF-κB by reactive oxygen species: a role of unfolded protein response. *Free radical biology & medicine* **65**, 162–174. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.020
96. Negi, M., Takemura, T., Guzman, J., Uchida, K., Furukawa, A., Suzuki, Y., Iida, T., Ishige, I., Minami, J., Yamada, T., Kawachi, H., Costabel, U., Eishi, Y. (2012): Localization of *propionibacterium acnes* in granulomas supports a possible etiologic link between sarcoidosis and the bacterium. *Modern pathology : an official journal of the*

- United States and Canadian Academy of Pathology, Inc **25**(9), 1284–1297. doi: 10.1038/modpathol.2012.80
97. Neville, E., Walker, A.N., James, D.G. (1983): Prognostic factors predicting the outcome of sarcoidosis: an analysis of 818 patients. *The Quarterly journal of medicine* **52**(208), 525–533
 98. Noor, A., Knox, K.S. (2007): Immunopathogenesis of sarcoidosis. *Clinics in dermatology* **25**(3), 250–258, doi: 10.1016/j.clindermatol.2007.03.002
 99. Nunes, H., Bouvry, D., Soler, P., Valeyre, D. (2007): Sarcoidosis. *Orphanet journal of rare diseases* **2**, 46. doi: 10.1186/1750-1172-2-46
 100. Oswald-Richter, K.A., Beachboard, D.C., Zhan, X., Gaskill, C.F., Abraham, S., Jenkins, C., Culver, D.A., Drake, W. (2010): Multiple mycobacterial antigens are targets of the adaptive immune response in pulmonary sarcoidosis. *Respiratory research* **11**, 161. doi: 10.1186/1465-9921-11-161
 101. Pabst, S., Baumgarten, G., Stremmel, A., Lennarz, M., Knüfermann, P., Gillissen, A., Vetter, H., Grohé, C. (2006): Toll-like receptor (TLR) 4 polymorphisms are associated with a chronic course of sarcoidosis. *Clinical and experimental immunology* **143**(3), 420–426. doi: 10.1111/j.1365-2249.2006.03008.x
 102. Pabst, S., Bradler, O., Gillissen, A., Nickenig, G., Skowasch, D., Grohe, C. (2013): Toll-like receptor-9 polymorphisms in sarcoidosis and chronic obstructive pulmonary disease. *Advances in experimental medicine and biology* **756**, 239–245. doi: 10.1007/978-94-007-4549-0_30
 103. Passegué, É., Jamieson, Catriona H M, Ailles, L.E., Weissman, I.L. (2003): Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100 Suppl 1**, 11842–11849. doi: 10.1073/pnas.2034201100
 104. Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., Beutler, B. (1998): Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science (New York, N.Y.)* **282**(5396), 2085–2088
 105. Quan, E.M., Kamiya, Y., Kamiya, D., Denic, V., Weibezahn, J., Kato, K., Weissman, J.S. (2008): Defining the glycan destruction signal for endoplasmic reticulum-associated degradation. *Molecular cell* **32**(6), 870–877. doi: 10.1016/j.molcel.2008.11.017
 106. Quesniaux, V.J., Nicolle, D.M., Torres, D., Kremer, L., Guérardel, Y., Nigou, J., Puzo, G., Erard, F., Ryffel, B. (2004): Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent-positive and TLR2-independent-negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **172**(7), 4425–4434
 107. Rajaram, Murugesan V S, Ni, B., Morris, J.D., Brooks, M.N., Carlson, T.K., Bakthavachalu, B., Schoenberg, D.R., Torrelles, J.B., Schlesinger, L.S. (2011): Mycobacterium tuberculosis lipomannan blocks TNF biosynthesis by regulating macrophage MAPK-activated protein kinase 2 (MK2) and microRNA miR-125b. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(42), 17408–17413. doi: 10.1073/pnas.1112660108
 108. Reynier, F., de Vos, Alex F, Hoogerwerf, J.J., Bresser, P., van der Zee, Jaring S, Paye, M., Pachot, A., Mougin, B., van der Poll, Tom (2012): Gene expression profiles in alveolar macrophages induced by lipopolysaccharide in humans. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* **18**, 1303–1311. doi: 10.2119/molmed.2012.00230
 109. Römisch, K.: Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Annual review of cell and developmental biology* **21**, 435–456 (2005). doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.012704.133250
 110. Ron, D., Walter, P. (2007): Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**(7), 519–529. doi: 10.1038/nrm2199
 111. Rybicki, B.A., Iannuzzi, M.C., Frederick, M.M., Thompson, B.W., Rossman, M.D., Bresnitz, E.A., Terrin, M.L., Moller, D.R., Barnard, J., Baughman, R.P., DePalo, L., Hunninghake, G., Johns, C., Judson, M.A., Knatterud, G.L., McLennan, G., Newman, L.S., Rabin, D.L., Rose, C., Teirstein, A.S., Weinberger, S.E., Yeager, H., Cherniack, R.:

- (2001) Familial aggregation of sarcoidosis. A case-control etiologic study of sarcoidosis (ACCESS). *American journal of respiratory and critical care medicine* **164**(11), 2085–2091. doi: 10.1164/ajrccm.164.11.2106001
112. Rynänen, J., Seuter, S., Campbell, M.J., Carlberg, C. (2013): Gene regulatory scenarios of primary 1,25-dihydroxyvitamin D₃ target genes in a human myeloid leukemia cell line. *Cancers* **5**(4), 1221–1241. doi: 10.3390/cancers5041221
113. Saitoh, T., Yano, I., Kumazawa, Y., Takimoto, H. (2012): Pulmonary TCR γδ T cells induce the early inflammation of granuloma formation by a glycolipid trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) isolated from *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunopharmacology and immunotoxicology* **34**(5), 815–823. doi: 10.3109/08923973.2012.658922
114. Saitoh, T., Yano, I., Kumazawa, Y., Takimoto, H. (2012): Pulmonary TCR γδ T cells induce the early inflammation of granuloma formation by a glycolipid trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) isolated from *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunopharmacology and immunotoxicology* **34**(5), 815–823. doi: 10.3109/08923973.2012.658922
115. Satoh, T., Chen, Y., Hu, D., Hanashima, S., Yamamoto, K., Yamaguchi, Y. (2010): Structural basis for oligosaccharide recognition of misfolded glycoproteins by OS-9 in ER-associated degradation. *Molecular cell* **40**(6), 905–916. doi: 10.1016/j.molcel.2010.11.017
116. Schumann, R.R., Leong, S.R., Flaggs, G.W., Gray, P.W., Wright, S.D., Mathison, J.C., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J. (1990): Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science (New York, N.Y.)* **249**(4975), 1429–1431
117. Schürmann, M., Kwiatkowski, R., Albrecht, M., Fischer, A., Hampe, J., Müller-Quernheim, J., Schwinger, E., Schreiber, S. (2008): Study of Toll-like receptor gene loci in sarcoidosis. *Clinical and experimental immunology* **152**(3), 423–431. doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03621.x
118. Schwende, H., Fitzke, E., Ambs, P., Dieter, P. (1996): Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Journal of leukocyte biology* **59**(4), 555–561
119. Sen, R., Baltimore, D. (1986): Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* **47**(6), 921–928
120. Smith, D., Hänsch, H., Bancroft, G., Ehlers, S. (1997): T-cell-independent granuloma formation in response to *Mycobacterium avium*: role of tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *Immunology* **92**(4), 413–421
121. Song, Z., Marzilli, L., Greenlee, B.M., Chen, E.S., Silver, R.F., Askin, F.B., Teirstein, A.S., Zhang, Y., Cotter, R.J., Moller, D.R. (2005): *Mycobacterial catalase-peroxidase* is a tissue antigen and target of the adaptive immune response in systemic sarcoidosis. *The Journal of experimental medicine* (5), 755–767. doi: 10.1084/jem.20040429
122. Spagnolo, P., Grunewald, J. (2013): Recent advances in the genetics of sarcoidosis. *Journal of medical genetics* **50**(5), 290–297. doi: 10.1136/jmedgenet-2013-101532
123. Spagnolo, P. (2015): Sarcoidosis: a Critical Review of History and Milestones. *Clinical reviews in allergy & immunology*. doi: 10.1007/s12016-015-8480-0
124. Steffen, M., Petersen, J., Oldigs, M., Karmeier, A., Magnussen, H., Thiele, H.G., Raedler, A. (1993): Increased secretion of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1-beta, and interleukin-6 by alveolar macrophages from patients with sarcoidosis. *The Journal of allergy and clinical immunology* **91**(4), 939–949
125. Strausz, J., Männel, D.N., Pfeifer, S., Borkowski, A., Ferlinz, R., Müller-Quernheim, J. (1991): Spontaneous monokine release by alveolar macrophages in chronic sarcoidosis. *International archives of allergy and applied immunology* **96**(1), 68–75
126. Strausz, J., Müller-Quernheim, J., Stepling, H., Ferlinz, R. (1990): Oxygen radical production by alveolar inflammatory cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *The American review of respiratory disease* **141**(1), 124–128. doi: 10.1164/ajrccm/141.1.124
127. Szponar, B., Larsson, L., Domagała-Kulawik, J. (2012): Endotoxin markers in bronchoalveolar lavage fluid of patients with interstitial lung diseases. *Multidisciplinary respiratory medicine* **7**(1), 54. doi: 10.1186/2049-6958-7-54
128. Takemori, N., Nakamura, M., Kojima, M., Eishi, Y. (2014): Successful treatment in a case of *Propionibacterium acnes*-associated sarcoidosis with clarithromycin

- administration: a case report. *Journal of medical case reports* **8**, 15. doi: 10.1186/1752-1947-8-15
129. Tapping, R.I., Tobias, P.S. (2003): Mycobacterial lipoarabinomannan mediates physical interactions between TLR1 and TLR2 to induce signaling. *Journal of endotoxin research* **9**(4), 264–268. doi: 10.1179/096805103225001477
130. Tapping, R.I., Tobias, P.S. (2003): Mycobacterial lipoarabinomannan mediates physical interactions between TLR1 and TLR2 to induce signaling. *Journal of endotoxin research* **9**(4), 264–268. doi: 10.1179/096805103225001477
131. Texereau, J., Chiche, J.-D., Taylor, W., Choukroun, G., Comba, B., Mira, J.-P. (2005): The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **41 Suppl 7**, S408-15. doi: 10.1086/431990
132. Tiwari, R.L., Singh, V., Singh, A., Barthwal, M.K.: IL-1R-associated kinase-1 mediates protein kinase C α -induced IL-1 β production in monocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **187**(5), 2632–2645 (2011). doi: 10.4049/jimmunol.1002526
133. Topal, A.N., Canda, M.S., Günel, O. (2003): Schaumann bodies in bronchial and bronchioalveolar lavage fluid in a case of sarcoidosis. *Acta cytologica* **47**(2), 320–321
134. Torrelles, J.B., Sieling, P.A., Arcos, J., Knaup, R., Bartling, C., Rajaram, Murugesan V S, Stenger, S., Modlin, R.L., Schlesinger, L.S. (2011): Structural differences in lipomannans from pathogenic and nonpathogenic mycobacteria that impact CD1b-restricted T cell responses. *The Journal of biological chemistry* **286**(41), 35438–35446. doi: 10.1074/jbc.M111.232587
135. Valdés, P., Mercado, G., Vidal, R.L., Molina, C., Parsons, G., Court, F.A., Martinez, A., Galleguillos, D., Armentano, D., Schneider, B.L., Hetz, C. (2014): Control of dopaminergic neuron survival by the unfolded protein response transcription factor XBP1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**(18), 6804–6809. doi: 10.1073/pnas.1321845111
136. Valentonyte, R., Hampe, J., Huse, K., Rosenstiel, P., Albrecht, M., Stenzel, A., Nagy, M., Gaede, K.I., Franke, A., Haesler, R., Koch, A., Lengauer, T., Seegert, D., Reiling, N., Ehlers, S., Schwinger, E., Platzer, M., Krawczak, M., Müller-Quernheim, J., Schürmann, M., Schreiber, S. (2005): Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2. *Nature genetics* **37**(4), 357–364. doi: 10.1038/ng1519
137. Valeyre, D., Prasse, A., Nunes, H., Uzunhan, Y., Brillet, P.-Y., Müller-Quernheim, J. (2014): Sarcoidosis. *Lancet* **383**(9923), 1155–1167. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60680-7
138. van Crevel, R., Ottenhoff, Tom H M, van der Meer, Jos W M (2002): Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical microbiology reviews* **15**(2), 294–309
139. van Crevel, R., Ottenhoff, Tom H M, van der Meer, Jos W M (2002): Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical microbiology reviews* **15**(2), 294–309
140. van der Harg, J M, Nölle, A., Zwart, R., Boerema, A.S., van Haastert, E S, Strijkstra, A.M., Hoozemans, J.J., Scheper, W. (2014): The unfolded protein response mediates reversible tau phosphorylation induced by metabolic stress. *Cell death & disease* **5**, e1393. doi: 10.1038/cddis.2014.354
141. Vardhanabhuti, V., Pang, C.-L., Ninan, T., Adams, W.M., Raju, V., Suresh, P. (2014): Sarcoidosis--the greatest mimic. *Seminars in ultrasound, CT, and MR* **35**(3), 215–224. doi: 10.1053/j.sult.2013.12.003
142. Veltkamp, M., van Moorsel, C H M, Rijkers, G.T., Ruven, H J T, Grutters, J.C. (2012): Genetic variation in the Toll-like receptor gene cluster (TLR10-TLR1-TLR6) influences disease course in sarcoidosis. *Tissue antigens* **79**(1), 25–32. doi: 10.1111/j.1399-0039.2011.01808.x
143. Veltkamp, M., van Moorsel, C H M, Rijkers, G.T., Ruven, H J T, Grutters, J.C. (2012): Genetic variation in the Toll-like receptor gene cluster (TLR10-TLR1-TLR6) influences disease course in sarcoidosis. *Tissue antigens* **79**(1), 25–32. doi: 10.1111/j.1399-0039.2011.01808.x

144. Vembar, S.S., Brodsky, J.L. (2008): One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**(12), 944–957. doi: 10.1038/nrm2546
145. Vestbo, J., Viskum, K. (1994): Respiratory symptoms at presentation and long-term vital prognosis in patients with pulmonary sarcoidosis. *Sarcoidosis* **11**(2), 123–125
146. Wahlström, J., Dengjel, J., Winqvist, O., Targoff, I., Persson, B., Duyar, H., Rammensee, H.-G., Eklund, A., Weissert, R., Grunewald, J. (2009): Autoimmune T cell responses to antigenic peptides presented by bronchoalveolar lavage cell HLA-DR molecules in sarcoidosis. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* **133**(3), 353–363 doi: 10.1016/j.clim.2009.08.008
147. Wakabayashi, S., Yoshida, H. (2013): The essential biology of the endoplasmic reticulum stress response for structural and computational biologists. *Computational and structural biotechnology journal* **6**, e201303010. doi: 10.5936/csbj.201303010
148. Walter, P., Ron, D. (2011): The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science (New York, N.Y.)* **334**(6059), 1081–1086. doi: 10.1126/science.1209038
149. Wang, M., Kaufman, R.J. (2014): The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nature reviews. Cancer* **14**(9), 581–597. doi: 10.1038/nrc3800
150. Wang, M., Kaufman, R.J. (2014): The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nature reviews. Cancer* **14**(9), 581–597. doi: 10.1038/nrc3800
151. Wei, J., Rahman, S., Ayoub, E.A., Dickhout, J.G., Ask, K. (2013): Protein misfolding and endoplasmic reticulum stress in chronic lung disease. *Chest* **143**(4), 1098–1105. doi: 10.1378/chest.12-2133
152. Werner Linß, Jochen Fanghänel (ed.) (1998): *Histologie: Zytologie, allgemeine Histologie, mikroskopische Anatomie*
153. White, S.L., Belov, L., Barber, N., Hodgkin, P.D., Christopherson, R.I. (2005): Immunophenotypic changes induced on human HL60 leukaemia cells by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. *Leukemia research* **29**(10), 1141–1151. doi: 10.1016/j.leukres.2005.02.012
154. Xue, X., Piao, J.-H., Nakajima, A., Sakon-Komazawa, S., Kojima, Y., Mori, K., Yagita, H., Okumura, K., Harding, H., Nakano, H. (2005): Tumor necrosis factor alpha (TNF α) induces the unfolded protein response (UPR) in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion, and the UPR counteracts ROS accumulation by TNF α . *The Journal of biological chemistry* **280**(40), 33917–33925. doi: 10.1074/jbc.M505818200
155. Yoshida, H. (2007): ER stress and diseases. *The FEBS journal* **274**(3), 630–658. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05639.x
156. Yu, Y., Zhang, L., Liu, Q., Tang, L., Sun, H., Guo, H. (2015): *Molecular medicine reports* **11**(3), 2048–2054. doi: 10.3892/mmr.2014.2960
157. Zeng, J., Du, S., Zhou, J., Huang, K. (2008): Role of SelS in lipopolysaccharide-induced inflammatory response in hepatoma HepG2 cells. *Archives of biochemistry and biophysics* **478**(1), 1–6. doi: 10.1016/j.abb.2008.07.016
158. Zhang, L., Nosak, C., Sollazzo, P., Odisho, T., Volchuk, A. (2014): IRE1 inhibition perturbs the unfolded protein response in a pancreatic β -cell line expressing mutant proinsulin, but does not sensitize the cells to apoptosis. *BMC cell biology* **15**, 29. doi: 10.1186/1471-2121-15-29
159. Zernakova, A., Stahl, E.A., Trynka, G., Raychaudhuri, S., Festen, E.A., Franke, L., Zestra, H.-J., Fehrmann, Rudolf S N, Kurreeman, Fina A S, Thomson, B., Gupta, N., Romanos, J., McManus, R., Ryan, A.W., Turner, G., Brouwer, E., Posthumus, M.D., Remmers, E.F., Tucci, F., Toes, R., Grandone, E., Mazzilli, M.C., Rybak, A., Cukrowska, B., Coenen, Marieke J H, Radstake, Timothy R D J, van Riel, Piet L C M, Li, Y., de Bakker, Paul I W, Gregersen, P.K., Worthington, J., Siminovitch, K.A., Klareskog, L., Huizinga, Tom W J, Wijmenga, C., Plenge, R.M. (2011): Meta-analysis of genome-wide

- association studies in celiac disease and rheumatoid arthritis identifies fourteen non-HLA shared loci. *PLoS genetics* **7**(2), e1002004. doi: 10.1371/journal.pgen.1002004
160. Zhou, T., Dang, Y., Zheng, Y.-H. (2014): The mitochondrial translocator protein, TSPO, inhibits HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis via the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway. *Journal of virology* **88**(6), 3474–3484. doi: 10.1128/JVI.03286-13
161. Zhou, Y., Hu, Y., Li, H. (2013): Role of *Propionibacterium Acnes* in Sarcoidosis: A Meta-analysis. *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases : official journal of WASOG / World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders* **30**(4), 262–267
162. Zhou, Y., Hu, Y., Li, H. (2013): Role of *Propionibacterium Acnes* in Sarcoidosis: A Meta-analysis. *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases : official journal of WASOG / World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders* **30**(4), 262–267
163. Ziegenhagen, M.W., Benner, U.K., Zissel, G., Zabel, P., Schlaak, M., Müller-Quernheim, J.: Sarcoidosis (1997): TNF-alpha release from alveolar macrophages and serum level of sIL-2R are prognostic markers. *American journal of respiratory and critical care medicine* **156**(5), 1586–1592. doi: 10.1164/ajrccm.156.5.97-02050
164. Ziegenhagen, M.W., Müller-Quernheim, J. (2003): The cytokine network in sarcoidosis and its clinical relevance. *Journal of internal medicine* **253**(1), 18–30
165. Ziegenhagen, M.W., Schrum, S., Zissel, G., Zipfel, P.F., Schlaak, M., Müller-Quernheim, J. (1998): Increased expression of proinflammatory chemokines in bronchoalveolar lavage cells of patients with progressing idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* **46**(5), 223–231
166. Zissel, G., Müller-Quernheim, J. (1998): Sarcoidosis: historical perspective and immunopathogenesis (Part I). *Respiratory medicine* **92**(2), 126–139
167. Zissel, G., Müller-Quernheim, J. (2015): Cellular Players in the Immunopathogenesis of Sarcoidosis. *Clinics in chest medicine* **36**(4), 549–560. doi: 10.1016/j.ccm.2015.08.016
168. Zissel, G., Prasse, A., Müller-Quernheim, J. (2007): Sarcoidosis--immunopathogenetic concepts. *Seminars in respiratory and critical care medicine* **28**(1), 3–14. doi: 10.1055/s-2007-970329
169. Zissel, G., Prasse, A., Müller-Quernheim, J. (2010): Immunologic response of sarcoidosis. *Seminars in respiratory and critical care medicine* **31**(4), 390–403. doi: 10.1055/s-0030-1262208
170. Zissel, G. (2014): Cellular activation in the immune response of sarcoidosis. *Seminars in respiratory and critical care medicine* **35**(3), 307–315 (2014). doi: 10.1055/s-0034-1376861