

Aus dem Department Innere Medizin
Klinik für Pneumologie
des Universitätsklinikums Freiburg im Breisgau

Einfluss von ATP und seinen Derivaten auf die Aktivierung von Monozyten



Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg im Breisgau

Vorgelegt 2018

von Benedikt Florian Scherr
geboren in Villingen-Schwenningen

Dekan: Prof. Dr. med. Norbert Südkamp

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

Zweiter Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Torben Pottgießer

Jahr der Promotion: 2019

Sapere aude

Meinen Eltern
und Geschwistern

Inhalt

Inhalt	4
1. Einleitung.....	7
A. <i>Monozyten</i>	7
I. Charakterisierung	7
II. Aktivierung und Differenzierung.....	7
B. <i>CC-Ligand 18</i>	10
I. Charakterisierung	10
II. CCL18 bei pulmonalen und anderen Erkrankungen.....	10
C. <i>Weitere relevante Zytokine</i>	12
I. Interleukin-1 β	12
II. Interleukin-1 Rezeptorantagonist.....	13
III. Tumor Nekrose Faktor-alpha	14
D. <i>Adenosintriphosphat</i>	15
I. Charakterisierung	15
II. ATP als Messenger-Molekül, seine Rezeptoren und seine Rolle im Immunsystem.....	15
E. <i>Interstitielle Lungenerkrankungen</i>	19
F. <i>Idiopathische Lungenfibrose</i>	20
I. Definition	20
II. Pathogenese und alternative Immunantwort.....	21
G. <i>Sarkoidose</i>	26
I. Definition	26
II. Pathogenese und klassische Immunantwort.....	26
2. Fragestellung	29
A. <i>Grundannahmen</i>	29
B. <i>Fragen</i>	29
3. Materialien und Methoden	31
A. <i>Materialien</i>	31
I. Geräte.....	31
II. Verbrauchsmaterialien.....	32
III. Chemikalien, Biochemikalien und Medien.....	32
IV. Stimulanzen.....	33
V. Puffer und Lösungen für Monozyten-Isolation.....	33

VI.	Puffer und Lösungen für ELISA	34
VII.	Primer für PCR	34
B.	Methoden	34
I.	Probandeneinschluss	34
II.	Gewinnung der Serumproben und Monozytenisolation	35
III.	Kokultur mit A549 und konditioniertem Medium	37
IV.	Zellkulturen	38
V.	Enzyme-linked immunosorbent assay ELISA	42
VI.	Polymerase chain reaction PCR	43
VII.	Statistische Auswertung	47
4.	Resultate	48
A.	Zytokin-Level nach der Stimulation mit ATP, BzATP und Apyrase (Protokoll 1 und 2; siehe Material und Methoden Tab. 3)	48
B.	Einfluss von konditioniertem Medium auf Monozyten (Protokoll 3, 4 und 5).....	51
C.	CCL18- und IL-1 β -Konzentrationen nach kombinierter Stimulation mit ATP oder Apyrase und LPS (Protokoll 4 und 5).....	54
D.	Blockade der purinergen Rezeptoren mit Antagonisten (Protokoll 6).....	58
E.	ADP, AMP und Adenosin zeigen vergleichbare Effekte auf CCL18- und IL-1 β -Spiegel wie ATP (Protokoll 6)	60
F.	P2X ₇ vermittelt den Effekt von ATP auf CCL18 (Protokoll 7).....	62
5.	Diskussion	64
A.	M1-Aktivierung durch ATP.....	65
B.	Zeitliche Limitation der Monozyten-Differenzierung	68
C.	Wirkung purinerner Antagonisten	70
D.	Einfluss der Stimulation mit LPS.....	71
E.	Effekte der ATP-Abbauprodukte	72
F.	Ausblick	75

6.	Zusammenfassung	77
7.	Literaturverzeichnis, Abbildungsverzeichnis.....	78
8.	Publikation	91
9.	Anhang.....	92
	<i>A. Lebenslauf</i>	<i>92</i>
	<i>B. Eidesstattliche Versicherung</i>	<i>92</i>
	<i>C. Erklärung zum Eigenanteil.....</i>	<i>93</i>
	<i>D. Danksagung.....</i>	<i>93</i>

1. Einleitung

A. Monozyten

I. Charakterisierung

Monozyten sind im peripheren Blut zirkulierende weiße Blutzellen des Immunsystems (Leukozyten), die vor allem Vorläufer von dendritischen Zellen sowie von Makrophagen darstellen. Sie sind die Schnittstelle zwischen unspezifischer und spezifischer Immunabwehr. Dendritische Zellen (DC) sind dabei für die Präsentation von (Fremd-) Antigenen zuständig (und damit ein afferenter Schenkel der spezifischen Immunabwehr), während die Aufgabe der Makrophagen die Zerstörung körperfremder und nekrotischer Strukturen durch Phagozytose ist. Die Lebensdauer der Monozyten beträgt ein bis drei Tage, danach erfolgt die Differenzierung zu Makrophagen oder dendritischen Zellen. (Lüllmann-Rauch, 2006), (Schmidt, Lang et al., 2005)

Alle Monozyten besitzen den immunphänotypischen Oberflächenmarker CD (cluster of differentiation) 14. (Jonas, Schuett et al., 1990) Es gibt allerdings drei Immunphänotypen der Monozyten mit weiteren Subtypen, die sich anhand der Expression ihrer CD-Moleküle charakterisieren lassen (Ziegler-Heitbrock, Ancuta et al., 2010):

- CD14⁺⁺ CD16⁻ (klassischer Monozyt)
- CD14⁺ CD16⁺⁺ (nicht-klassischer Monozyt)
- CD14⁺⁺ CD16⁺ (intermediärer Monozyt)

II. Aktivierung und Differenzierung

Die Aktivierung und Polarisierung der heterogenen Gruppe der mononukleären phagozytären Zellen spielt eine entscheidende Rolle in der Funktion des Immunsystems und in der Pathophysiologie vieler verschiedener Erkrankungen. Die Ausrichtung des erworbenen Immunsystems entweder zu einer Th1 (T-Helferzelle Typ 1)- oder einer Th2 (T-Helferzelle Typ 2)-Zell-Antwort wird durch Monozyten, Makrophagen und vor allem durch dendritische Zellen bestimmt. Zusätzlich sind Makrophagen Teil dieser Polarisierung durch die verschiedenartige Ausrichtung der Zellen als M1- oder als M2-Makrophagen. (Gordon, 2003), (Mantovani, Sica et al., 2004)

Im Rahmen der funktionellen Polarisation, die ursächlich der hohen Plastizität mononukleärer Zellen zuzuschreiben ist, können zwei verschiedene Makrophagen-Populationen unterschieden werden: M1- oder klassisch aktivierte Makrophagen, die sich typischerweise entwickeln, nachdem die Monozyten dem Zytokin Interferon (IFN) oder dem Bestandteil von Bakterienmembranen Lipopolysaccharid (LPS) ausgesetzt waren, stehen alternativ aktivierten oder M2-Makrophagen gegenüber. Beide Entitäten verkörpern Extreme eines Kontinuums, welche durch vielgestaltige Veränderungen der Gen-Expression hervorgerufen werden. (Gordon, 2003), (Martinez, Gordon et al., 2006), (Mantovani, Sica et al., 2004)

Im Allgemeinen können M1-Makrophagen als potente Effektorzellen beschrieben werden, die Moleküle wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und proinflammatorische Zytokine, z.B. Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interleukin 1 β (IL-1 β) und Interleukin 6 (IL-6) produzieren. Sie werden durch Th1-Zellen aktiviert und induzieren umgekehrt ihrerseits eine Th1-Zell-Antwort. Zudem entstehen die klassisch aktivierten Makrophagen durch den Einfluss von „danger signals“, welche auf pathologische Zustände im Rahmen von Erkrankung und Nekrose hinweisen; diese Induktoren sind unter anderem bakterielle Endotoxine, Lipopolysaccharid und auch extrazelluläres Adenosintriphosphat. M1-Zellen zeigen proinflammatorische und antimikrobielle Charakteristika und fördern starke IL-12-medierte Th1-Zell-Antworten. Sie sind Teil der Abwehrreaktion gegen parasitäre Infektionen und von gegen Tumorzellen gerichteten Immunantworten. (Martinez, Gordon et al., 2006)

Demgegenüber produzieren M2-Zellen ein breites Spektrum an Zytokinen abhängig vom Signalweg, der die Aktivierung induziert. M2-Makrophagen produzieren hauptsächlich große Mengen von Interleukin 1-Rezeptorantagonist (IL-1Ra) und nur sehr wenig aktives IL-1 β . (Mantovani, Sica et al., 2005) M2-Makrophagen befördern die Progression von Tumorzellen (als Tumor-associated macrophages TAM) sowie die Reparatur, Regeneration und Umbauprozesse von Gewebe. (Dinarello, 2005), (Mantovani, Sozzani et al., 2002), (Sica, Schioppa et al., 2006) M2-polarisierte Makrophagen generieren Th2-assoziierte Effektorfunktionen, die sich hauptsächlich in anti-inflammatorischen Eigenschaften zeigen, die mit einer erhöhten Bildung trophischer und profibrotischer Faktoren bei gleichzeitig reduzierten Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine einhergehen. Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) sind typische M2-Makrophagen.

Die M2-Subpopulation zeigt eine große Vielfalt von Signalwegen, die zu dieser Art der Aktivierung von Makrophagen führen, sodass diese Untergruppe am besten durch das Ausbleiben einer Differenzierung zu M1-Makrophagen definiert ist. Diese Aktivierung geschieht typischerweise durch IL-4, IL-10 oder IL-13, durch Immunkomplexe und verschiedenste andere Mechanismen. (Gordon, 2003), (Sica, Schioppa et al., 2006) Dennoch können auch

Kollagen und von Fibroblasten und Tumorzellen produzierte Produkte eine M2-Aktivierung induzieren. (Sica, Schioppa et al., 2006), (Wynn, 2004), (Müller-Quernheim, Potthast et al., 2012)

Die verschiedenartige Aktivierung der Makrophagen zeigt sich dann in der Expression unterschiedlicher Zytokine – pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF- α können dabei als Marker für eine M1-Aktivierung angesehen werden, wohingegen beispielsweise CCL18 und IL-1Ra auf eine alternative M2-Differenzierung hinweisen.

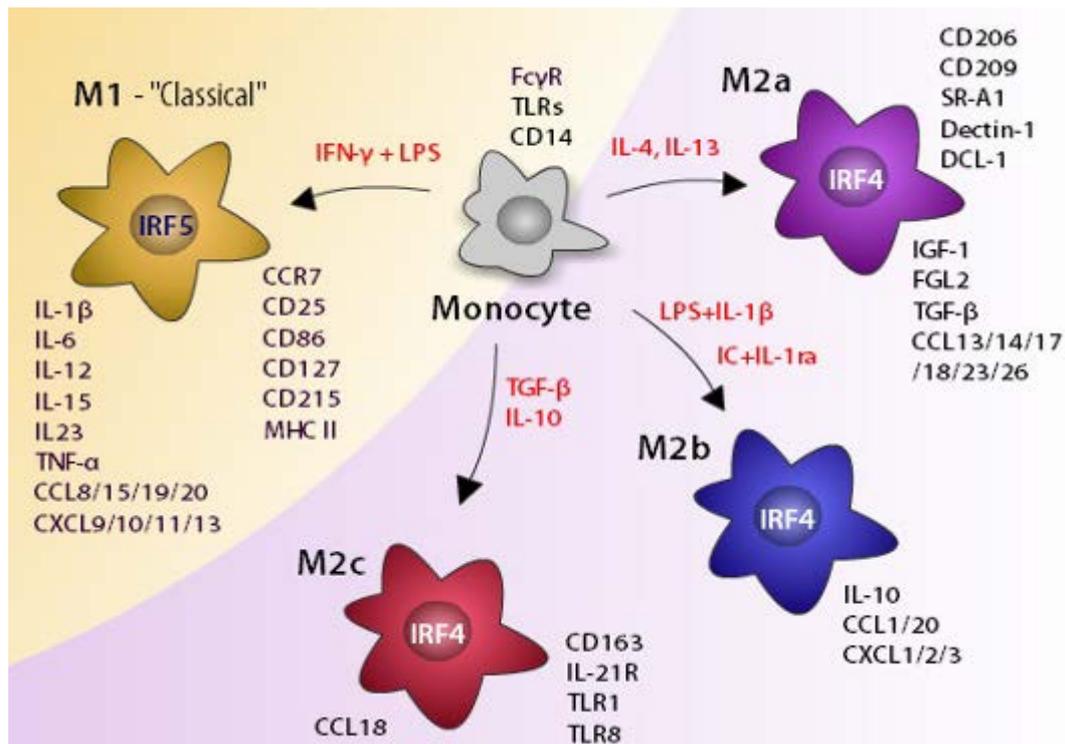


Abb. 1: Wie T-Helferzellen polarisieren sich Monozyten zu verschiedenen Makrophagen-Phänotypen mit typischen Oberflächenmolekülen und sezernierten Zytokinen. Der klassisch aktivierte M1-Phänotyp unterstützt pro-inflammatorische Th1-Antworten, wohingegen alternativ aktivierte M2-Makrophagen an anti-inflammatorischen Prozessen beteiligt sind. Auf Grund der unterschiedlichen Stimulationen und der folgenden Expression von Oberflächenmolekülen und Zytokinen werden M2-Makrophagen in die Subtypen M2a, b und c unterteilt. IRF5 und IRF4 sind typische Transkriptionsfaktoren der Typen.

Quelle Abb. 1: Biolegend, The path to legendary discovery – Macrophage polarization: M1 vs M2, <https://www.biolegend.com/NewsLegend/022311/index.htm> (Stand 01.02.2013, 15.00 Uhr)

B. *CC-Ligand 18*

I. Charakterisierung

CCL18 ist ein homöostatisches Chemokin, das vor allem in der Lunge in großen Mengen exprimiert wird (woher sich der frühere Name PARC – pulmonary and activation-regulated chemokine – ableitet). CCL18 zeigt seine chemoattraktive Wirkung hauptsächlich auf aktivierte T-Zellen und nicht-aktivierte Lymphozyten. Exprimiert wird CCL18 dabei insbesondere von M2-aktivierten Makrophagen (unter anderem von Alveolarmakrophagen AM (den ortsständigen Makrophagen der Lunge)) und von Monozyten des peripheren Blutes nach Beginn der Reifung.^{(Hieshima, Imai et al., 1997), (Rostène, Kitabgi et al., 2016)} Die Produktion von CCL18 durch unreife DC kann über eine Rekrutierung naiver T-Zellen Toleranz via IL-10-produzierender regulatorischer T-Zellen induzieren. Diese CCL18-Sekretion kann zusätzlich B-Zellen näher an potentielle Antigene führen und Th2-Zellen dazu bringen, B-Zellen zur Proliferation anzuregen, die sich zu Plasmazellen mit entsprechender Antikörperproduktion differenzieren.^(Stahl, Schupp et al., 2013) Nach Schutyser et al. könnte CCL18 auch als ein Lockstoff für DC, Lymphozyten und Monozyten in die Peripherie dienen, wo diese sich an Th1- oder Th2-vermittelten Immunantworten und in der Herstellung immunologischer Toleranz beteiligen, wie beispielsweise in der Bekämpfung von Infektionen, in der Heilung von Gewebedefekten und im Ausgleich überschießender Immunreaktionen.^(Stahl, Schupp et al., 2013)

Die Produktion von CCL18 ist ein typischer Marker für alternativ aktivierte Makrophagen^(Gustafsson, Mjösberg et al., 2008), wohingegen Monozyten, welche selbst mit CCL18 stimuliert wurden, morphologische Ähnlichkeiten zu IL-4 stimulierten M2-Makrophagen aufweisen.^(Schraufstatter, Zhao et al., 2012)

II. CCL18 bei pulmonalen und anderen Erkrankungen

Die Produktion von CCL18 ist mit vielen verschiedenen Erkrankungen und den damit verbunden Immunprozessen assoziiert.

So finden sich im Aszites bei Patientinnen mit Ovarialkarzinomen signifikant höhere Konzentrationen von CCL18 als in Aszites anderer Pathogenese, und es konnte außerdem die Expression von CCL18 in Tumor- infiltrierenden Zellen nachgewiesen werden, die eine Makrophagen-ähnliche Morphologie aufweisen.^(Schutyser, Struyf et al., 2002) Bei Magen-karzinomen

wird das CCL18 ebenfalls hauptsächlich von Tumor-assoziierten Makrophagen im Invasionsbereich des Tumors exprimiert.^(Leung, Yuen et al., 2004) Im Serum von Patienten mit Lungentumoren findet sich ein erhöhter CCL18 Spiegel. Dieser CCL18 Serumspiegel korreliert invers mit der Überlebenszeit der Patienten mit Adenokarzinom der Lunge.³ CCL18 ist also ein charakteristisches Zytokin von Tumor-assoziierten Makrophagen, welche typische M2-Makrophagen sind.

Daneben zeigt sich eine erhöhte Konzentration von CCL18 systemisch oder lokalisiert bei anderen Erkrankungen, wie z.B. bei akuter lymphatischer Leukämie der T-Zell-Reihe, bei Morbus Gaucher, bei septischer und rheumatischer Arthritis, chronischer Hepatitis C, bei der Riesenzellerarthritis und atopischer Dermatitis.^{(Struyf, Schutyser et al., 2003), (Boot, Verhoek et al., 2004), (Schutyser, Struyf et al., 2001), (Radstake, van der Voort et al., 2005), (Kusano, Tanaka et al., 2000), (Krupa, Dewan et al., 2002), (Goebeler, Trautmann et al., 2001)}

Eine erhöhte Expression von CCL18 wird also bei verschiedensten Erkrankungen gefunden, spielt aber auch bei unterschiedlichen pulmonalen Krankheiten eine wichtige Rolle, wie der exogen allergischen Alveolitis und Erkrankungen mit einem fibrotischen Umbau der Lunge, wie Pneumokoniosen, bei welchen es nach der Inhalation anorganischer (oder seltener organischer) Stäube zu einer chronischen Entzündungen kommt und bei der idiopathischen pulmonalen Fibrose IPF, sowie in geringem Maße bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung.^{(Pardo, Smith et al., 2001), (Sin, Miller et al., 2011), (Prasse, Pechkovsky et al., 2006)} CCL18 ist auch in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BALF) von an Asthma bronchiale Erkrankten deutlich erhöht.^(de Nadai, Charbonnier et al., 2006)

Die exogen allergische Alveolitis ist eine Erkrankung der Lunge, die durch die Inhalation von organischen Partikeln zu einer diffusen Entzündung mit starker Akkumulation von T-Lymphozyten (v.a. Th1) in den bronchoalveolären Strukturen führt. Diese Lymphozyten-Anhäufung ist wahrscheinlich auf die sehr starke Erhöhung der CCL18-Expression durch Makrophagen zurückzuführen, die sich v.a. in der subakuten Phase zeigt.^{(Pardo, Smith et al., 2001), (Schutyser, 2005)} Dabei scheint v.a. eine durch alveoläre M1-Makrophagen vermittelte TNF- α -Erhöhung eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Erkrankung zu spielen.^{(Denis, Cormier et al., 1991), (Dai, Guzman et al., 2005)} Auch bei der exogen allergischen Alveolitis zeigten sich in der BALF erhöhte CCL18-Werte.^(Cai, Bonella et al., 2013)

Beim allergischen Asthma zeigt sich eine Th2-Lymphozyten-gesteuerte Entzündung mit basophilen und eosinophilen Infiltraten. Die vermehrte CCL18-Produktion durch Makrophagen wird dabei durch spezifische Allergene unter Vermittlung von T-Lymphozyten

induziert. Dies wiederum führt zu einer vermehrten Rekrutierung von v.a. Th2 und Basophilen und führt so zu einer Amplifikation der Immunantwort. (de Nadai, Charbonnier et al., 2006)

Insbesondere bei der Lungenfibrose ist die spontane CCL18-Produktion in Zellen in der BALF erhöht. Die Produktion korreliert dabei negativ mit der Lungenfunktion und die Höhe der CCL18-Level im Serum haben sogar einen prädiktiven Wert bei Patienten mit IPF. Die verstärkte Synthese von CCL18 kann dabei in normalen Alveolarmakrophagen durch Th2-Zytokin-Stimulation (z.B. IL-4, IL-13, IL-10) oder die Ko-Kultivierung mit pulmonalen Fibroblasten hervorgerufen werden. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass es zu einer deutlich erhöhten Produktion von CCL18 in Th2-Zytokin-aktivierten Makrophagen kommt, wenn diese über β 2-Integrin-/ Scavenger-Rezeptoren mit Kollagen stimuliert werden. Seinerseits führt das durch die Alveolarmakrophagen von IPF-Patienten vermehrt synthetisierte CCL18 zu einer vermehrten Kollagen-Produktion durch normale pulmonale Fibroblasten sowie zu einer Infiltration des perivaskulären und peribronchialen Gewebes durch T-Lymphozyten. Die Infiltrate führten ebenfalls zur Akkumulation von Kollagen, einer lokal vermehrten Synthese von transforming growth factor- β (TGF- β) und einer gestörten alveolären Architektur. Es muss also davon ausgegangen werden, dass eine positive Rückkopplung zwischen Alveolarmakrophagen und Fibroblasten besteht, in der durch Alveolarmakrophagen produziertes CCL18 die Bildung von Kollagen induziert und dieses durch Fibroblasten synthetisierte Kollagen zur vermehrten Bildung von CCL18 durch Alveolarmakrophagen führt. (Stahl, Schupp et al., 2013), (Prasse, Pechkovsky et al., 2006), (Luzina, Papadimitriou et al., 2006), (Prasse, Probst et al., 2009)

C. Weitere relevante Zytokine

I. Interleukin-1 β

IL-1 β ist ein 17,5kDa großes Protein, welches zur Interleukin-1-Zytokin-Familie gehört. Es wird von aktivierten Makrophagen als Pro-IL-1 β synthetisiert, das nach proteolytischer Spaltung durch die Protease Caspase 1 in seine aktive, pro-inflammatorische Form überführt wird. (The National Center for Biotechnology Information, n.d.), (Lopez-Castejon & Brough, 2011)

Eine Entzündungsreaktion wird ausgelöst, wenn Immunzellen eine Infektion oder einen Gewebeschaden feststellen. An der Zelloberfläche und intrazellulär liegende pattern recognition receptors (PRRs) dienen der Überwachung, indem sie pathogen-associated

molecular patterns (PAMPs) wie fremde Lipoproteine, Kohlenhydrate u.ä. oder körpereigene damage-associated molecular patterns (DAMPs), die von geschädigten Zellen freigesetzt werden (z.B. Adenosintriphosphat ATP, IL-1 α , u.v.m.), erkennen. Dadurch kommt es zur Oligomerisierung mehrerer PRRs, die dann Signalkaskaden in Gang setzen. Dies führt zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie nuclear factor NF- κ B, cAMP response element binding protein CREB, Interferon regulatory factor IRF, CCAAT/enhancer binding proteins c/EBP. Die Induktion der Transkription von Genen für Enzyme, Chemokine, Cytokine, Adhäsionsmoleküle und Regulatoren der extrazellulären Matrix führt zur Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten, welche fremde Pathogene und Gewebetrümmer beseitigen sollen.^(Newton & Dixit, 2012) Ein besonders starker Stimulus zur Ausbildung von Pro-IL-1 β ist Lipopolysaccharid LPS der bakteriellen Zellwand. Nach der Synthese von Pro-IL-1 β ist allerdings ein zweiter Stimulus durch DAMPs (häufig ATP) oder PAMPs nötig, der die Prozessierung zu reifem IL-1 β beschleunigt. Ein Subtyp der PRRs führt über die Ausbildung des Multiprotein-Komplexes Inflammasom zur Aktivierung der Caspase 1, die dann das Pro-IL-1 β zu reifem IL-1 β spaltet.^(Lopez-Castejon & Brough, 2011)

IL-1 β ist ein sehr wichtiger Mediator von Entzündungsreaktionen und ist an vielen Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt. Die Bindung von IL-1 β an den IL-1-Rezeptor (IL-1-R I) Typ I führt zur Bildung von anti-apoptotischen und anti-proliferativen second messengern, was wiederum die Bildung von Mediatoren (z.B. IFN- β , IL-1 β , TNF), Zell-Adhäsionsmolekülen der Selektin-Familie und Tumornekrosefaktor (TNF) induziert.^(Hayden & Ghosh, 2012) Der IL-1-R Typ II dient dabei nur einer Abschwächung des biologischen Signals von IL-1-R I als negativer Regulator.^(Sims, Giri et al., 1994) Insbesondere ist IL-1 β also an der Aufrechterhaltung und Verstärkung der Entzündungsreaktion beteiligt.^(Newton & Dixit, 2012)

II. Interleukin-1 Rezeptorantagonist

IL-1Ra gehört ebenfalls zur IL-1-Zytokin-Familie, bindet ohne biologische Aktivität an die gleichen Rezeptoren wie IL-1 β , mit dem es um die Bindung konkurriert und ist damit der erste beschriebene natürlich vorkommende spezifische Rezeptorantagonist. Dieser Mediator inhibiert somit die Aktivität von IL-1 β (und auch von IL-1 α) und moduliert daher die verbundenen Immun- und Entzündungsreaktionen. Es wird von verschiedenen Zelltypen in zwei unterschiedliche großen Isoformen (eine sekretorische Form, die andere intrazellulär, welche durch alternatives Spleißen entstehen) gebildet, u.a. von Makrophagen, Natural Killer-

Zellen (NK-Zellen), epithelialen Zellen, Hepatozyten und Adipozyten.^(Arend, Malyak et al., 1998) IL-1RA scheint dabei die Funktion eines Akut-Phase-Proteins wahrzunehmen mit erhöhten Spiegeln unter anderem bei rheumatischen Erkrankungen wie juveniler chronischer Arthritis und dem systemischen Lupus erythematoses, bei Infektionen, z.B. bei Sepsis, bei chronischen Entzündungen wie z.B. in BALF bei idiopathischer Lungenfibrose und bei Fiebern unklarer Ursache. Die Produktion von IL-1Ra wird durch adhärentes IgG, verschiedene Zytokine wie IL-4 oder GM-CSF und bakterielle und virale Bestandteile, beispielsweise LPS, stimuliert. Rekombinanter IL-1Ra wird in der Therapie der rheumatoiden Arthritis eingesetzt.^{(Arend, Malyak et al., 1998), (Arend, 2002)}

III. Tumornekrosefaktor-alpha

TNF- α ist ein Signalstoff, welcher an systemischen und lokalen Entzündungen beteiligt ist und die Akut-Phase-Reaktion stimuliert. Es wird hauptsächlich von M1-Makrophagen, aber auch von T-Helferzellen, NK-Zellen, Mastzellen, Endothelzellen und vielen weiteren Zelltypen synthetisiert.^(Hehlhans & Pfeffer, 2005)

TNF- α kann an zwei unterschiedliche Rezeptoren binden: TNF-R1 (CD120a), welcher in vielen Geweben vorhanden ist, und TNF-R2 (CD120b), der nur auf Immunzellen vorkommt. Nach der Aktivierung des Rezeptors kommt es zur Aktivierung entweder proliferativer, pro-inflammatorischer und anti-apoptotischer Transkriptionsfaktoren oder solcher Transkriptionsfaktoren, welche eher eine Differenzierung oder Apoptose bewirken, oder über Proteasen zur Autolyse.^{(Wajant, Pfizenmaier et al., 2003), (Chen, 2002), (Gaur & Aggarwal, 2003)}

Die physiologischen Wirkungen von TNF- α sind ebenso vielfältig wie die Signalkaskaden. So bewirkt TNF- α die Ausschüttung von Corticotropin releasing hormone CRH; in der Leber wird eine Akut-Phase-Reaktion stimuliert und die Produktion von C-reaktivem Protein CRP und anderen Mediatoren gesteigert; es ist ein Chemoattractant für Leukozyten und erhöht die Expression von Adhäsionsmolekülen im Rahmen ihrer Migration; es stimuliert die Phagozytosefähigkeit von Makrophagen und erhöht deren Synthese von IL-1 β und PGE2. TNF- α ist also ein potentes endogenes Pyrogen, das Fieber und Kachexie hervorrufen kann, Entzündung und Sepsis induziert und die Tumorgenese inhibiert.^(Hehlhans & Pfeffer, 2005)

D. Adenosintriphosphat

I. Charakterisierung

Adenosintriphosphat (ATP) ist ein Nukleotid bestehend aus Adenosin (welches aus einem Adeninrest und dem Zucker Ribose gebildet wird) und drei Phosphatgruppen. Es ist hauptsächlich der universelle zelluläre Energieträger und reguliert zugleich die wichtigsten Prozesse, die mit einer Bereitstellung von Energie einhergehen. Es ist gleichsam das Endprodukt vieler Stoffwechselwege, wie der β -Oxidation von Fettsäuren und der Glykolyse von Zucker, welche über den Citratcyclus und die Atmungskette zur Synthese von ATP führen. (Rassow, Deutzmann et al., 2006)

Die Bindung der Phosphatgruppen zum Adenosin ist sehr energiereich, sodass bei der hydrolytischen Spaltung zu Adenosindiphosphat (ADP) und inorganischem Phosphat (Pi) und der weiteren Hydrolyse zu Adenosinmonophosphat (AMP) und Pi Energie frei wird, welche dazu genutzt werden kann, Arbeit zu verrichten. Pro gespaltener Bindung beträgt dabei die freigewordene Energie ca. 30,5 kJ/mol, welche als Grundlage für alle energieverbrauchenden Prozesse genutzt werden kann, von Bewegungen, wie z.B. der Muskelkontraktion oder Zellteilung, über die Synthese organischer Moleküle, wie z.B. der Bildung der Aminoacyl-tRNA in der Translation der Proteinbiosynthese, bis hin zur Aufrechterhaltung chemischer Konzentrationsgradienten bzw. dem aktiven Stofftransport, z.B. der Na^+/K^+ -ATPase am Myokard. Das Verhältnis zwischen ATP und AMP dient der Zelle dazu festzustellen, wie viele Energieträger vorhanden sind und um Stoffwechselwege, die ATP produzieren oder verbrauchen, zu regulieren. (Hardie & Hawley, 2001) Trotz der vielfältigen Aufgaben und des hohen Verbrauchs beträgt das gesamte Gewicht von ATP im menschlichen Körper nur 50-250g, was die Bedeutung der ständigen Resynthese verdeutlicht, sodass an jedem Tag das Äquivalent des Körpergewichts an ATP umgesetzt wird. (Rassow, Deutzmann et al., 2006), (University of Leeds, n.d.), (Törnroth-Horsefield, Neutze, 2008)

II. ATP als Messenger-Molekül, seine Rezeptoren und seine Rolle im Immunsystem

ATP kann als Signalmolekül sowohl intrazellulär als auch extrazellulär wirken. Im Bereich der intrazellulären Signalübertragung dient ATP als Substrat von Kinasen, welche als Enzyme Phosphatgruppen des ATP auf andere Moleküle übertragen und damit eine wichtige

Rolle in der Regulation von Stoffwechselprozessen spielen. Wichtige Schlüsselenzyme sind dabei unter anderem die cyclisches AMP (cAMP)-abhängigen Proteinkinasen (PK) A, Calcium-abhängige PK C und Calmodulin-abhängige Kinasen CaMK. Die Kinase-Aktivität auf Substrate wie Proteine oder Lipide der Zellmembran sind dabei eine wichtige Form der Signaltransduktion. Zudem wird ATP durch die Adenylatcyclase zur Produktion des second messengers cAMP verwendet, welches unter anderem an der Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern beteiligt ist. (Kamenetsky, Middelhaufe et al., 2006)

Außerhalb der Zelle ist ATP (ebenso wie ADP, AMP und Adenosin) ein Agonist an purinergen Rezeptoren. Die Konzentration extrazellulären ATPs (eATP) wird durch Ectonucleotidasen wie CD39 und CD73, die ATP zu ADP, AMP und als Endprodukt Adenosin dephosphorylieren, eng reguliert, sodass die Konzentration von eATP konstant um 10nM liegt. (Zeiser, Penack et al., 2011), (Zimmermann, 2000) Durch das verbreitete Vorkommen der purinergen Rezeptoren beispielsweise im peripheren und zentralen Nervensystem, auf Immunzellen, im Gastrointestinaltrakt, in Herz-, Skelett- und glatter Muskulatur, in Gefäßen und vielen weiteren Geweben ergeben sich pleiotrope Effekte dieser Rezeptor-Agonisten. Die Purinozeptoren werden in metabotrope (d.h. G-Protein-gekoppelte (GPCR)) P2Y-Rezeptoren und in ionotrope (d.h. als Ionenkanal fungierende) P2X-Rezeptoren unterteilt. Die Wirkungsstärke der Agonisten auf diese Rezeptoren lässt sich dabei absteigend in der folgenden Reihenfolge angeben: ATP > ADP > AMP > Adenosin.

Wie alle GPCR bestehen die P2Y-Rezeptoren aus sieben transmembranen Helices, die durch Schleifen verbunden sind, wobei zwei der extrazellulären Schleifen durch hochkonservierte Cystein-Reste gekennzeichnet sind, welche Disulfidbrücken bilden und so die Struktur stabilisieren. (Gever, Cockayne et al., 2006), (Ferrari, Chiozzi et al., 1997) P2Y-Rezeptoren sind hauptsächlich an der Modulation intrazellulärer Calcium-Spiegel und seltener auch an der Regulation von cAMP-Spiegeln beteiligt. Bislang konnten zwölf Rezeptoren dieser Familie geklont werden, von denen einige nur eine sehr schwache Homologie aufweisen. Neben den oben erwähnten Nukleotiden können diese Rezeptoren auch durch Uridintriphosphat UTP, Uridindiphosphat UDP und UDP-Glucose aktiviert werden. (Abbracchio, Burnstock et al., 2006), (Khakh, Burnstock et al., 2001) Nach der Bindung eines Liganden an die GPCR kommt es zu einer Konformationsänderung, welche zu einer Aktivierung des G-Proteins (im inaktiven Zustand aufgebaut als Trimer aus α -, β -, γ -Untereinheit) führt. Das G-Protein löst sich dabei nach dem Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) an der α -Untereinheit durch Guanosintriphosphat (GTP) vom Rezeptor und die Untereinheiten des Trimers dissoziieren voneinander. Der Rezeptor kann daraufhin wieder in einen inaktiven Zustand zurückkehren oder weitere G-

Proteine aktivieren. Das aktivierte G-Protein besteht dann aus einem $G\alpha$ -GTP-Monomer und einem $G\beta\gamma$ -Dimer, welche daraufhin die Aktivität intrazellulärer Proteine modulieren können. Nach der Hydrolyse von GTP zu GDP durch die α -Untereinheit kommt es zu ihrer Inaktivierung und der Reassoziaton der Untereinheiten zum inaktiven Trimer. Die weitere Signaltransduktion eines aktivierten G-Proteins ist abhängig vom jeweiligen Typ; so aktiviert ein G_s -Protein die Adenylatcyclase, ein G_i -Protein inaktiviert die Adenylatcyclase und G_q -Proteine aktivieren die Phospholipase C. (Schmidt, Lang et al., 2005), (Rassow, Deutzmann, et al., 2006)

Inhibitoren von P2Y-Rezeptoren haben eine herausragende klinische Bedeutung beispielsweise im Sinne einer Thrombozytenaggregationshemmung via P2Y₁₂-Rezeptor (Clopidogrel, Prasugrel, Ticagrelor) bei der Therapie des Myokardinfarktes.

Die Subgruppe der P2X-Rezeptoren besteht aus sieben Mitgliedern (P2X₁ bis P2X₇), und bildet sog. Liganden-gesteuerte Calcium-Kanäle. Diese Rezeptoren zeigen alle einen ähnlichen Aufbau mit jeweils zwei transmembran Domänen TM1 und TM2, einer großen extra-zellulären Schleife und intrazellulären N- bzw. C-terminalen Enden. Mit Ausnahme der P2X₆-Untereinheit können alle anderen Untereinheiten homologe Rezeptoren aus zwei identischen Untereinheiten sowie heterologe Rezeptoren aus zwei verschiedenen Untereinheiten bilden; die P2X₆-Untereinheit ist nicht in der Lage einen funktionsfähigen homologen Rezeptor zu bilden, kann aber mit anderen Untereinheiten einen heterologen Rezeptor bilden. (Gever, Cockayne et al., 2006), (Abbracchio, Burnstock, et al., 2006), (Khakh, Burnstock et al., 2001) Nach der Bindung von ATP an die extrazelluläre Schleife kommt es zu einer Konformationsänderung mit Ausbildung einer Ionen-permeablen Pore. Daraufhin können Kationen wie Natrium und v.a. Calcium in die Zelle strömen und so eine Depolarisation der Zellmembran hervorrufen sowie calciumsensitive intrazelluläre Prozesse aktivieren. Die Öffnungszeiten des Kanals sind dabei stark von der Zusammensetzung aus den verschiedenen Untereinheiten abhängig. Die Sensitivität der Rezeptoren gegenüber Agonisten kann durch die Anwesenheit von Schwermetallen oder durch eine Änderung des extrazellulären pH stark verändert werden. Unterschiedliche Untereinheiten zeigen zudem eine unterschiedliche Affinität zu purinergen Agonisten wie ATP, ADP oder Dibenzoyl-ATP (BzATP) und zu Antagonisten wie Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure (PPADS), Suramin oder 1-[N,O-bis(5-isoquinolinsulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazin (KN-62). (Gever, Cockayne et al., 2006)

Die dritte Gruppe der purinergen Rezeptoren, die P1-Rezeptoren, werden dagegen hauptsächlich durch Adenosin aktiviert; ADP, AMP und v.a. ATP sind dort nur schwache Agonisten. Hier gibt es die Subtypen A1, A2A, A2B und A3, welche alle metabotrope GPCR sind. Alle Adenosinrezeptoren führen zu einer Aktivierung von mitogen-activated protein

(MAP)-Kinasen, welche an der Steuerung von Zellantworten auf eine ganze Reihe von Stimuli wie beispielsweise proinflammatorische Zytokine, aber auch Mitogene, osmotischen oder thermischen Stress, beteiligt sind. Die Wirkung von Adenosin ist dabei oft entweder antagonistisch oder synergistisch zu der Wirkung von ATP.^(Abbraccio, Burnstock, et al., 2006)

Bei Zellen aus der Reihe der Monozyten/ Makrophagen sind die P2Y-Rezeptoren der überwiegende Subtyp. So findet man P2Y₁-, P2Y₄-, P2Y₁₁- und P2Y₁₂-Rezeptoren vor allem auf Alveolarmakrophagen exprimiert und die Rezeptoren P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ vorwiegend bei Monozyten.^(North, 2002) In Bezug auf liganden-gesteuerte Ionenkanäle ist der Rezeptor P2X₇ der wichtigste Subtyp in Makrophagen und Monozyten, neben P2X₁ und P2X₄.^(Myrtek, Muller et al., 2008)

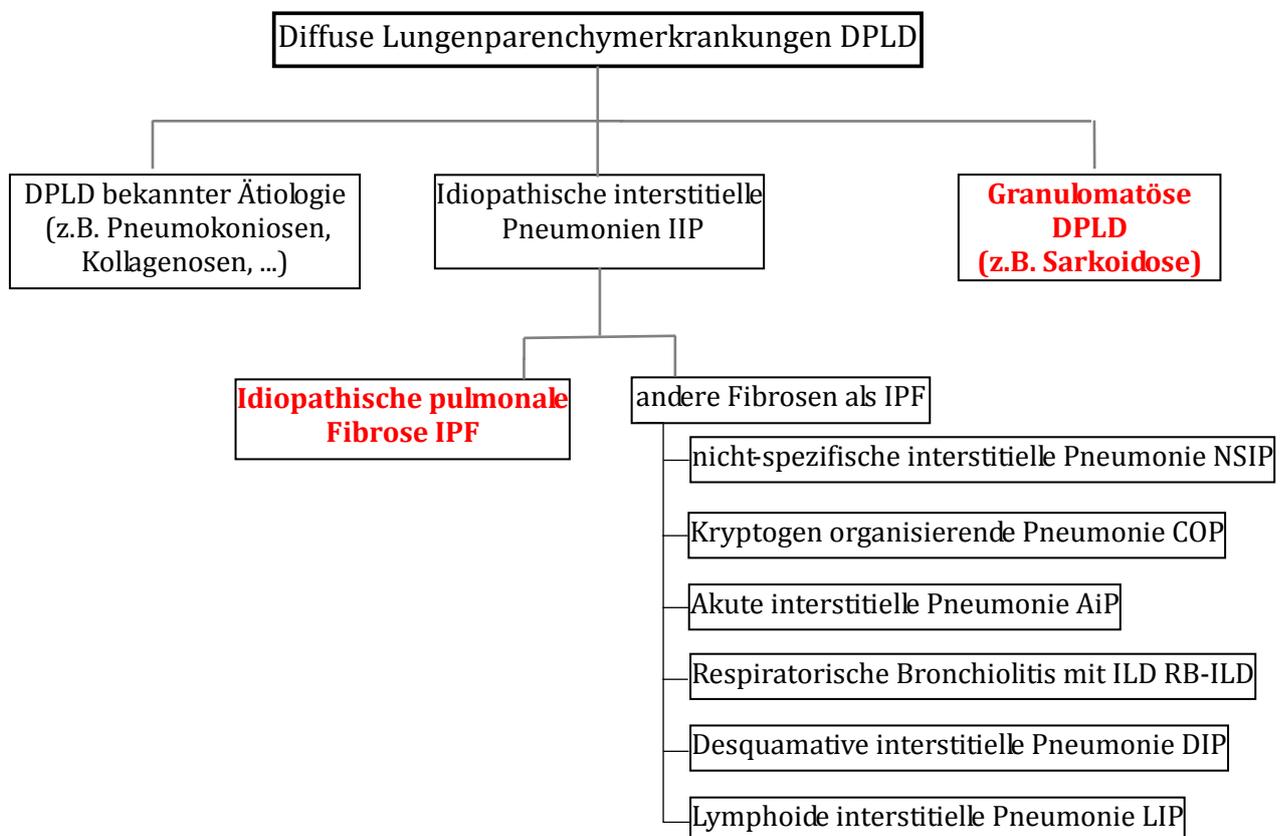
ATP spielt auch in der Signaltransduktion des Immunsystems eine wichtige Rolle. Primär ist eine Erhöhung des extrazellulären ATP-Spiegels über die physiologischen Grenzen ein „danger signal“, also Folge einer Freisetzung durch Gewebe, welches Bedingungen wie Hypoxie, Ischämie, Entzündungen oder mechanischem Stress ausgesetzt ist, Schädigungen aufweist oder bei dem im Rahmen eines pathologischen Prozesses Zellverbände untergehen.^{(Gallucci & Matzinger, 2001), (Van Furth, 1982)}

Der bei monozytären Zellen beschriebene Rezeptor P2X₇ wirkt bei der Prozessierung und Freisetzung des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 β mit^(Ferrari, Chiozzi et al., 1997) und erfüllt weitere Aufgaben, unter anderem in der Erregerabwehr^(Shemon, Sluyter et al., 2006), sowie bei der Modulation von Autoimmunerkrankungen^(Labasi, Petrushova et al., 2002) und generell in einer Schlüsselrolle bei der Signaltransduktion, Porenbildung und Produktion von Zytokinen in Monozyten.^(Aga, Johnson et al., 2002) Zudem führt eine längere Aktivierung des P2X₇-R zu der Ausbildung einer unselektiven Pore, die einen bidirektionalen Durchtritt kleinerer Moleküle ermöglicht, welcher dann zu einer Leckage von Metaboliten (Pseudoapoptose) und letztendlich über Ausbildung großer Ionenströme und zur Apoptose führt.^(Dubyak & El-Moatassim, 1993) Ein weiterer Signalweg des P2X₇-R ist die Stimulation von verschiedenen MAP-Kinasen, welche auch in der Reaktion auf inflammatorische Stimuli und dem Umbau von Geweben eine bedeutende Rolle spielen^(Garrington & Johnson, 1999) sowie der Translokation des Transkriptionsfaktors nuclear factor NF- κ B und nuclear factor of activated T-cells NF-AT in Mikroglia, den Immunzellen des zentralen Nervensystems.^(Ferrari, Stroh et al., 1999) NF- κ B verstärkt dann die Transkription verschiedener Ziel-Gene, was zur Synthese von Produkten wie der Cyclooxygenase-2 (COX-2) oder IL-6 führt.^(Rivest, Lacroix et al., 2000) Auf der einen Seite kann über den P2X₇-Rezeptor ruhendes mitochondriales Potential, mitochondriales Calcium und der intrazelluläre ATP-Gehalt erhöht werden und der Rezeptor so zur Proliferation beitragen

(physiologisch durch auto-/parakrine Sekretion von ATP). Auf der anderen Seite führt eine starke Stimulation des P2X₇ zu einem Überfluss des basalen mitochondrialen Calciums, zu einem Kollaps des Potentials der Mitochondrien und letztendlich zu der Fragmentation der Mitochondrien (pathologischer Weg durch Gewebeschädigung).^(Adinolfi, Callegari et al., 2005) Es wird angenommen, das P2X₇ als „danger sensor“ für hohe Dosen ATP aus geschädigten Zellen bei Entzündungsreaktionen dient.^(Gallucci & Matzinger, 2001)

E. Interstitielle Lungenerkrankungen

Lungenfibrosen sind der Endpunkt verschiedener Erkrankungen, die mit einem fibrotischen Umbau des Interstitiums und der Alveolen und damit einer „Vernarbung“ der Lunge einhergehen. Dabei kann die Erkrankung in eine primäre Form und sekundäre Fibrosen unterteilt werden, die im Rahmen anderer Erkrankungen entstehen. Die Krankheitsbilder, die zur Lungenfibrose führen, werden unter dem Begriff interstitielle Lungenerkrankungen ILD oder diffuse parenchymatöse Lungenerkrankung DPLD zusammengefasst. Die Klassifikation erfolgt meist nach der Ursache, wobei über 200 Auslöser bekannt sind.



Die Pathogenese vieler interstitieller Lungenerkrankungen ist noch ungeklärt und Gegenstand momentaner Forschung. Neben dem Interstitium sind auch die Alveolarsepten und die Alveolarlumina von den fibrotischen Umbauprozessen betroffen. Im gemeinsamen Endpunkt der Lungenfibrose zeigt sich das Bild einer Destruktion der alveolokapillären Funktionseinheiten und Ersatz derselben durch Bindegewebe. Die Schädigung kann dabei toxisch, infektiös oder immunologisch bedingt sein und die Noxe inhalativ oder systemisch auf hämatogenem Wege in die Lunge gelangen.

Alle diese Erkrankungen gelten als seltene Erkrankungen (weniger als 50 Patienten/100.000 Einwohner), am häufigsten findet man im klinischen Alltag die Sarkoidose, die idiopathische Lungenfibrose (IPF) und die exogen-allergische Alveolitis.

In der klinischen Untersuchung zeigen sich v.a. Dyspnoe und ein lange bestehender trockener Husten; seltener fallen auch Hämoptysen, unklares Fieber, Gelenkschwellungen und Arthralgien, Trommelschlegelfinger und Uhrglasnägel und in der Auskultation ein Giemen oder bilaterales basales Knisterrasseln auf. Bei Patienten mit ILD besteht ein 10-fach höheres Risiko für das Auftreten eines Lungenkarzinomes. (Gillies, 2010), (Costabel & Guzman, 2003), (Demedts & Costabel, 2002)

F. Idiopathische Lungenfibrose

I. Definition

Die idiopathische Lungenfibrose IPF ist eine Sonderform der chronisch-fibrosierenden interstitiellen Pneumonie mit unklarer Ätiologie. Die Erkrankung ist auf die Lunge begrenzt und zeigt das histologische Bild einer usual interstitial pneumonia UIP. (Pardo & Selman, 2002a) Das durchschnittliche Patientenalter bei Diagnosestellung liegt bei 66 Jahren. Die Prävalenz der IPF liegt bei 20,2/100.000 Personen für Männer und 13,2/100.000 Personen bei Frauen. Die Inzidenz stieg in den letzten 40 Jahren um 35% und wird mit 7,44-10,7 Fälle/100.000 Personen/Jahr angegeben, die Mortalitätsrate liegt bei 5,1 Fällen/100.000 Personenjahre (auch hier war eine deutliche Zunahme in den letzten Jahrzehnten zu verzeichnen). (Navaratnam, Fleming et al., 2011), (Coultas, Zumwalt et al., 1994)

Die Prognose der IPF ist schlecht; so beträgt das mittlere Überleben ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung 2,8-3 Jahre und die Mortalität 70-90%. Negative prognostische Faktoren sind unter anderem männliches Geschlecht, höheres Lebensalter, starke Belastungsdyspnoe,

starke Einschränkung in der Lungenfunktionsdiagnostik, ausgeprägte Neutrophilie/Eosinophilie in der BAL, hoher Anteil an retikulären Verdichtungen und Honigwabemustern in der High Resolution-Computertomographie, fehlendes Ansprechen auf Corticosteroide und an hoher Anteil an fibroblastären Foci.^(Costabel & Guzman, 2003)

II. Pathogenese und alternative Immunantwort

Die IPF zeichnet sich primär durch Fibroblastenproliferation und Umbau der extrazellulären Matrix aus, was zur irreversiblen Zerstörung der Lungenarchitektur führt. Es zeigt sich ein heterogenes Bild wenig oder gar nicht betroffener Areale, welche direkt an Gebiete angrenzen, die alveolare Epithelzellschäden und -hyperplasien aufweisen. Charakteristisch ist die Ausbildung von multiplen, v.a. subpleuralen fibroblastären Herden; an diesen Foci, die wahrscheinlich das Korrelat der vorausgegangenen Schädigung darstellen, findet offenbar die aktive Kollagensynthese durch hochproliferative Myofibroblasten statt. Neben den fibroblastären Foci sind verdickte Septen und die zystische Honigwabengunge charakteristisch. Der primäre Auslöser scheint eine Epithelschädigung mit einer Störung der normalen Wundheilung zu sein, in deren Folge das physiologische Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau von Kollagen, einhergehend mit der erhöhten Anwesenheit von pro-fibrotischen Wachstumsfaktoren und der folgenden Anhäufung von Kollagen, gestört ist.^{(Antoniades, Bravo et al., 1990), (Kapanci, Desmouliere et al., 1995), (Pan, Yamauchi et al., 2001), (Wallace & Howie, 1999), (Pardo & Selman, 2002a), (Pardo & Selman, 2002b)} Die überschießende Wundheilung und Fibrose kann entweder auf eine Schädigung, bei der eine Restitutio nicht mit normalen Mechanismen zu erreichen ist, auf das Persistieren der Noxe oder auf einen genetischen Defekt zurückgeführt werden. Nach und nach führt die Summe der kleineren Schädigungen zur Fibrose des Areals und dem Remodeling mit Veränderungen der Homöostase der epithelial-mesenchymalen Einheit größerer Gebiete. Das Auftreten entzündlicher Veränderungen ist vermutlich ein sekundäres Geschehen. Die Entzündungsreaktion zeigt sich v.a. durch interstitielle Lymphozyten und Plasmazellen sowie intraalveoläre Makrophagen.^{(Antoniades, Bravo et al., 1990), (Kapanci, Desmouliere et al., 1995), (Pan, Yamauchi et al., 2001), (Wallace & Howie, 1999), (Pardo & Selman, 2002a), (Pardo & Selman, 2002b)} V.a. durch diese Immunzellen und die Pneumozyten werden in der Folge pro-fibrotische Zytokine gebildet, die den Prozess unterhalten.^(Fernandez & Eickelberg, 2012) Dabei ist die Expression und Produktion von CCL18 durch die Alveolarmakrophagen erhöht, welche sich vermutlich nach Aktivierung durch IL-4 und IL-13 als alternativ aktivierte Makrophagen präsentieren.^(Jakubzick, Choi et al., 2003) Dabei führt der Kontakt von Fibroblasten mit Kollagen zu einer Erhöhung der CCL18-

Freisetzung durch Alveolarmakrophagen; durch den alternativ aktivierten Phänotyp der Makrophagen mit hoher CCL18-Produktion wird seinerseits die Synthese von Kollagen durch die Fibroblasten gefördert, sodass diese positive Rückkopplung für das Fortschreiten der Fibrose verantwortlich ist.

Proliferierende und migrierende Myofibroblasten spielen eine große Rolle bei der IPF, da sie zur vermehrten Ablagerung von Extrazellulärmatrix führen. Sie zeigen bei der IPF im Vergleich zu gesunden Normalpersonen ein aggressiveres Migrations- und Invasionsverhalten.^(Li, Jiang et al., 2011) Neben den durch epithelial-mesenchymale Transformation entstehenden Fibroblasten dienen Perizyten^(Rock, Barkauskas et al., 2011) und Mesothelzellen^(Mubarak, Montes-Worboys et al., 2012) (was auch die häufige subpleurale Lage der Foci erklärt) als Quelle aktivierter Myofibroblasten.

Es hat sich gezeigt, dass die Foci zwar die Frontlinien der Fibrose darstellen, diese Foci aber über ein retikuläres Netz verbunden sind, das sich von der Pleura nach innen zieht, sodass ein fokales Geschehen unwahrscheinlich ist. Außerdem scheint sich eine diffuse Schädigung der Lunge in den subpleural gelegenen Foci auszuwirken; dies geschieht vor allem bei Patienten, die eine noch unbekannte Empfänglichkeit aufweisen, (eingeschränkte Fähigkeit zur Reexpansion oder Reparatur nach der Schädigung).^{(Kuhn & McDonald, 1991), (King, Schwarz et al., 2001), (Cool, Groshong et al., 2006), (Souza, Müller et al., 2005), (Katzenstein & Myers, 1998)}

Es besteht eine deutliche Assoziation zwischen dem Auftreten der IPF und dem Konsum von Zigaretten als eine typische Noxe, obwohl ein Drittel der Patienten mit IPF Nicht-Raucher sind und die Zusammenhänge wie z.B. das Auftreten bei Ex-Rauchern nicht abschließend geklärt sind.^{(Baumgartner, Samet et al., 1997), (Steele, Speer et al., 2005), (Selman, 2003), (Fraig, Shreesha et al., 2002)} Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die CCL18-Produktion in BAL-Zellen bei Rauchern vermindert war, was nach Meinung der Autoren auf eine chronische LPS-Exposition und ein einzigartiges Aktivierungsmuster der Makrophagen durch Zigarettenrauch zurückzuführen sei.^(Kollert, Probst et al., 2009) Daneben spielen auch Alterungsprozesse^(Faner, Rojas et al., 2012), Virusinfektionen^(Lasithiotaki, Antoniou et al., 2011) und gastro-ösophagealer Reflux^(Raghu, Freudenberger et al., 2006) als auslösende Schädigungsmechanismen eine Rolle.

Die durch Fibroblasten, natives Kollagen und Th2-Zytokin-Stimulation aktivierten alveolären und interstitiellen M2-Makrophagen sind dabei für eine bis zu 10-100-fach erhöhte Produktion von CCL18 bei der IPF verantwortlich (sowohl durch eine prozentuale Steigerung des Anteils von CCL18-produzierenden Makrophagen, als auch durch eine erhöhte CCL18-Produktion durch individuelle Makrophagen).^(Prasse, Pechkovsky et al., 2006)

Es ist also wahrscheinlich, dass die Erkrankung bei Patienten auftritt, die einer Vielzahl verschiedener Schädigungen wie subklinischen Aspirationen, Virusinfektionen, Staub- oder Medikamentenexposition ausgesetzt sind und die eine genetische Vulnerabilität mit gestörten Reparaturmechanismen aufweisen. Für diese Annahme sprechen würde der oft stufenweise Verlauf der Erkrankung und das häufige Auftreten bei Ex-Rauchern. (Cottin, 2006), (Hunninghake & Schwarz, 2007)

Das Vorhandensein pro-fibrotischer Faktoren kann als Ausdruck des fibrotischen Prozesses angesehen werden, oder selbst Ursache der progredienten Vernarbung sein oder beides als Bestandteil einer sich selbst erhaltenden positiven Rückkopplung (s.u.). (Li, Li et al., 2011), (Khalil, O'Connor et al., 1991), (Keane, Strieter et al., 2005) TGF- β als wichtigster dieser Zytokine löst dabei unter anderem eine epithelial-mesenchymale Transformation der Pneumozyten aus. (Kim, Kugler et al., 2006) Daneben spielt unter anderem auch CCL18 eine bedeutende Rolle in diesem Umbau, da es im Rahmen eines „circulus vitiosus“ zwischen alveolären M2-Makrophagen und Kollagen-produzierenden Fibroblasten die fibrotische Umwandlung fördert. Die erhöhte Produktion von CCL18 bei der IPF ist ein Hinweis auf das Ungleichgewicht in der Regulation zwischen Th1- und Th2-Zytokinen in der IPF, vor allem sind die M2-Chemokine (insbesondere CCL18) im Rahmen einer akuten Exazerbation der IPF deutlich erhöht. (Prasse, Pechkovsky et al., 2006)

In der fibrotisch veränderten Lunge dominiert ein Th2-Zytokin-Milieu, charakterisiert durch die vermehrte Produktion von IL-4, IL-10 und IL-13. Dabei sind AM bei der Produktion der pro-fibrotischen Zytokine wesentlich beteiligt. (Wynn, 2004), (Wallace, Ramage et al., 1995), (Martinez, King et al., 1997), (Hancock, Armstrong et al., 1998), (Nagaoka, Trapnell et al., 1990) Diese M2-Makrophagen sind an Wundheilungs- und fibrotischen Prozessen beteiligt. (Shearer, Richards et al., 1997) Dabei besteht eine Assoziation zwischen dem M2-typischen Expressionsmuster der AM und der IPF mit einer erhöhten Expression von CCL18. (Pechkovsky, Prasse et al., 2010), (Prasse, Pechkovsky et al., 2007) Es scheint außerdem ein feedback-Mechanismus zwischen Fibroblasten und Alveolarmakrophagen zu existieren, aufgrund dessen die erhöhte CCL18-Produktion durch die Makrophagen zu einer vermehrten Produktion von Kollagen durch Fibroblasten führt. Dieses neu synthetisierte Kollagen oder dessen Bruchstücke steigern wiederum die CCL18-Synthese. (Stahl, Schupp et al., 2013) Dadurch würde sich durch das vorherrschende Th2-Zytokin-Milieu ein Teufelskreis mit Aufrechterhaltung des fibrotischen Prozesses ergeben. (Prasse, Pechkovsky et al., 2006)

Die interstitiellen und intraalveolaren Makrophagen, welche die fibroblastäre Foci umgeben, produzieren dabei CCL18. In Endothelzellen, bronchialen Zellen, fibroblastären

Foci und der Zelllinie A 549 hingegen wurde weder CCL18-mRNA noch -Protein gefunden. Daher sind Alveolarmakrophagen die Hauptquelle von CCL18 in der fibrotischen Lunge. Die CCL18- und IL-1Ra-Produktion sind also Marker für alternativ aktivierte Makrophagen im Rahmen der IPF. (Prasse, Pechkovsky et al., 2006)

Die erhöhte Synthese von CCL18 durch Th2-Zytokine durch Alveolarmakrophagen betreffend zeigte sich ein synergistischer Effekt durch die Anwesenheit von Fibroblasten. Diese Beobachtung ist wahrscheinlich nicht auf eine Membran-abhängige Rezeptor-Interaktion zurückzuführen, sondern das Resultat löslicher Mediatoren. Zudem erhöht der Kontakt von AM über Scavenger-Rezeptoren und β_2 -Integrin mit Kollagen (produziert durch die pulmonalen Fibroblasten) die Synthese von CCL18 (insbesondere in Kombination mit IL-4 und IL-10; hier lässt sich eine Synergie beobachten, wodurch sich erklären ließe, dass auch eine geringe T-Zell-Inflammation weitreichende Folgen auf die Fibrogenese haben könnte). Die Produktion von Kollagen Typ I durch die Fibroblasten wiederum wird durch lösliche Mediatoren der AM gesteigert. Insbesondere konnte dieser Effekt durch CCL18 nachgewiesen werden. (Prasse, Pechkovsky et al., 2006) Die Pathogenese der IPF betreffend gibt es Hinweise, dass die epithelial-mesenchymale Transformation (EMT) von Alveolarepithelzellen als Reaktion auf Stress (neben der Proliferation von vorhandenen Fibroblasten und neben der Transition von Vorgängerzellen aus Knochenmark und Peripherie) eine Rolle in der Fibroblasten-Akkumulation und folgenden Kollagenbildung spielen könnte. Ursächlich könnten Stressoren (unter anderem Zigarettenrauch, Strahlung und diverse exogene Proteine) wie auch Zytokine und Wachstumsfaktoren für die EMT verantwortlich sein. (Kalluri & Neilson, 2003), (Kage & Borok, 2012)

Auch im Rahmen der Tumorprogression und Metastasierung kommt es zu diesem Phänotypwechsel (z.B. bei der Tumorzelllinie A549, die von humanen alveolären Epithelzellen abgeleitet ist und als in vitro Modell für Typ II Alveolarzellen dienen), wobei in diesem Fall EMT wahrscheinlich durch hohe Konzentrationen von CCL18 (produziert durch TAM, also M2-Makrophagen) induziert werden kann. (Ploenes, Scholtes et al., 2013)

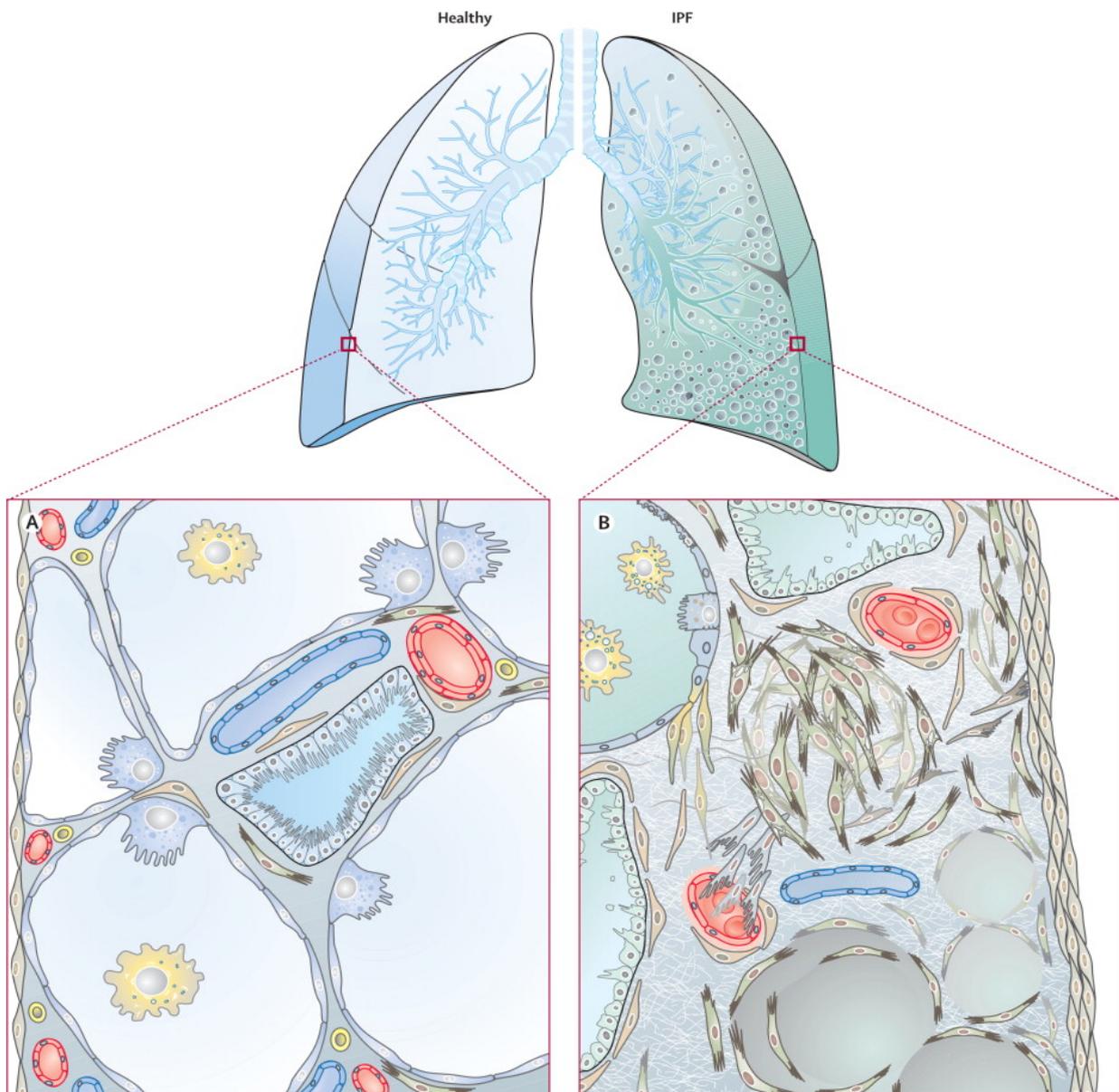


Abb. 2: Gesunde und fibrotisch veränderte Lunge. Normale makroskopische und mikroskopische Architektur der gesunden Lunge, Lunge mit IPF mit heterogenem Muster normaler und fibrotischer Areale, Honigwabennmuster mit subpleuralen, v.a. basal gelegenen Verdickungen. A: Vergrößerte normale Alveolararchitektur. B: Geschädigtes Epithel mit apoptotischen und hyperplastischen Veränderungen des Epithels, epithelial-mesenchymaler Transformation, Unterbrechungen der Basalmembran, kapillären Leckagen, Fibrinablagerungen, subepithelialen Ablagerungen von Myofibroblasten. Verstärkte Proliferation mesothelialer Zellen (subpleurale Verdickung) und von Perizyten der Gefäße. Quelle Abb. 2: Fernandez, I. E., and O. Eickelberg. 2012. New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 380:680-688.

G. Sarkoidose

I. Definition

Die Sarkoidose ist eine idiopathische, granulomatöse Systemerkrankung des Bindegewebes, die mit einer Inflammation einhergeht. Dabei ist die Ausbildung von Granulomen in allen Organen möglich.

Die pulmonale Sarkoidose, die einen Großteil der Fälle ausmacht, wird in 30-50% der Fälle durch trockenen Reizhusten, Dyspnoe und Pleurodynie symptomatisch. Über 60% der Fälle werden im radiologischen Stadium I diagnostiziert, das oftmals spontan ausheilt. Bei immerhin 10-30% der Patienten zeigt sich allerdings ein chronischer Verlauf mit potentiell lebensbedrohlichen Folgeerscheinungen wie einer Lungenfibrose oder einer pulmonalarteriellen Hypertonie. Die Lungenfibrose mit einer massiven Expansion der Granulome ohne Ansprechen auf Therapie stellt in westlichen Ländern die Haupttodesursache bei Sarkoidose-Patienten dar. Bei $\frac{3}{4}$ der Patienten zeigt sich das klassische Bild einer bilhilären Lymphadenopathie in der Röntgen-Thorax-Aufnahme. (Anon, 1999), (Pietinalho, Ohmichi et al., 1999), (Judson, 2008), (Nunes, Bouvry et al., 2007), (Semenzato, Bortoli et al., 2005)

Die BAL wird zur Diagnosestellung, Verlaufskontrolle und Aktivitätsbestimmung eingesetzt. Man findet erhöhte Lymphozytenzahlen bei normal-niedrigen Granulozytenkonzentrationen. Sehr spezifisch (besser noch als transbronchiale Biopsien) aber wenig sensitiv ist eine Erhöhung der $CD4^+/CD8^+$ -Ratio auf über 3,5 (Normalwert unter 2), wobei dieser Quotient mit fortschreitender Sarkoidose immer weniger geeignet ist. Durch die geringe Sensitivität sollten radiologisch interstitielle Lungenerkrankungen ausgeschlossen werden. (Costabel, Guzman et al., 2005), (Kantrow, Meyer et al., 1997), (Winterbauer, Lammert et al., 1993), (Ziegenhagen, Rothe et al., 2003), (Costabel, Guzman et al., 2007)

II. Pathogenese und klassische Immunantwort

Die Exposition einer genetisch empfänglichen Person gegenüber einem Antigen führt zur typisch nicht-einschmelzenden granulomatösen Entzündung mit einer starken Th1-Zell-medierten Immunität gegen das Antigen. Dieser Verlauf ist auf ein Ungleichgewicht regulatorischer und pro-inflammatorischer Faktoren zurückzuführen. Es kommt zu einer Akkumulation von Lymphozyten und Makrophagen in den Alveolen mit T-Zell-Immunität gegen das Antigen, die von den Antigen-präsentierenden Makrophagen vermittelt wird.

Außerdem ist das Zytokin-Milieu v.a. im Bereich der Granulome bei der Sarkoidose zu einem Th1-typischen verschoben, unter Beteiligung von Zytokinen wie Interleukinen (v.a. IL2), TNF- α und IFN- γ und angiogenetischen Faktoren wie vascular endothelial growth factor VEGF. Nach der Aktivierung der Makrophagen bilden sich Granulome aus.^(Iannuzzi, Rybicki et al., 2007) Bei genetisch suszeptiblen Patienten kommt es zu einer Persistenz der inflammatorischen Reaktion und damit zur chronischen Sarkoidose mit begleitender progressiver Fibrose und dann möglicherweise im Verlauf der Sarkoidose dominierender Th2-Antwort (IL-13, IL-10).^{(Bingisser, Speich et al., 2000), (Hauber, Gholami et al., 2003), (Rybicki, Hirst et al., 2005)}

Für die Ausbildung von Granulomen ist die Aktivierung von T-Zellen notwendig. Es gibt Anzeichen dafür, dass die T-Zellen physiologisch durch ein persistierendes Antigen via T-Zell-Rezeptor TCR aktiviert werden und mit der Bildung von IL-2, IL-6 und IFN- γ reagieren.^{(Devergne, Emilie et al., 1992), (du Bois, Kirby et al., 1992)} Neben der klonalen Expansion akkumulieren die T-Zellen durch von Makrophagen, epithelialen und endothelialen Zellen sezernierte Mediatoren, deren Konzentrationen mit dem Ausprägungsgrad der Alveolitis und dem Verlauf korrelieren.^{(Rothkrantz-Kos, Van Dieijen-Visser et al., 2003), (Capelli, Di Stefano et al., 2002)} Im Bereich der Granulome dominiert die Th1-Subpopulation, während in den Alveolen die Differenzierung sowohl zu Th1 als auch Th2 (welche aber wahrscheinlich supprimiert sind) auseinandergeht.^(Bäumer, Zissel et al., 1997) Die Sarkoidose geht dabei mit einer Expansion regulatorischer T-regulatorischer Zellen Treg einher, welche potente antiproliferative Eigenschaften aufweisen, deren Funktion aber insuffizient ist.^(Miyara, Amoura et al., 2006) Durch die Sekretion von IL-4 durch diese Treg kommt es zur Proliferation von Fibroblasten und Aktivierung von Mastzellen mit konsekutiver fibrotischer Reaktion.^{(Taflin, Miyara et al., 2009), (Rappl, Pabst et al., 2011), (Prasse, Zissel et al., 2010)} Interessanterweise besteht bei der Sarkoidose eine periphere Anergie bei Hyperreaktivität im Bereich der Granulome, hervorgerufen durch die Umverteilung der Treg.^(Miyara, Amoura et al., 2006)

Makrophagen spielen eine essentielle Rolle bei der Sarkoidose. Zum einen bilden sie die vielkernigen Riesenzellen des Granulom-Zentrums, zum anderen ist die Zahl der Alveolarmakrophagen erhöht und diese zeigen Anzeichen einer Aktivierung mit einhergehender Bildung von Zytokinen (v.a. TNF- α). Sie dienen der Rekrutierung der o.g. T-Zellen als APC, mit Aufnahme, Prozessierung und Präsentation des unbekanntes Antigens über Major histocompatibility complexes MHC-Moleküle an der Zelloberfläche, zusammen mit co-stimulatorischen Signalen. Dabei gibt es Hinweise, dass bei der Sarkoidose die AM einen veränderten Phänotyp aufweisen, wodurch sie in Arealen der aktiven Erkrankung Antigene mit hoher Effizienz und Kapazität präsentieren können (wohingegen bei gesunden

Probanden die Zugabe von AM zu proliferierenden T-Zellen zu einer Reduktion der Proliferation führt).^{(Lem, Lipscomb et al., 1985), (Venet, Hance et al., 1985), (Ettensohn, Lalor et al., 1986), (Ina, Takada et al., 1990)} Diese hoch-effizienten AM exprimieren als Zeichen ihrer Aktivierung vermehrt MHC II-Moleküle auf ihrer Oberfläche und diese sind insbesondere HLA-Subtypen, welche mit einem größeren Risiko für das Auftreten einer bestimmten Erkrankung verbunden sind (beispielsweise ist der HLA-DR3-Haplotyp mit dem Auftreten des Löfgren-Syndroms assoziiert).^{(Rossi, Zocchi et al., 1986), (Martinetti, Luisetti et al., 2002), (Berlin, Fogdell-Hahn et al., 1997)} Zudem sind auf den AM vermehrt co-stimulatorischer Moleküle wie CD72, CD80, CD86, CD153 und CD154 sowie Moleküle wie CD11a,b,c und CD54, die eigentlich der Zelladhäsion dienen, aber auch Antigene präsentieren können, exprimiert.^{(Zissel, Ernst et al., 1997), (Nicod & Isler, 1997), (Kaneko, Kuwano et al., 1999), (Agostini, Trentin et al., 1999), (Wahlström, Berlin et al., 1999)} Die Makrophagen, die in der BALF in frühen Stadien I-III der Sarkoidose gefunden wurden, waren dabei v.a. durch das Vorhandensein von CD40-Molekülen und ein Fehlen von CD163-Molekülen sowie durch eine geringere CCL18-Produktion charakterisiert, was auf eine M1-Polarisation schließen lässt.^{(Prasse, Pechkovsky et al., 2006), (Wojtan, Mierzejewski et al., 2016)} Mit Fortschreiten der Sarkoidose steigen die durch die BALF-Zellen produzierten CCL18-Level, was auf ein Shift der M1- zu einer M2-Differenzierung im Verlauf des fibrotischen Umbaus hinweist.^(Prasse, Pechkovsky et al., 2006)

2. Fragestellung

A. Grundannahmen

Die Konzentration von extrazellulärem ATP ist in den BALF bei der IPF erhöht.^(Riteau, Gasse et al., 2010) ATP ist außerdem ein „danger signal“, das im Milieu von Entzündungen erhöht ist^{(Gallucci & Matzinger, 2001), (Van Furth, 1982)} und daher eine M1-Aktivierung von Makrophagen auslösen sollte.

Demgegenüber ist die IPF durch eine Dominanz von M2-Makrophagen/ TAM gekennzeichnet und CCL18 kann als typischer Marker für diese Makrophagen betrachtet werden.^{(Mantovani, Sica et al., 2005), (Mantovani, Sozzani et al., 2002), (Wynn, 2004), (Stahl, Schupp et al., 2013)}

Dieser scheinbare Widerspruch sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Daher lautete die These, die in dieser Dissertation untersucht werden sollte, dass durch den Einfluss hoher extrazellulärer ATP-Spiegel die Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen hin zu klassisch aktivierten M1-Makrophagen beeinflusst wird, was sich wiederum in der Produktion bestimmter Zytokine und der Expression verschiedener Rezeptoren niederschlagen muss. Dagegen muss es bereits differenzierte M2-Populationen geben, die gegenüber dem Stimulus ATP inert sind.

B. Fragen

1. Welchen Einfluss haben ATP, der spezifische P2X₇-Rezeptor-Agonist BzATP und das Nukleosidtriphosphat- und -diphosphat-verdauende Enzym Apyrase auf die Aktivierung und Differenzierung von Monozyten (interpretiert anhand einer Änderung der Synthese der Marker-Zytokine CCL18, IL-1Ra, IL-1 β und TNF- α)?
2. Wie wirkt sich die Ko-Kultivierung von Monozyten mit der Tumorzelllinie A549 auf die Differenzierung aus und wie wird die Wirkung vermittelt? Zeigt sich eine Aktivierung zu Tumor-associated macrophages (M2-Makrophagen, vergleichbar der Aktivierung durch Fibroblasten)?
3. Welchen zeitlichen Einfluss gibt es auf die Polarisation und Differenzierung?
4. Welchen Einfluss haben bakterielle Produkte wie LPS (v.a. in Kombination mit ATP bzw. Apyrase oder Produkten der Tumorzellen) auf die Differenzierung der Monozyten?

5. Haben Purin-Rezeptor-Antagonisten einen Effekt auf die Polarisierung der Makrophagen?
6. Ändert sich die Expression bestimmter Purinozeptoren im zeitlichen Verlauf?

3. Materialien und Methoden

A. *Materialien*

I. Geräte

Analysewaage Handy H51-D	Sartorius. Göttingen, D
Begasungsbrutschrank	Heraeus, Stuttgart, D
ELISA-Reader	Bio-Tek Instruments Inc., Göttingen, D
iCycler	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA,
USA	
LaminAir HB2448	Heraeus, Stuttgart, D
Mikroskop Axiolab	Carl Zeiss, Oberkochen, D
Mikroskop CK2	Olympus, Hamburg, D
Multichannel Pipetten 12-Kanal (100, 200 µl)	Brand, Wertheim/Main, D
Spektralphotometer NanoDrop ND2000	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA,
	USA
Neubauer-Zählkammer (verbessert)	Brand, Wertheim/Main, D
PCR-Cycler T-Gradient	Biometra, Göttingen, D
Pipetten Pipetta 2 (10, 50, 200, 1000 µl)	Ratiolab, Dreieich, D
Pipetten (20, 100, 1000 µl)	Labsystems, Helsinki, FIN
Präzisionswaage Scaltec SBC52	Scaltec, Heiligenstadt, D
Software	Revelation SOFTWARE, Dynex
	Technologies – Auswertung ELISA
	iCycler 3.0 software, Bio-Rad
	Laboratories – Auswertung PCR
	GraphPad Prism version 5.01/
	6.01 for Windows, GraphPad
	Software – statistische und gaphische
	Auswertung der Ergebnisse
	AmplifX version 1.44 by Nicolas
	Jullien – Design der Primer
VarioMACS Permanentmagnet	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Vortexer Mixer	neoLab, Heidelberg, D

Werkbank Hera Safe Typ HS18	Heraeus, Stuttgart, D
Zentrifuge Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge LaboFuge 400R	Heraeus, Stuttgart, D
Zentrifuge Rotixa/RP	Hettich, Tuttlingen, D

II. Verbrauchsmaterialien

Adhäsionsobjektträger	Marienfeld, Bad Mergentheim, D
Deckgläser 24x60	Engelbrecht, Edermünde, D
EDTA-Serum-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Kulturflaschen 50ml Advanced Filter Top	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT
Handschuhe Sensiclean Latex/Nitratex	Ansell, München, D
Kulturplatten Costar 24 Well Culture	ClusterComing Inc., Corning, NY, USA
Kulturplatten Costar 12 Well Culture	ClusterComing Inc., Corning, NY, USA
MACS LS Columns	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, D
PCR-Platten 96-Well Nunc	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
PCR Softtubes 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
Pipettenspitzen	Ratiolab, Dreieich, D
Reagenzröhrchen Falcon 2052 (15; 50 ml)	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Rundbodenplatten 96 Well	NUNC Brand Products, DK

III. Chemikalien, Biochemikalien und Medien

Absolute SYBR Green Fluorescein	ABgene, Apsom, UK
Aceton	Merck, Darmstadt, D
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Chloroform	Merck, Darmstadt, D
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco Life Technologies, Paisley, GB
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Gibco Life Technologies, Paisley, GB
Duo-Set für ELISA (CCL18, IL1 β , TNF α , IL1Ra)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	BioWhittaker, Lonza, Basel, CH
Ethanol 99,9%	Baker, Dventer, NL
Fetal Calf Serum (FCS)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Ficoll Separating Solution	Biochrom, Berlin, D
iQ Supermix	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
iScript cDNA synthesis kit	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
MACS CD14 MicroBeads	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, D
Penicillin/Streptomycin Seromed	Biochrom, Berlin, D
Propanol	Merck, Darmstadt, D
RPMI 1640 Medium + L-Glutamine	Gibco, Paisley, UK
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt, D
Stratascript, RT-Kit	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Trizol-Reagent	Gibco, Paisley, UK
Trypsin	Gibco, Paisley, UK
Türk-Lösung	Merck, Darmstadt, D

IV. Stimulanzen

Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Adenosindiphosphat (ADP)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Adenosinmonophosphat (AMP)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Adenosin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Apyrase	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Benzoyladosintriphosphat (BzATP)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
1-[N,O-bis-(5-Isoquinolinsulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazin (KN62)	Tocris Bioscience, Bristol, GB
Lipopolysaccharid LPS E. coli	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Pyridoxalphosphatazophenyldisulfonsäure (PPADS)	Tocris Bioscience, Bristol, GB
Suramin	Tocris Bioscience, Bristol, GB

V. Puffer und Lösungen für Monozyten-Isolation

MACS-Puffer

500ml DPBS

25ml BSA (10%)

2ml EDTA (0,5M)

VI. Puffer und Lösungen für ELISA

a) ELISA-Waschpuffer

100ml 10x DPBS 0,5ml Tween 20 900ml demineralisiertes H₂O

b) ELISA-Blockpuffer

DPBS 1% BSA 0,05% Natriumazid
5% Sucrose

c) ELISA-Substratpuffer

500 ml H₂O bidest. 3.15g Zitronensäure-Monohydrat
Einstellen mit 1 N NaOH auf pH 4,5

d) Tetramethyl-Benzidine-Lösung für ELISA

480 mg TMB 10 ml Aceton 90 ml Ethanol
200 µl H₂O₂

VII. Primer für PCR

OligoDT-Primer

biomers.net GmbH, Ulm, D

Tabelle 1: Rt-PCR Ziele mit forward- und reverse-Primern

Target	Forward	Reverse
P2Y ₂	GCCCCTGGAATGACACCATCAAT	CGTACTTGAAGTCCTCGTTGAAGC
P2Y ₄	GCTGACTGCCGAGTACTGAACATT	GACGGAGCTGACGTCGATATTTGT
P2Y ₁₁	AAGTCCTGCCCTGCCAACTTCT	TTCCGGATGCTGAAGCGGTACA
P2Y ₁₂	ATCTGGGCATTCATGTTCTTACTC	TGCCAGACTAGACCGAACTCT
P2X ₇	AGATCGTGGAGAATGGAGTG	TTCTCGTGGTGTAGTTGTGG
CCL18	CCCTCCTTGTCCTCGTCTG	GCTTCAGGTCGCTGATGTATT
GAPDH	CACCAGGGCTGCTTTTAACT	GATCTCGCTCCTGGAAGATG

B. *Methoden*

I. Probandeneinschluss

Für die Arbeit wurde peripher-venöses Blut von gesunden, freiwilligen Spendern entnommen. Insgesamt wurden die Proben von neun verschiedenen Probanden verwendet, die wiederholt (zwischen ein und fünf Mal) Blut spendeten. Unter den Probanden sind drei

weibliche und sechs männliche Personen. Das durchschnittliche Alter beträgt 24 Jahre mit einer Spanne zwischen 22 und 28 Jahren (Mean 24,05 Jahre, SD \pm 1,39 Jahre).

Ausschlusskriterien waren aktive Infektionen in den vorausgehenden sieben Tagen, operative Eingriffe kurz zuvor und jegliche chronischen Erkrankungen. Die Rekrutierung der Probanden erfolgte hauptsächlich aus Mitarbeitern der medizinischen Universitätsklinik Freiburg und externen Freiwilligen. Die Blutentnahme erfolgte nach Aufklärung und Einwilligung.

II. Gewinnung der Serumproben und Monozytenisolation

Den Probanden werden zwischen 80 und 180 ml Blut aus der Vena mediana cubiti entnommen und sofort weiterverarbeitet. Das Blut aus zwei bis drei EDTA-Entnahmeröhrchen wird in ein 50ml Falcon-Röhrchen überführt und mit DPBS bis auf 50ml aufgefüllt. In weiteren Röhrchen werden 20ml Ficoll Separationsmedium mit einer Dichte von 1,077g/ml vorgelegt und mit 25ml des verdünnten Vollblutes vorsichtig überschichtet. Während der anschließenden 20-minütigen Zentrifugation bei 4°C passieren Granulozyten und Erythrozyten auf Grund ihres größeren spezifischen Gewichtes das Separationsmedium und sedimentieren auf dem Boden des Röhrchens, wohingegen sich Monozyten und Lymphozyten, welche ein spezifisches Gewicht $<1,077\text{g/ml}$ haben, an der Interphase zwischen Medium und Plasma ansammeln (Abb. 3).

Danach können die peripheral blood mononuclear cells (PBMC) aus der Interphase in die Pipette abgenommen werden. Es folgt das Waschen der Zellen mit DPBS und die Überführung der Pellets aus PBMC in ein Falcon-Röhrchen. Die verdichteten Zellen werden in 10ml MACS-Puffer resuspendiert und während der folgenden Zählung kühl gelagert.

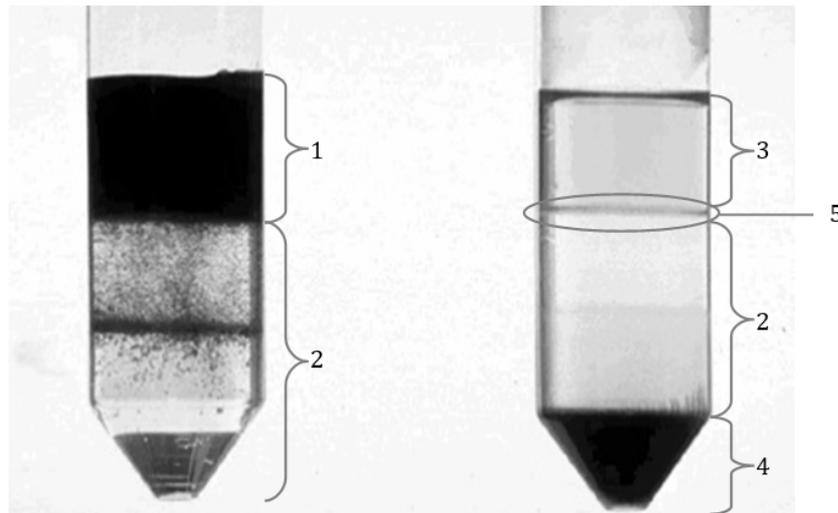


Abb. 3: Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation, links Zustand vor, rechts nach Zentrifugation. 1: Vollblut 2: Separationsmedium 3: Serumüberstand 4: Pellet aus Erythrozyten und Granulozyten 5: Interphase mit Lymphozyten und Monozyten. Quelle Abb. 3: PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM - KLINIKAI KÖZPONT, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet (Klinisches Zentrum der Universität Pécs, Institut für Immunologie und Biotechnologie, deutsche Version), Separation der Blutzellen, http://www.immbio.hu/de/edu/pr_ficoll_de09.pdf (Stand 17.01.2013, 16.00 Uhr)

Die isolierten Zellen werden zur Zählung in 10 ml DPBS aufgenommen. Die Gesamtzahl der isolierten Zellen wird aus der nun bestimmten Zelldichte bestimmt. Dazu werden 10 μl der Zellsuspension mit 90 μl Türk'scher Lösung vermischt (1:10-Verdünnung). Nachfolgend errechnet man die Zellzahl mit Hilfe einer Zählkammer im Lichtmikroskop, wobei vier große Quadranten der Neubauer Kammer von je 0,1 μl Volumen ausgezählt wurden. Die durchschnittliche Zellzahl je Großquadrant wird mit 10^5 multipliziert, woraus sich die Zelldichte als Anzahl pro ml ergibt (Zellzahl pro ml = 10 (bei vorheriger Verdünnung) x Zellzahl pro Quadrat x 10^4).

Zur Isolierung bestimmter Zellen anhand von Oberflächenstrukturen aus dem Zellgemisch der PBMC dient die „magnetic cell separation“ (MACS). Dafür werden die Zellen an paramagnetische MicroBeads gebunden. An diese 50nm großen Magnetpartikeln sind Antikörper gegen bestimmte Oberflächenmoleküle der Zellen gekoppelt. Zellen, die den entsprechenden Marker tragen, binden dann diese Partikel. Beim Fluss durch eine Säule, welche einem starken magnetischen Feld ausgesetzt ist, wird daher gewährleistet, dass nur der markierte Zelltyp zurückgehalten wird. Nachdem das Magnetfeld entfernt ist, können die markierten Zellen dann ausgewaschen und so gewonnen werden.

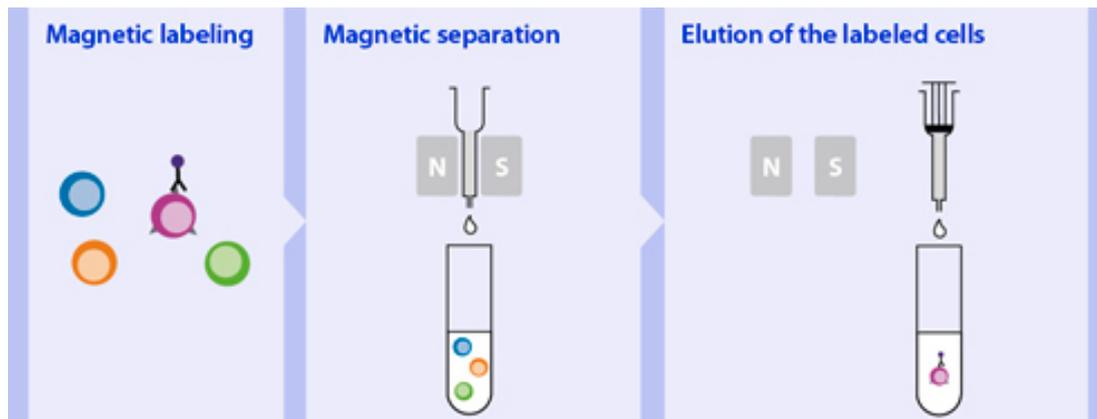


Abb. 4: Zellseparation mit MACS. Nach der Bindung der paramagnetischen Partikel („Beads“) an spezifische Oberflächenmoleküle bestimmter Zellen, werden diese im magnetischen Feld zurückgehalten. Ohne Einwirkung des Magnetfeldes können die zuvor gekennzeichneten Zellen ausgewaschen werden. Quelle Abb. 4: MACS technology – the basic principle, Miltenyi Biotec, <https://www.miltenyibiotec.com/Products-and-Services/MACS-Cell-Separation/MACS-Technology/Basic-principle.aspx> (Stand 17.01.2013, 21.00 Uhr)

Zum Markieren werden die via Ficoll-isolierten Zellen erneut zentrifugiert, die Pellets in 80µl MACS-Puffer pro 10^7 Zellen aufgenommen und die anti-CD14⁺-MicroBeads in der entsprechenden Menge zugegeben (20µl anti-CD14⁺-MicroBeads pro 10^7 Zellen). Nach einer Inkubation im Kühlschrank für 15 min folgt ein erneuter Waschschritt mit MACS-Puffer. Die PBMC werden danach in 500µl MACS-Puffer pro 10^8 Zellen aufgenommen. Die LS-Separationssäule für die Positiv-Selektion wird am Magneten des VarioMACS-Separators angebracht und mit 3ml MACS-Puffer gespült. Die Zellsuspension wird daraufhin auf die Säule gegeben, danach wird noch dreimal mit jeweils 3ml MACS-Puffer gespült und die CD14-negativen Zellen werden aufgefangen. Zur Gewinnung der CD14-positiven Zellen wird die Säule vom Separator entfernt, 5ml MACS-Puffer werden auf die Säule gegeben und mittels eines Stempels werden die CD14⁺-Zellen herausgespült. Die Zellzahl wird erneut mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt (bei vorherigen Arbeiten konnten mittels dieser Methode in unserem Labor eine Reinheit von 97% erreicht werden).

III. Kokultur mit A549 und konditioniertem Medium

A549-Zellen sind humane alveoläre basale Epithelzellen eines Adenokarzinoms, die oft als Modell für Typ II-Pneumozyten dienen. Die einschichtig in Gewebekulturflaschen wachsenden Zellen werden in DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Nach einer ausreichenden Zeit zur Proliferation werden die Zellen mittels Trypsin

abgelöst und nach dem Waschen mit DPBS wird ihre Zahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die A549-Zellen selbst oder das aus ihrer Kultur gewonnene konditionierte Medium werden zu den zuvor isolierten Monozyten gegeben.

Um das konditionierte Medium CM der A549 zu erhalten, wurden die Zellen mit einer Dichte von $1,1 \times 10^6$ /ml in 1ml Medium (DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep) in einer 24-Well-Platte über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, um eine vollständige Adhärenz zu ermöglichen. Nach dieser initialen Periode wurden die Zellen für drei Stunden mit ATP in den Konzentrationen 10µM oder 100µM stimuliert beziehungsweise blieben die Zellen unstimuliert. Nach einem Austausch des Mediums und einer Kultivierung für zusätzliche 24 Stunden wurden die nach Zentrifugation zellfreien Überstände abgenommen und in Aliquots bei -80°C aufbewahrt.

IV. Zellkulturen

Die isolierten Monozyten werden resuspendiert und in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml (bzw. 4×10^6 Zellen pro ml für die spätere Durchführung einer PCR) und Well in RPMI-1640 mit 10% FCS und 1% Pen/Strep in 24- (für ELISA) oder 6- (für PCR) Well-Kulturplatten in einer angefeuchteten Atmosphäre mit 5% CO₂ und 37°C über 24, 48 oder 72 Stunden kultiviert. Die Monozyten werden zu den Zeitpunkten 0h und 48h mit ATP, dem spezifischen P2X₇-Agonisten BzATP, mit ADP, AMP, Adenosin und/ oder LPS mit den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Um den Einfluss von endogen freigesetztem ATP zu bestimmen, wird in einigen Versuchsansätzen die ATPase Apyrase hinzugefügt. Die Purinorezeptor-Antagonisten PPADS (nicht-selektiver P2-Antagonist, Blockade von P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₅ (IC₅₀ = 1 - 2.6 µM), nativem P2Y₂-like (IC₅₀ ~ 0.9 mM), und rekombinantem P2Y₄ (IC₅₀ ~ 15 mM)), KN62 (nicht-kompetitiver Antagonist an P2X₇ receptor (IC₅₀ = 15 nM)) oder Suramin (nicht-selektiver P2-Antagonist) allein oder in Kombinationen mit o.g. Stimulantien (Antagonisten werden 30 min vor den Stimulantien zugegeben) werden in den angezeigten Konzentrationen zu der Kultur gegeben um den Einfluss verschiedener Rezeptoren zu bestimmen. Die Monozyten werden allein oder in Ko-Kultur mit der Lungenkarzinom-Zelllinie A549 zur Induktion einer M2-Differenzierung kultiviert. (Müller-Quernheim, Potthast et al., 2012) Die Zell-freien Überstände, welche nach der jeweiligen Dauer der Kultur gewonnen werden konnten, werden bei -70°C für die spätere Analyse mittels ELISA aufbewahrt und die Zellen werden mit Hilfe von 200µl TRIzol für die RNA-Isolation und die anschließende PCR lysiert.

Stimulans	Hersteller	Konzentrationen
ATP	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	10µM 100µM
BzATP	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	10µM 100µM
ADP	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	10µM 100µM
AMP	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	10µM 100µM
Adenosin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	1µM 10µM 50µM
Apyrase	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	5U
LPS	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	0,1µg/ml 1µg/ml
PPADS	Tocris Bioscience, Bristol, GB	10µM
Suramin	Tocris Bioscience, Bristol, GB	10µM
KN62	Tocris Bioscience, Bristol, GB	250nM

Protokoll Nr.	Stimulation mit	Zeitpunkt der Stimulation	Dauer der Kultur
1	- ohne Stimulantien - ATP 10/100µM - BzATP 10/100µM - Apyrase 5 U	0 h	72 h
2	- ohne Stimulantien - ATP 10/100µM - BzATP 10/100µM	48 h	72 h

	- Apyrase 5 U		
3	<ul style="list-style-type: none"> - ohne Stimulantien - konditioniertes Medium CM - konditioniertes Medium nach A549-Stimulation mit 10µM ATP CM10 - konditioniertes Medium nach A549-Stimulation mit 100µM ATP CM100 	0 h	24h, 72 h
4	<ul style="list-style-type: none"> - ohne Stimulantien - LPS 0,1µg/ml - LPS 1µg/ml - ATP 100µM - Apyrase 5U - LPS 0,1µg/ml + ATP 100µM - LPS 0,1µg/ml + ATP 10µM - LPS 1µg/ml + ATP 100µM - LPS 1µg/ml + ATP 10µM - LPS 0,1µg/ml + Apyrase 5U - LPS 1µg/ml + Apyrase 5U - CM - LPS 0,1µg/ml + CM - LPS 1µg/ml + CM - ATP 100µM + CM - Apyrase 5U + CM - LPS 0,1µg/ml + ATP 100µM + CM - LPS 0,1µg/ml + ATP 10µM + CM - LPS 1µg/ml + ATP 100µM + CM - LPS 1µg/ml + ATP 10µM + CM - LPS 0,1µg/ml + Apyrase 5U + CM - LPS 1µg/ml + Apyrase 5U + CM 	0 h	72 h
5	<ul style="list-style-type: none"> - ohne Stimulantien - LPS 0,1µg/ml - LPS 1µg/ml - ATP 100µM - Apyrase 5U - LPS 0,1µg/ml + ATP 100µM - LPS 0,1µg/ml + ATP 10µM - LPS 1µg/ml + ATP 100µM - LPS 1µg/ml + ATP 10µM - LPS 0,1µg/ml + Apyrase 5U 	48 h	72 h

	<ul style="list-style-type: none"> - LPS 1µg/ml + Apyrase 5U - CM - LPS 0,1µg/ml + CM - LPS 1µg/ml + CM - ATP 100µM + CM - Apyrase 5U + CM - LPS 0,1µg/ml + ATP 100µM + CM - LPS 0,1µg/ml + ATP 10µM + CM - LPS 1µg/ml + ATP 100µM + CM - LPS 1µg/ml + ATP 10µM + CM - LPS 0,1µg/ml + Apyrase 5U + CM - LPS 1µg/ml + Apyrase 5U + CM 		
6	<ul style="list-style-type: none"> - ohne Stimulantien - Suramin 10µM - PPADS 10µM - KN62 250nM - ATP 100µM - ATP 10µM - Suramin 10µM + ATP 100µM - PPADS 10µM + ATP 100µM - KN62 250nM + ATP 100µM - Suramin 10µM + ATP 10µM - PPADS 10µM + ATP 10µM - KN62 250nM + ATP 10µM - ADP 100µM - ADP 10µM - AMP 100µM - AMP 10µM - Adenosin 50µM - Adenosin 10µM - Adenosin 1µM 	0 h bzw. 0,5 h (für die Antagonisten nach vorheriger Zugabe der Stimulantien)	72 h
7	<ul style="list-style-type: none"> - ohne Stimulantien - ATP 100µM 	0 h	48

V. Enzyme-linked immunosorbent assay ELISA

1. Hintergrund

Das Prinzip des ELISA beruht auf einer Antigen-Antikörper-Bindungsreaktion. Der primäre „Capture“- oder „Fänger“-Antikörper bindet mit seinem Fc-Teil an den Boden der Platte (feste Phase). Um übriggebliebene unspezifische Protein-Bindungsstellen der Platte zu blockieren wird der Blockpuffer zugegeben. Danach wird der zu untersuchende Analyt in der flüssigen Phase (in dem Fall der Überstand der Zellkulturen) in die Wells der Platte gegeben. Das zu untersuchende Antigen bindet dann an den Capture-Antikörper. Anschließend wird der zweite „Detection“-Antikörper dazugegeben, welcher an Biotin gekoppelt ist. Der sekundäre Antikörper bindet dann an das gebundene Antigen und bildet so einen Immunkomplex. Es wird der Streptavidin-Peroxidase-Komplex zugegeben, der an Biotin bindet und unter Substratzugabe eine Farbreaktion auslöst. Die Stärke der Farbreaktion wird photometrisch mittels ELISA-Reader gemessen und gibt damit die entsprechende Antigenkonzentration in der zu untersuchenden Flüssigkeit wieder. Um die Farbreaktion zu quantifizieren, werden parallel standardisierte Lösungen mit definierten Konzentrationen des Antigens untersucht und ausgelesen.

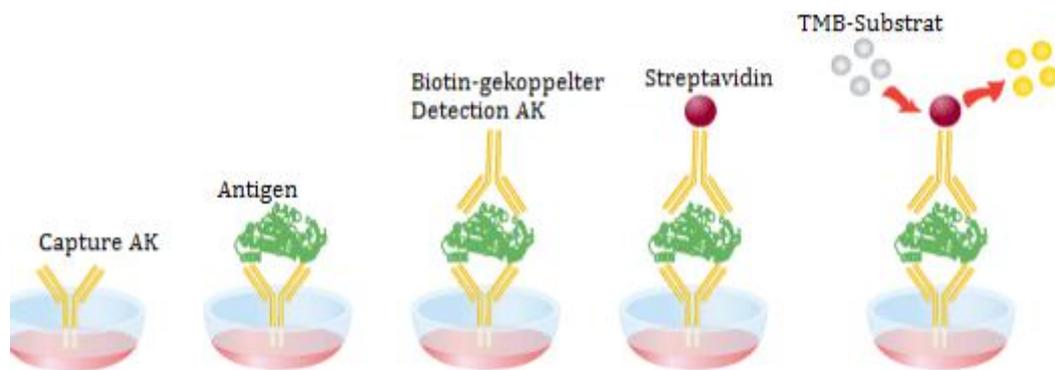


Abb. 5: Coating mit Capture-Antikörper. Zugabe der Probe, vorhandene Antigene werden an den primären AK gebunden. Bindung des Biotin-gekoppelten Detection-AK an das Antigen. Bindung von Streptavidin an den Detection-AK. Zugabe von TMB (Farbsubstrat) und Konvertierung in farbige Form. Quelle Abb. 5: Modifiziert nach Leinco technologies, Sandwich ELISA Step by Step Diagram, <http://blog.leinco.com/2010/sandwich-elisa-step-by-step-diagram/> (Stand: 21.01.2013, 13.00 Uhr)

2. Versuchsanleitung

Für TNF- α , CCL18, IL-1 β und IL-1Ra werden 50 μ l des Capture-Antikörper (Anti-TNF- α , Anti-CCL18, Anti-IL-1 β und Anti-IL-1Ra, unkonjugiert, R&D, USA) in der

Konzentration 1:220 in PBS in jedes Well einer Rundbodenplatte pipettiert und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Anschließend werden die Wells aspiriert und die ELISA-Platte viermal mit Waschpuffer (jeweils 4 x 400µl Waschpuffer) gewaschen und der Puffer durch Umwenden der Platte und anschließendes Ablöschen mit sauberen Papiertüchern komplett entfernt. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, werden in jedes Well 300µl Blockpuffer pipettiert und für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wird erneut viermal mit Waschpuffer gewaschen. Nach dem Waschen werden 50µl der teilweise unverdünnten, teils 1:2 bis 1:100 mit PBS/BSA verdünnten Seren in Duplets (jeweils zwei Wells) aufgetragen sowie die absteigenden Verdünnungen der Standardlösung und der Leerwert (PBS/BSA [1%]) zugegeben und für zwei Stunden mit Klebefolie abgedeckt inkubiert. Nachdem viermal mit Waschpuffer gewaschen wurde, wird der Detektionsantikörper (Anti-TNF- α , Anti-CCL18, Anti-IL-1 β und Anti-IL-1Ra, biotinyliert, R&D, USA) (Konzentration 1:200 in PBS/1% BSA) in die Wells pipettiert, die Rundbodenplatte wiederum abgedeckt für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und danach viermal mit Waschpuffer gewaschen. Daraufhin wird 50µl des Streptavidin-Peroxidase-Komplexes 1:200 mit PBS verdünnt und in jedes Well aufgetragen, 20 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert und erneut viermal mit Waschpuffer gewaschen. Im nächsten Schritt wird in jedes Well 50 µl TMB-Substratlösung (6 ml Citrat-Substratpuffer mit 300 µl TMB-Lösung) gegeben. Auch hier wird für 20 min im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wird der ELISA durch die Zugabe von 50 µl 4N Schwefelsäure pro Well abgestoppt und sofort im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgemessen. Die Auswertung mit Ausgabe der relativen Konzentrationen (zur Standardlösung) erfolgt mit Hilfe der mitgelieferten Software des ELISA-Readers.

VI. Polymerase chain reaction PCR

1. Hintergrund

Die PCR ist die Methode der Wahl, um DNA-Fragmente zu vervielfältigen und diese damit nachweisen zu können. Insgesamt läuft die PCR in drei Teilschritten ab, welche sich beliebig wiederholen lassen (bis zum Überschreiten der Nachweisgrenze):

- Denaturierung der DNA- Doppelstränge bei 95° C, bei dieser Temperatur dann als Einzelstränge vorliegend
- Hybridisierung spezifischer komplementärer Oligonukleotide (Primer) mit der Einzelstrang-DNA (Festlegung des zu vervielfältigenden DNA-Abschnitts durch die

Basensequenz der Primer), dafür Absenkung der Temperatur (Annealing-Temperatur spezifisch für das verwendete Oligonukleotid; Bestimmung durch Schmelzkurvenanalysen)

- Amplifikation des gewünschten Abschnittes durch die DNA-Polymerase bei 72° C

Danach kann der PCR-Zyklus wieder von vorn beginnen. Die zu amplifizierende DNA wird dabei exponentiell vervielfältigt.

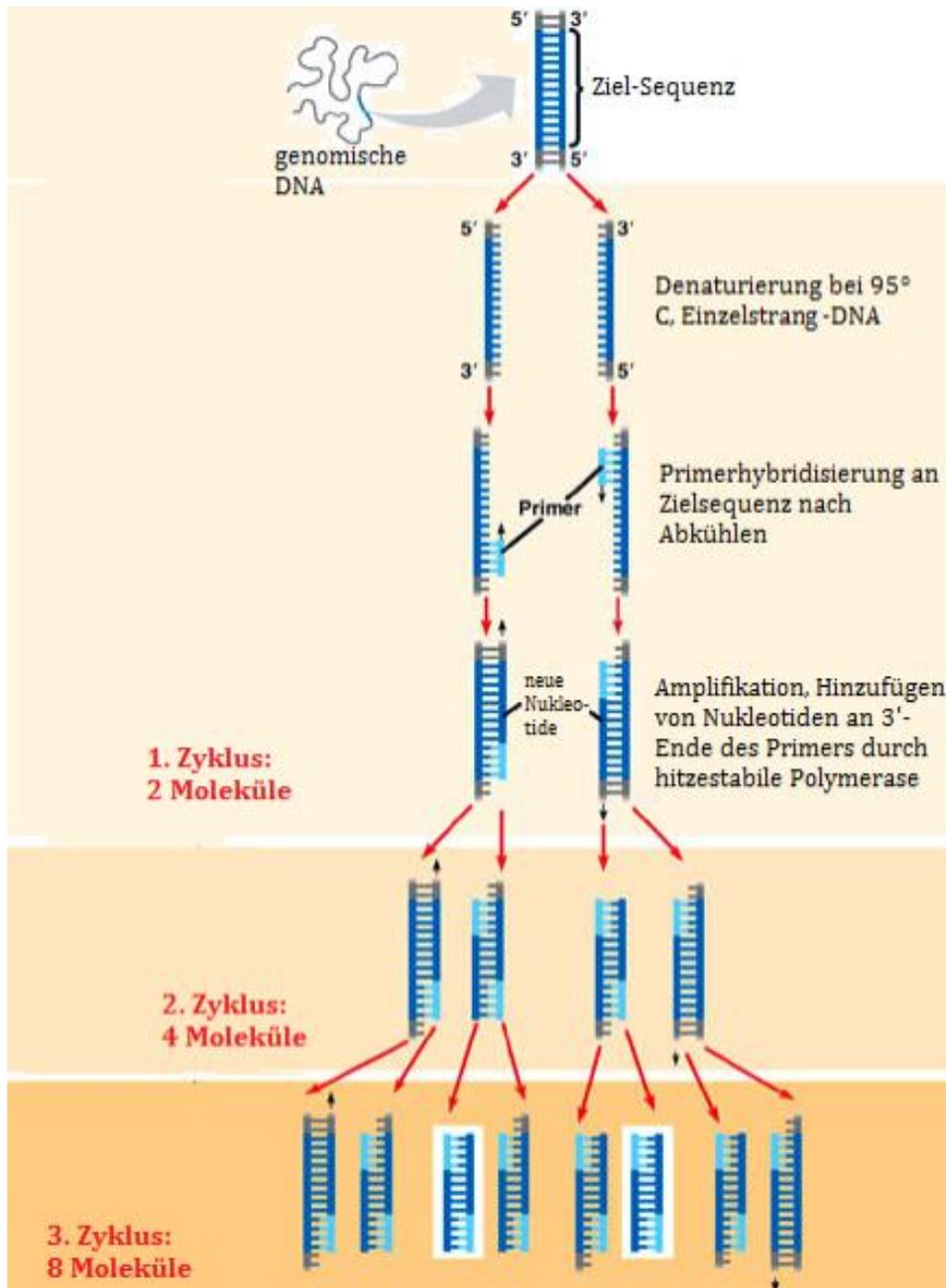


Abb. 6: Ablauf der PCR; Denaturierung, Hybridisierung, Amplifikation, exponentielle Zunahme der Moleküle in jedem Zyklus. Quelle Abb. 6: Modifiziert nach Schoolworkhelper - St. Rosemary Educational Institution, PCR: Uses, Steps, Purpose, <http://schoolworkhelper.net/pcr-uses-steps-purpose/> (Stand 21.01.2013, 16.00 Uhr)

2. Versuchsanleitung

Zuerst muss die RNA der Zellen isoliert werden. Die zuvor mit TRIzol lysierten Zellen werden zur Phasenseparation 5 min bei 30°C inkubiert, anschließend 50µl Chloroform zugegeben und die Reaktionsgefäße für 15 sec geschüttelt. Es folgt die erneute Inkubation bei 30°C für 3 min. Danach werden die Reaktionsgefäße für 15 min bei 4°C mit 13.000 U/min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation zeigen sich drei Phasen: zuunterst eine rötliche phenolhaltige Phase, in der Mitte eine weißliche Interphase und zuoberst eine wässrige, klare Phase. Die oberste Phase wird abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, der Rest wird verworfen. Nun folgt die Präzipitation der RNA mittels 100µl Isopropylalkohol. Anschließend wird das Gefäß wieder für 10 min bei 30°C inkubiert und daraufhin für 10 min bei 4°C und 13.000 U/min zentrifugiert. Die ausgefällte RNA liegt nun als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes, der Überstand kann abgekippt werden. Zur Reinigung der RNA werden 200µl 75% Ethanol zugegeben, das Gefäß gevortext und anschließend eine Zentrifugation bei 7500 U/min und 4°C für 5 min durchgeführt. Der Überstand wird anschließend vorsichtig abgekippt und das RNA-Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes wird für 10-30 min an der Luft getrocknet, bis das Ethanol fast komplett verdunstet ist. Zum Lösen der RNA werden 30µl DEPC-H₂O zugegeben und eine Inkubation für 10 min bei 60°C durchgeführt. Die Konzentration der RNA wurde anschließend mittels Spektralphotometer NanoDrop bestimmt und die Proben bei -80°C aufbewahrt.

Die Reverse Transkription ermöglicht es, aus RNA-Einzelsträngen doppelsträngige RNA-DNA-Hybride zu synthetisieren. Diese Hybride komplementärer cDNA ermöglichen im Gegensatz zur RNA die Amplifikation mittels PCR. Es wurde nach der o.g. Bestimmung der jeweiligen RNA-Konzentration das Volumen zugegeben, welches 1µg in DEPC-H₂O gelöster RNA entspricht. Dieses Volumen in µl wird zusammen mit 4µl 5x iScript Reaction Mix und 1µl iScript Reverse Transcriptase und die Differenz zum Totalvolumen von 20µl mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt (Tab. 4). Der Ansatz wird im PCR-Cycler inkubiert bei aufeinanderfolgend 5 min bei 25°C, 30 min bei 42°C (cDNA-Synthese) und 5 min bei 85°C (Inaktivierungsphase). Die cDNA wird danach direkt in der PCR verwendet.

Tabelle 4: Reaktionsansatz cDNA-Synthese	
5x iScript Reaction Mix (oligo d(T) Primer (komplementär zum poly-A-Schwanz der mRNA) und random Hexamer-Primer)	4µl
iScript Reverse Transcriptase	1µl

RNA-Probe	xµl (≅ 1µg)
Nuklease-freies H ₂ O (DEPC-H ₂ O)	(20 - 4 - 1) - xµl
Gesamtvolumen	20µl

Mit der synthetisierten cDNA kann nun die Real-Time-PCR durchgeführt werden. Zur relativen Quantifizierung der mRNA-Menge nutzt man die Eigenschaft von SYBR-Green, bei Interkalierung in doppelsträngige DNA (dsDNA) zu fluoreszieren, wobei die Stärke der Fluoreszenz mit der Menge an dsDNA korreliert. Die Fluoreszenz wird dabei während der Polymerase-Kettenreaktion vom RT-PCR-Gerat iCycler mittels Photoeinheit bestimmt. Eine Zunahme der Fluoreszenz entspricht dann also der Amplifikation spezifischer DNA. Abhängig von der verwendeten cDNA-Menge überschreitet die emittierte Fluoreszenz ab einer bestimmten Zykluszahl (Ct, threshold Cycle, Schwellen-Zyklus) die Hintergrundfluoreszenz. Je niedriger der Ct-Wert (je schneller der Schwellenwert erreicht wird), umso höher der Gehalt an spezifischer DNA. Um den Gehalt an DNA zwischen unterschiedlichen Proben vergleichen zu können, wird der Ct-Wert der Proben auf den Ct-Wert eines konstitutiv exprimierten, nicht regulierten Reportergens (in diesem Fall Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase GAPDH) bezogen. Das Verhältnis vom Zielgen zu dem dauerhaft exprimierten Housekeeping-Gen für GAPDH dient dann der relativen Quantifizierung. Die relative Expression des Zielgens wird mit Hilfe der „Delta-Delta-Methode“ bestimmt und mit der folgenden Formel berechnet: $rE = 2^{Ct(GAPDH) - Ct(Zielgen)} \times 10.000$.

Der Reaktionsansatz für die PCR wird, wie in der Tabelle einzusehen, vorbereitet und in jeweils ein Well pipettiert, wobei für jede Probe und Standardlösung je ein Triplet (drei Wells) verwendet wird.

H ₂ O	Master mix	9,3µl
Forward Primer (L-Primer, Sequenz s. o.)		0,63µl
Reverse Primer (R-Primer, Sequenz s. o.)		0,63µl
iQ SYBR-Green Supermix		12,5µl
cDNA		2µl

Nachdem die 96-Well-Platte mit Klebefolie versiegelt ist und die Platte mit dem Inhalt der Wells gemischt wurde, werden die Proben kurz zentrifugiert. Im iCycler erfolgt die initiale Denaturierung bei 95°C für 15 min mit Aktivierung der taq-Polymerase. Daran schließt sich die Amplifikationsphase an, welche insgesamt 45 Mal wiederholt wird und aus Denaturierung (95°C für 10 sec), Annealing (57°C für 15 sec) und Amplifikation (72°C für 20 sec) besteht. Danach wird die Temperatur in 0,2°C-Schritten von 55°C bis auf 95°C erhöht und nach jedem Schritt die Fluoreszenz des Produktes gemessen. Durch die Temperaturerhöhung wird die dsDNA wieder in einzelsträngige DNA aufgeschmolzen und die Fluoreszenz nimmt ebenso schrittweise ab. Bei der Amplifikation von spezifischen Abschnitten (typisch für das Zielgen) hat das entstehende Produkt eine einheitliche Größe und wird damit an einer spezifischen Temperatur aufgeschmolzen. Daher ist die Abnahme der Fluoreszenz bei dieser Temperatur dann maximal, die aufgetragene Temperatur-Fluoreszenz-Kurve hat dort ihren Wendepunkt und die erste Ableitung der Kurve demnach dort ihr Maximum. Liegen diese Maxima immer stabil an derselben Stelle und stimmt die gelelektrophoretisch bestimmte Größe des Produkts mit der erwarteten Größe überein, so kann von der Spezifität des Produktes ausgegangen werden. Daher wird die Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um zu überprüfen, ob das Produkt spezifisch ist. Die Primer für humanes GAPDH, CCL18, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₁₁, P2Y₁₂ und P2X₇ wurden mittels AmplifX Version 1.44 by Nicolas Jullien (CNRS, Aix-Marseille Université - <http://cm2m.univ-mrs.fr/pub/amplifx-dist>) unter Verwendung von Sequenzen (s.o.) der GenBank Database (National Center for Biotechnology Information - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) hergestellt. Die Primer für P2Y₂ und P2Y₁₂ wurden für die übereinstimmende Region aller Isoformen designed. Die Primer wurden durch biomers.net GmbH, Ulm, D synthetisiert. Die Primer-Sequenzen finden sich in Tab. 1.

VII. Statistische Auswertung

Die Datensätze werden als Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt. Nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Tests für mehr als zwei Gruppen im Vergleich und gepaarte Wilcoxon-Tests für den Vergleich von zwei Gruppen wurden unter Verwendung von GraphPad Prism (www.graphpad.com) durchgeführt, um die statistische Signifikanz zu ermitteln. Ein p-Wert < 0.05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

4. Resultate

A. Zytokin-Level nach der Stimulation mit ATP, BzATP und Apyrase (Protokoll 1 und 2; siehe Material und Methoden Tab. 3)

Abb. 7a

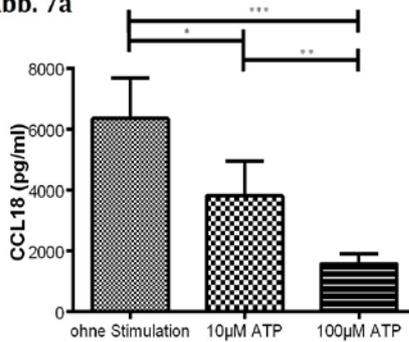


Abb. 7b

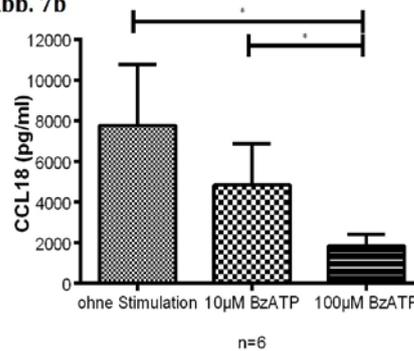


Abb. 7c

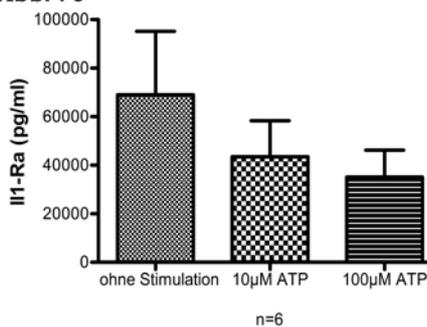


Abb. 7d

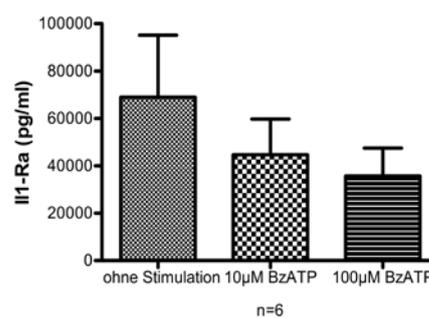


Abb. 7e

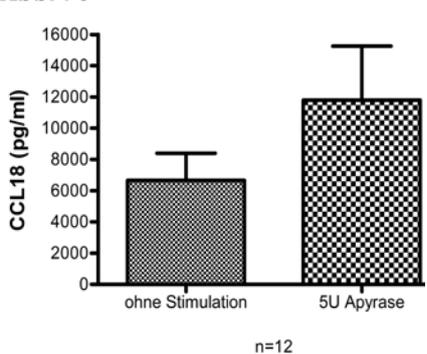


Abb. 7f

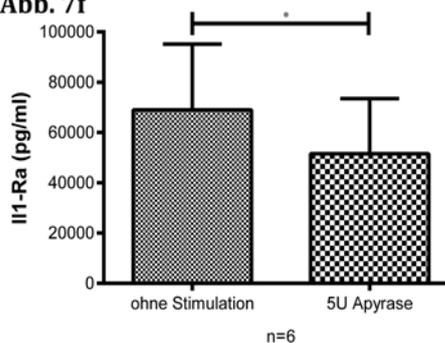


Abb. 7a-f: Zytokinspiegel von CCL18 und IL1-Ra nach 72-stündiger Kultur frisch isolierter Monozyten mit sofortiger Stimulation durch ATP (a, c), BzATP (b, d) und Apyrase (e, f). Dosisabhängige Reduktion von CCL18 (a, b) und IL1-Ra (c, d) durch ATP und BzATP. Apyrase erhöht die Freisetzung von CCL18 (e), während die Freisetzung von IL-1Ra (f) gesenkt wird.

Die Monozyten wurden sofort nach Initiierung der Zellkultur mit 10µM oder 100µM ATP respektive BzATP (einem selektiven P2X-Rezeptor-Agonisten, der v.a. am P2X₇-Rezeptor eine potentere Wirkung entfaltet als ATP) stimuliert bzw. 5U des ATP-abbauenden Enzyms Apyrase wurden zugegeben (Zeitpunkt 0 h). Wie in Abb. 7a und b ersichtlich, reduzierten sowohl ATP (links) als auch BzATP (rechts) Dosis-abhängig die Produktion des anti-inflammatorischen

Zytokins CCL18. Die Reduktion war sowohl für ATP ($p = 0.01$ für 10µM, $p < 0.001$ für 100µM) als auch für BzATP in der Konzentration von 100µM ($p = 0.03$) statistisch signifikant. Ähnlich Effekte zeigten sich auf die Synthese von IL-1Ra für ATP als auch für BzATP (Abb.

7c, d). Allerdings erreichen diese Effekte kein signifikantes Niveau. Im Gegensatz dazu erhöhte das ATP-abbauende Enzym Apyrase die Produktion von CCL18 wie erwartet und reduzierte überraschenderweise signifikant die IL-1Ra-Synthese (Abb. 7e, f, $p = 0.03$).

Die Ko-Kultur der Monozyten mit der Zelllinie A549 erhöhte die CCL18-Freisetzung (Abb. 8a), wohingegen IL-1Ra davon unbeeinflusst blieb (Abb. 8b). Die Erhöhung des CCL18 wurde nicht durch die A549-Zellen selbst verursacht, da sie kein CCL18 freisetzen. Auch in der Ko-Kultur führte die Stimulation mit ATP ($p = 0.03$ für $10\mu\text{M}$ und $100\mu\text{M}$) und BzATP ($p = 0.03$ für $100\mu\text{M}$) zu einer signifikanten, Dosis-abhängigen Verminderung der CCL18-Sekretion (Abb. 8a). Durch die Stimulation der Ko-Kultur von Monozyten und A549 mit ATP wurde sogar der Ausgangswert von CCL18 ohne Ko-Kultur und ohne Stimulation unterschritten. Unter diesen Bedingungen zeigte sich kein steigernder Effekt von Apyrase auf die Konzentration von CCL18 (Abb. 8c). Die Produktion von IL-1Ra zeigte ein der Monokultur vergleichbares Muster in der Ko-Kultur mit A549 bei Stimulation mit ATP und BzATP: beide reduzierten Dosis-abhängig IL-1Ra (Abb. 8b), wohingegen die IL-1Ra-Spiegel durch die Zugabe von Apyrase unverändert blieb (Abb. 8d).

Abb. 8 a

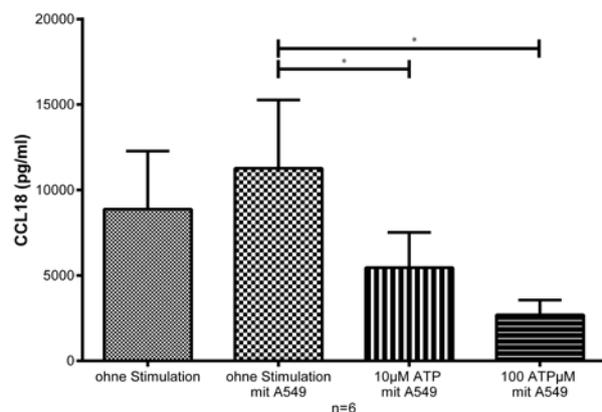


Abb. 8b

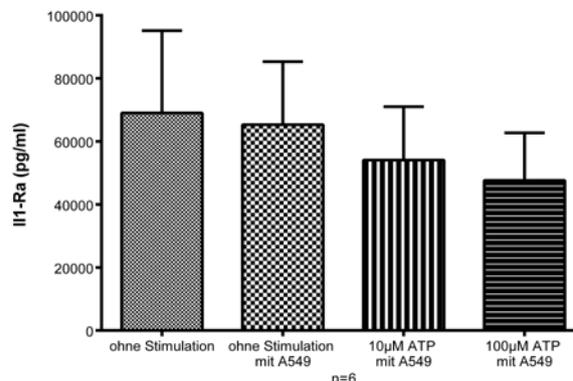


Abb. 8c

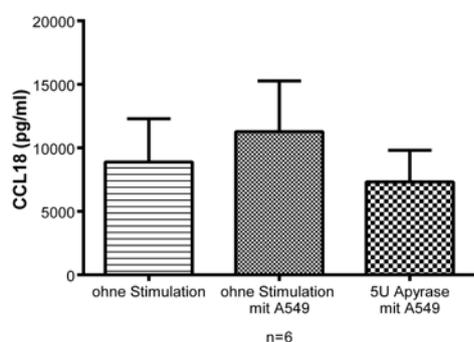


Abb. 8d

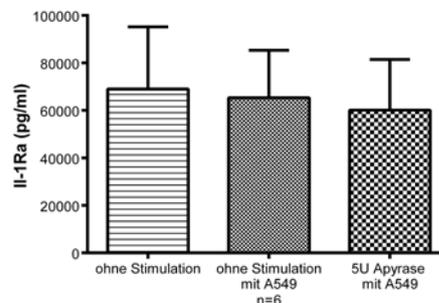


Abb. 8a-d: Zytokinspiegel von CCL18 und IL1-Ra nach 72-stündiger Kultur frisch isolierter Monozyten mit sofortiger Stimulation durch ATP (a, b), und Apyrase (c, d) in Ko-Kultur mit der Tumorzelllinie A549. Erhöhtes CCL18 durch die Ko-Kultur (a, c), dagegen Stagnation der IL1-Ra-Level (b, d). Dosisabhängige Reduktion von CCL18 und IL1-Ra durch ATP auch in Ko-Kultur mit A549. Apyrase verändert weder die Freisetzung von CCL18 noch von IL-1Ra.

Sowohl ATP als auch BzATP erhöhten die IL-1 β -Produktion marginal bei Stimulation direkt nach Beginn der Kultur; dabei kam es v.a. bei höheren Konzentrationen von BzATP zu einem Anstieg von IL-1 β , der aber sehr gering war (Abb. 9a und b). Interessanterweise ließ die direkte Zugabe von Apyrase die IL-1 β -Konzentration stark ansteigen (Abb. 9c, $p < 0.001$).

Die Ko-Kultur mit A549 führt zu einer Verdopplung der Synthese von IL-1 β und die Stimulation der Monozyten mit ATP und BzATP in der Ko-Kultur zeigte einen ähnlichen Effekt wie bereits in der Monokultur beschrieben mit einem leichten Anstieg der IL-1 β -Level (Abb. 9d und e); dagegen kam es nach der Beigabe von Apyrase zu einem ausgeprägten Zuwachs der IL-1 β -Synthese (Abb. 9f).

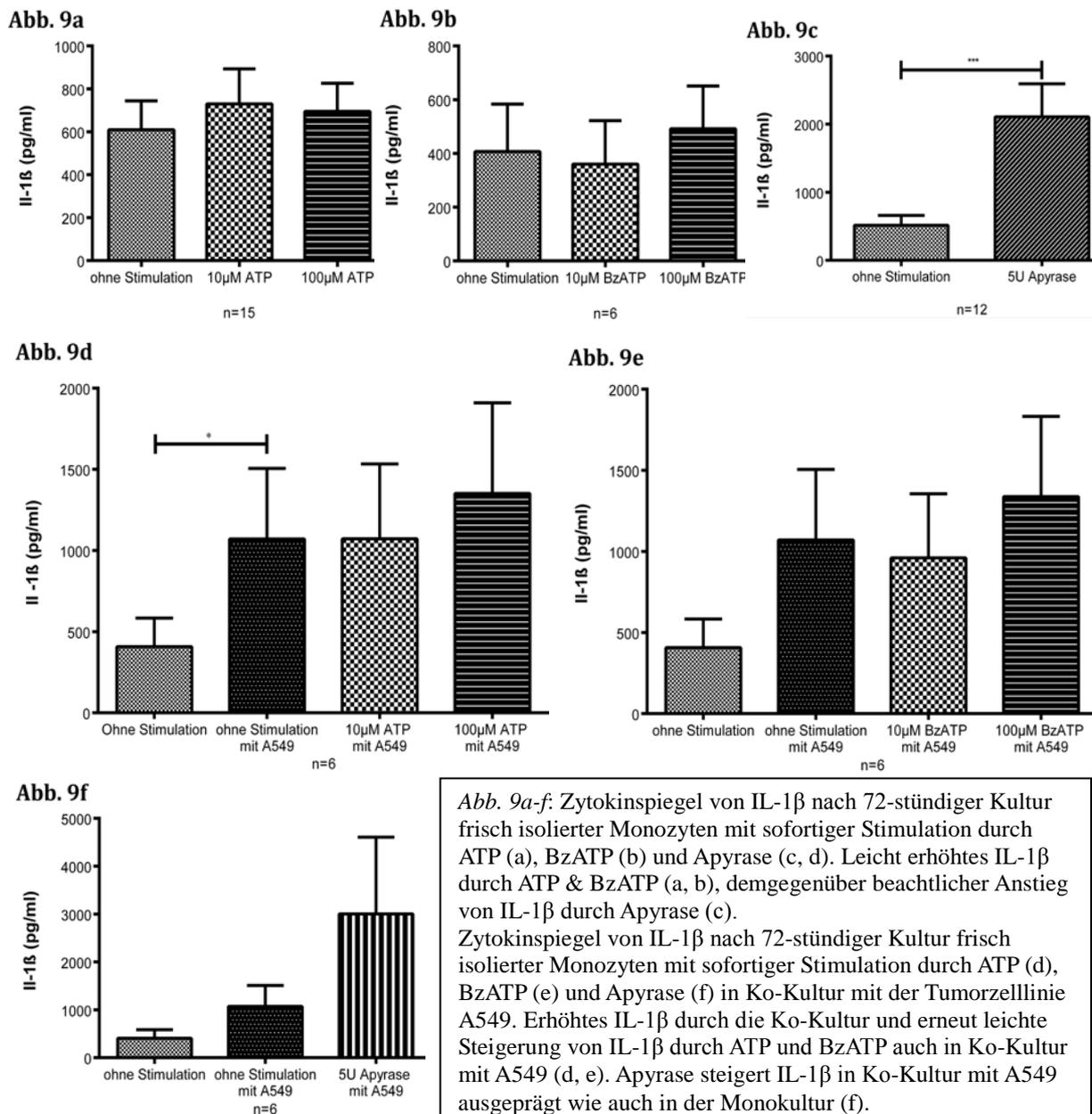


Abb. 9a-f: Zytokinspiegel von IL-1 β nach 72-stündiger Kultur frisch isolierter Monozyten mit sofortiger Stimulation durch ATP (a), BzATP (b) und Apyrase (c, d). Leicht erhöhtes IL-1 β durch ATP & BzATP (a, b), demgegenüber beachtlicher Anstieg von IL-1 β durch Apyrase (c). Zytokinspiegel von IL-1 β nach 72-stündiger Kultur frisch isolierter Monozyten mit sofortiger Stimulation durch ATP (d), BzATP (e) und Apyrase (f) in Ko-Kultur mit der Tumorzelllinie A549. Erhöhtes IL-1 β durch die Ko-Kultur und erneut leichte Steigerung von IL-1 β durch ATP und BzATP auch in Ko-Kultur mit A549 (d, e). Apyrase steigert IL-1 β in Ko-Kultur mit A549 ausgeprägt wie auch in der Monokultur (f).

Monozyten allein oder zusammen mit A549 kultiviert wurden (Abb. 10a und b, exemplarische Daten für CCL18).

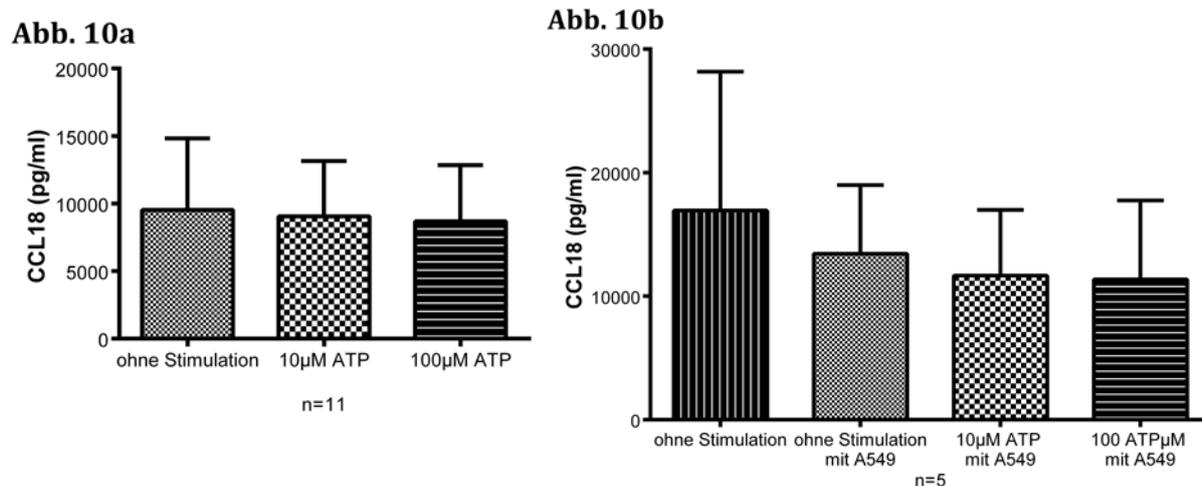


Abb. 10a, b: Zytokinspiegel von CCL18 nach 72-stündiger Kultur frisch isolierter Monozyten mit Stimulation nach 48 Stunden durch ATP, in Monokultur (a) und in Ko-Kultur mit der Tumorzelllinie A549 (b). Die CCL18-Spiegel bleiben durch die Stimulation nach 48 Stunden alleine und in Ko-Kultur unverändert zu den Leveln ohne Stimulation.

B. Einfluss von konditioniertem Medium auf Monozyten (Protokoll 3, 4 und 5)

Um weiterhin zu analysieren, ob die durch Ko-Kultur mit A549 gezeigten Resultate das Ergebnis einer direkten Interaktion zwischen den Zellen sind oder der Effekt einer löslichen Substanz und um den direkten Einfluss der A549-Zellen zu reduzieren, wurden zellfreie Überstände aus A549-Kulturen gewonnen (CM, siehe M&M, Seite 40), und die Monozyten wurden für 24 h bzw. 72 h in diesem Medium kultiviert. Dieses konditionierte Medium regulierte die CCL18-Produktion nach 24 h (Abb. 11a) und 72 h (Abb. 11 b) deutlich hoch, hingegen wurde die Synthese von IL-1 β zu beiden Zeitpunkten unterdrückt (Abb. 11a, b). Dieser Effekt von CM auf Monozyten ist unabhängig davon, ob die A549-Zellen unstimuliert waren (CM) oder zuvor mit 10µM (CM10) oder 100µM (CM100) ATP stimuliert wurden, beobachtbar (Abb. 11a, b).

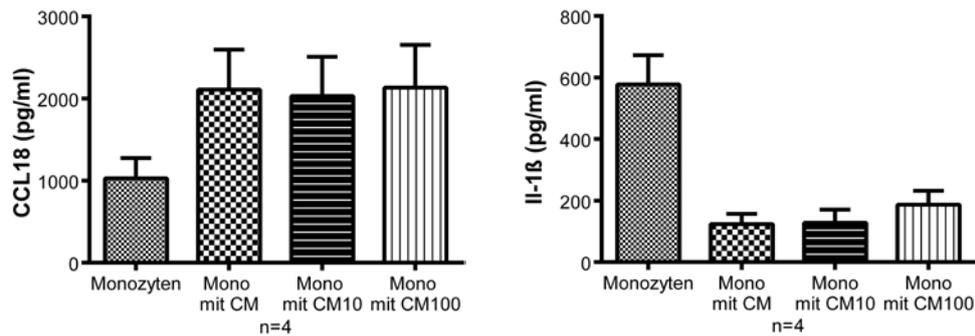
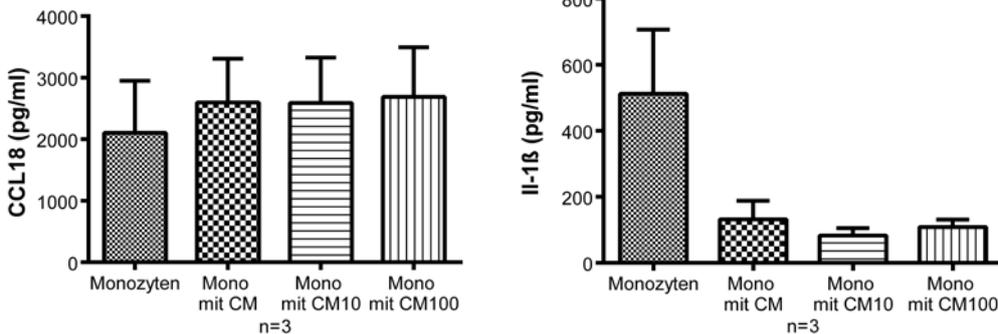
Abb. 11a**Abb. 11b**

Abb. 11a, b: Zytokinspiegel von CCL18 und IL-1β nach 24- (a) und 72- (b) stündiger Kultur frisch isolierter Monozyten in konditioniertem Medium. Die CCL18-Produktion wird durch das konditionierte Medium nach 24h und 72h Kultur erhöht, die Synthese von IL-1β sowohl nach 24h als auch nach 72h vermindert.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Zugabe von extrazellulärem ATP keinen Einfluss auf stimulatorische oder hemmende Wirkung der Zelllinie A549 hat. Der Mechanismus oder Mediator, der die Produktion von CCL18 und IL-1β durch Monozyten bei der Kultivierung in CM oder mit A549 verändert, wird nicht via ATP reguliert.

Um das Ausmaß der Effekte von ATP in Relation zu denen von CM abschätzen zu können, wurden zu den in CM kultivierten Monozyten entweder ATP oder Apyrase hinzugefügt (Protokoll 4). Die Stimulation der Monozyten mit ATP senkte die Produktion des CM-induzierten CCL18 unter die Baseline-Synthese des Zytokins ohne jegliche Stimulation; selbst die Levels von durch unstimulierten Monozyten ohne CM produziertem CCL18 wurden noch unterschritten (Abb. 12a). Dagegen erreichte die Konzentration von IL-1β unter diesen Voraussetzungen nicht einmal den Ausgangsspiegel (Abb. 12b).

Die zusätzliche Gabe von Apyrase zum CM steigerte die Produktion von CCL18 noch weiter und Apyrase trieb auch die Synthese von IL-1β ausgehend von den niedrigen Konzentrationen mit CM als Kulturmedium in die Höhe (etwa auf Baseline-Levels, vergleichbar mit Effekten von Apyrase ohne CM) (Abb. 12c, d).

Abb. 12a

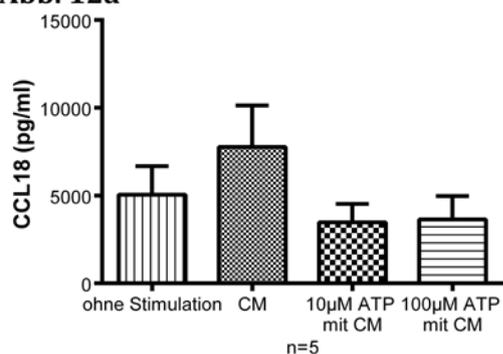


Abb. 12b

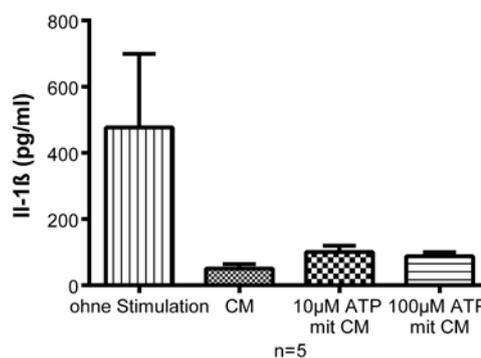


Abb. 12c

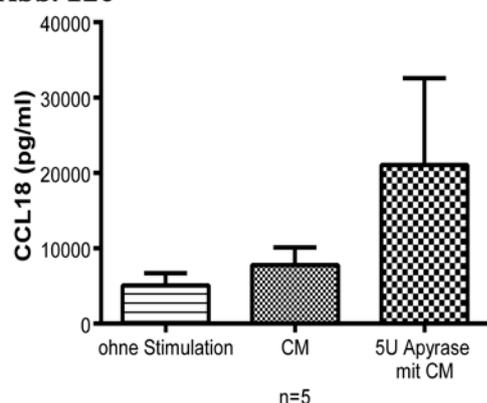


Abb. 12d

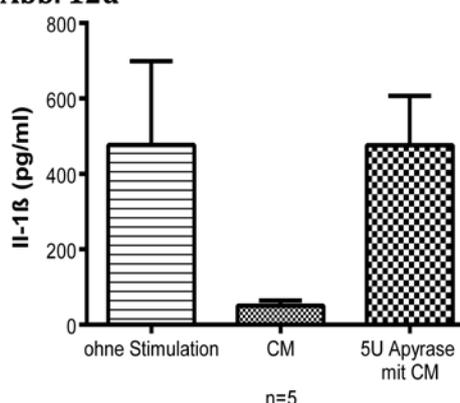


Abb. 12a-d: Zytokinspiegel von CCL18 und IL-1 β nach 72-stündiger Kultur frisch isolierter Monozyten in konditioniertem Medium und zusätzlich direkter Stimulation mit ATP (a, b) oder zusätzlich direkter Zugabe von Apyrase (c, d). Die CCL18-Produktion wird durch die Zugabe von ATP trotz Kultur in CM (a) reduziert (sogar unter die Baseline-Synthese ohne Stimulation). Die durch die Kultur in CM stark reduzierte IL-1 β -Produktion wird durch ATP leicht erhöht, erreicht aber nicht die Ausgangswerte ohne Stimulation (b). Die CCL18-Produktion wird durch die Zugabe von Apyrase noch über die Zytokinspiegel allein in CM erhöht (c). Apyrase erhöht die durch die Kultur in CM stark reduzierte IL-1 β -Produktion wieder aus das Baseline-Niveau ohne Stimulation (d).

Auch in diesem Ansatz mit CM (Protokoll 5, siehe Material und Methoden) führte eine zusätzliche Stimulation der in CM kultivierten Monozyten mit ATP nach 48 h zu keiner Änderung der Konzentrationen von CCL18 oder IL-1 β gegenüber der jeweiligen Ausgangskonzentration in den Kulturen mit CM allein (Abb. 13a, b).

Demgegenüber führt konditioniertes Medium zu deutlich erhöhten CCL18- und verminderten IL-1 β -Konzentrationen bei direkter Zugabe (s.o.). Weiterhin hat nach 48 h hinzugefügte Apyrase keinen Einfluss auf die IL-1 β -Konzentration, wohingegen die Spiegel von CCL18 minimal und nicht-signifikant erhöht wurden (Daten nicht gezeigt).

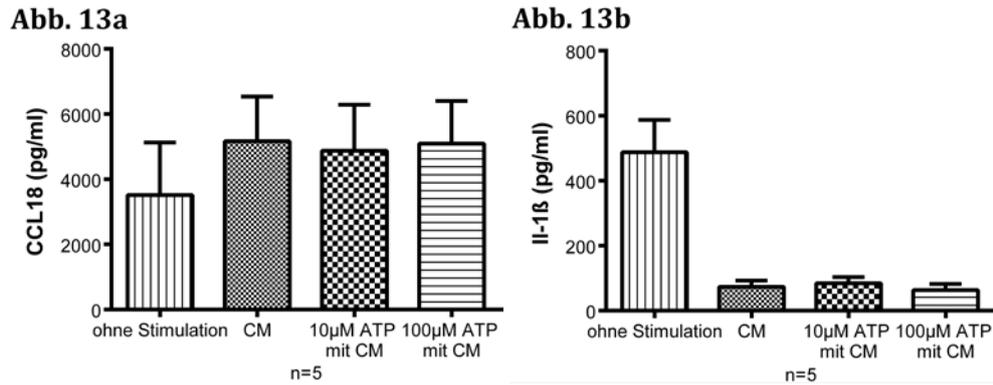


Abb. 13a, b: Zytokinspiegel von CCL18 und IL-1 β nach 72-stündiger Kultur frisch isolierter Monozyten in konditioniertem Medium und zusätzlich Stimulation mit ATP nach 48h. Nach Zugabe von ATP nach 48h zeigt sich auch hier keine Veränderung der bereits durch CM erhöhten CCL18-Spiegel (a) bzw. verminderten IL-1 β -Produktion (b).

C. CCL18- und IL-1 β -Konzentrationen nach kombinierter Stimulation mit ATP oder Apyrase und LPS (Protokoll 4 und 5)

Die sofortige Stimulation (0 h) von Monozyten mit 0,1 μ g/ml oder 1 μ g/ml LPS resultierte in keiner signifikanten Reduktion der CCL18-Produktion. Allerdings steigerte diese Stimulation signifikant die Freisetzung von IL-1 β . Abb. 14a veranschaulicht, dass die gleichzeitige Stimulation mit LPS und ATP die Produktion von CCL18 senkt, die Synthese von IL-1 β verharrt dagegen unverändert bei den hohen Levels, die mit der einfachen Stimulation mit LPS allein vergleichbar sind (Abb. 14b). Die simultane Stimulation der Monozyten mit LPS und Apyrase hob die Konzentrationen von CCL18 und IL-1 β auf Werte an, die nach der alleinigen Zugabe von Apyrase beobachtet werden konnten. (Abb. 14c).

Abb. 14a

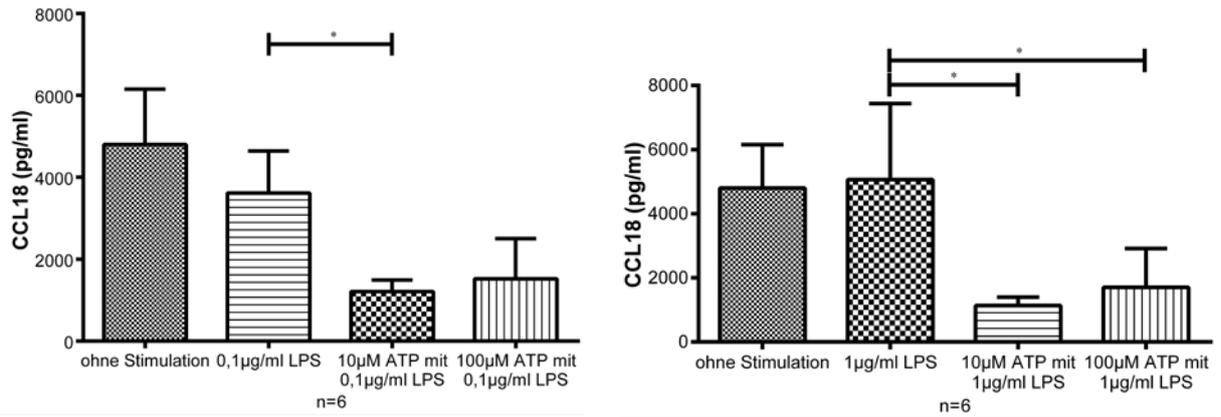


Abb. 14b

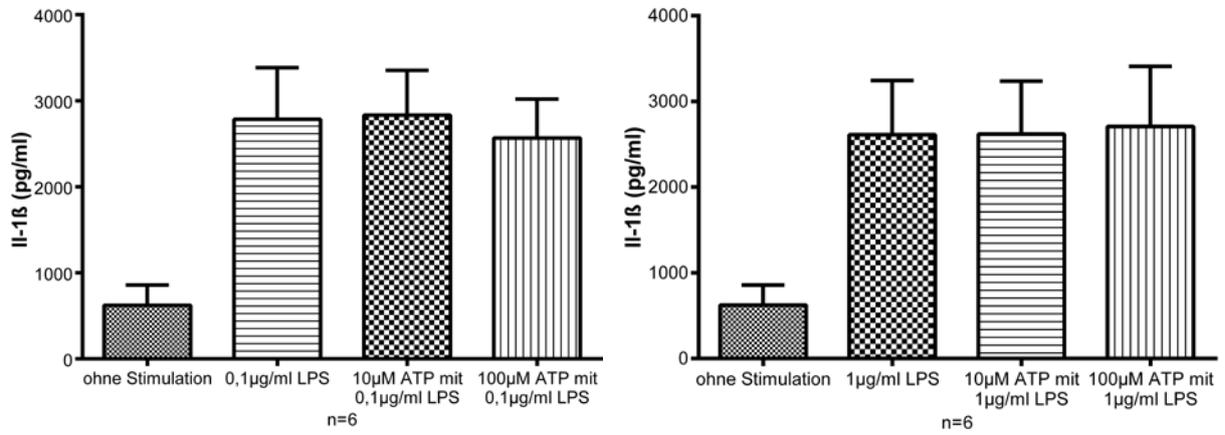


Abb. 14a, b: Zytokinspiegel von CCL18 und IL-1 β nach 72-stündiger Kultur frisch isolierter Monozyten nach direkter Stimulation mit LPS und ATP. Die CCL18-Produktion wird durch die Zugabe von LPS nur gering beeinflusst, durch Zugabe von ATP aber vermindert (a). Die IL-1 β -Synthese wird durch LPS deutlich erhöht und bleibt auch nach Stimulation mit ATP auf diesem hohen Niveau (b).

Abb. 14c

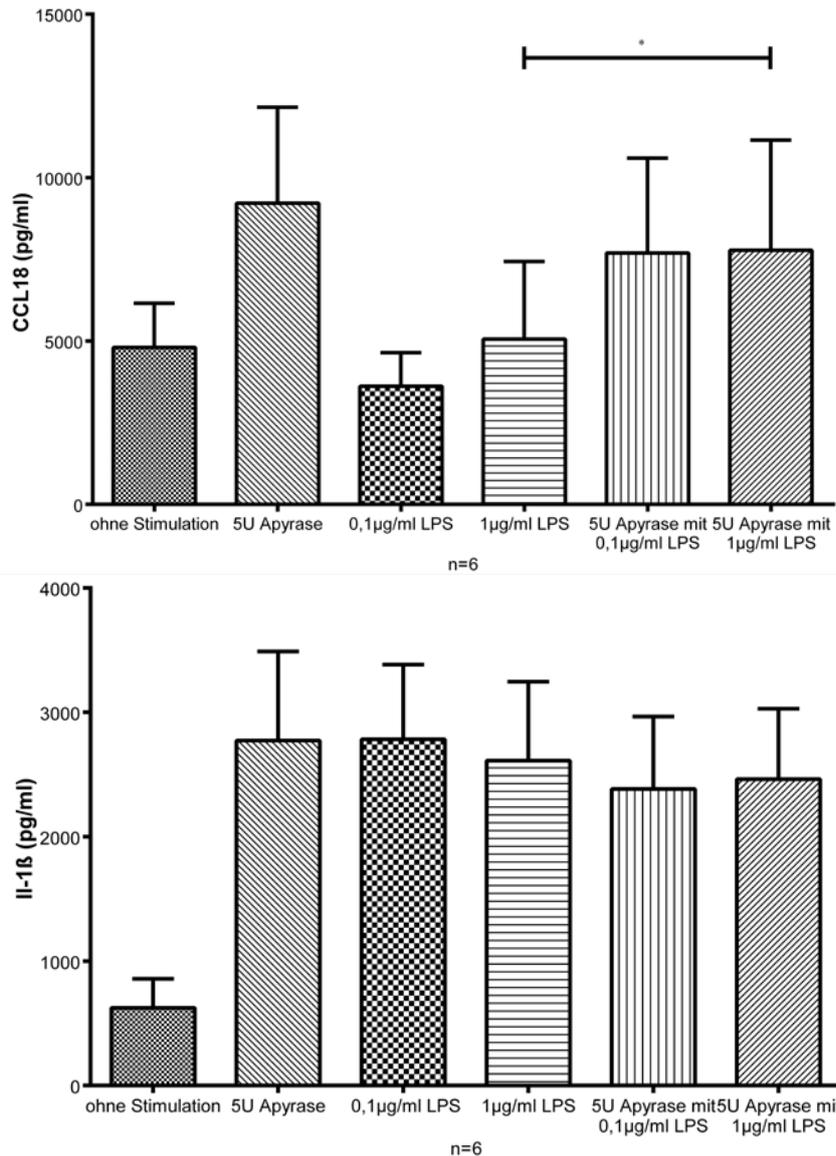


Abb. 14c: Zytokinspiegel von CCL18 und IL-1 β nach 72-stündiger Kultur frisch isolierter Monozyten und direkter Stimulation mit LPS und Apyrase. Die CCL18-Produktion wird erneut durch LPS nur gering verändert und durch die Zugabe von Apyrase zusätzlich zu LPS deutlich erhöht (vergleichbar zur alleinigen Stimulation mit Apyrase). Die Stimulation mit Apyrase und LPS zeigt auf die durch LPS bzw. Apyrase bereits in alleiniger Stimulation erhöhte IL-1 β -Produktion keinen zusätzlichen Effekt.

Wie zuvor gezeigt, führt die Kultivierung der Monozyten in CM zu erhöhten CCL18- und reduzierten IL-1 β -Konzentrationen. Allerdings erhöht eine Stimulation mit LPS zusätzlich zum CM sowohl CCL18 als auch IL-1 β über die Ausgangskonzentration (Abb. 15a, b).

Dagegen kam es zu einem Abfall von CCL18 bei der Stimulation von in CM kultivierten Monozyten mit LPS und ATP (Abb. 15a). Interessanterweise erhöhte sich der Spiegel an IL-1 β nicht über das Level, das bereits durch die Zugabe von LPS und CM allein erreicht wurde, wenn die CM-kultivierten Monozyten mit LPS und zusätzlich ATP stimuliert

wurden (Abb. 15b). Ein vergleichbares Muster zeigten die Zytokine bei der Stimulation von CM-kultivierten Monozyten mit LPS und der Zugabe von Apyrase. Die CCL18-Freisetzung fiel nicht unter das Level, das mit Apyrase allein erreicht wurde (Abb. 15c). Nach der Kombination von Apyrase mit LPS und CM überstieg auch die IL-1 β -Konzentration nicht den mit LPS in Kombination mit CM erreichten Spiegel (Abb. 15c).

Abb. 15a

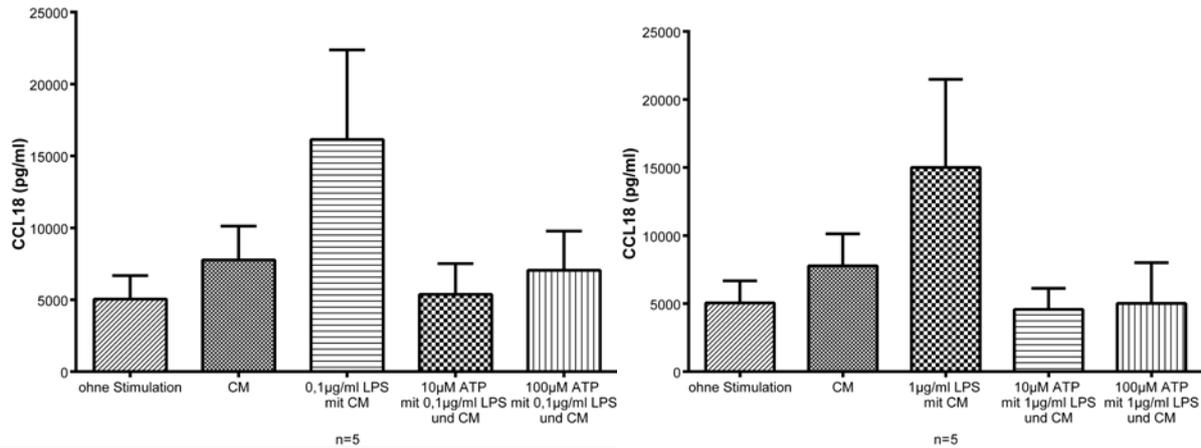


Abb. 15b

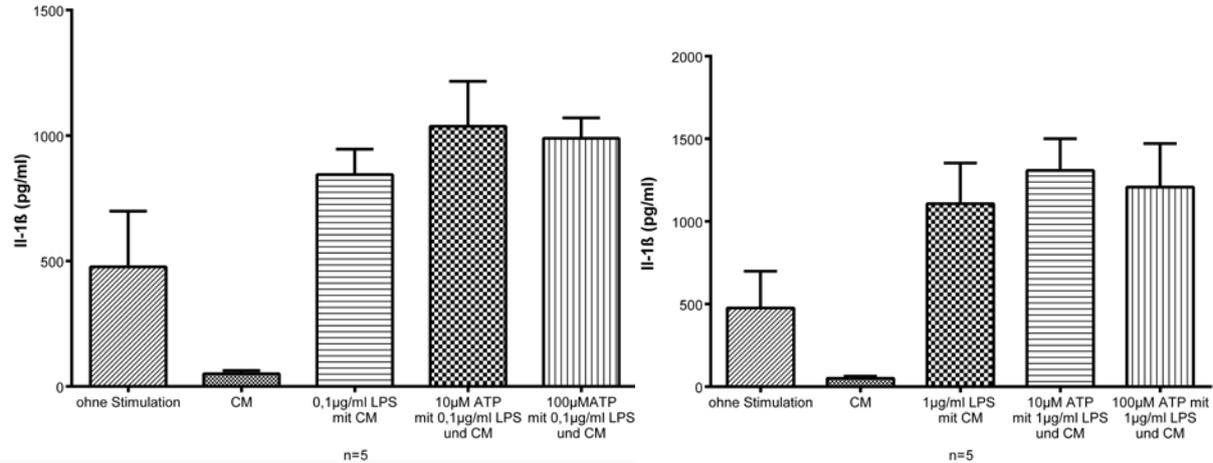


Abb. 15a, b: Zytokinspiegel von CCL18 (a) und von IL-1 β (b) nach 72-stündiger Kultur frisch isolierter Monozyten ohne Stimulation bzw. in CM und mit direkter Stimulation mit LPS und ATP. Die CCL18-Produktion wird durch die Kultur in CM erhöht. Durch zusätzliche Stimulation mit LPS steigt der Spiegel von CCL18 (a) noch weiter. Eine Zugabe von ATP und LPS senkt die Synthese von CCL18 wieder auf das Baseline-Niveau von CCL18 ohne Stimulation oder Kultur in CM.

Die von IL-1 β -Produktion wird durch die Kultur in CM vermindert. Durch zusätzliche Stimulation mit LPS steigt der Spiegel von IL-1 β über das Baseline-Niveau ohne Stimulation (b). Eine zusätzliche Stimulation mit ATP verändert die Synthese von IL-1 β nur unwesentlich im Vergleich zur Stimulation mit LPS allein.

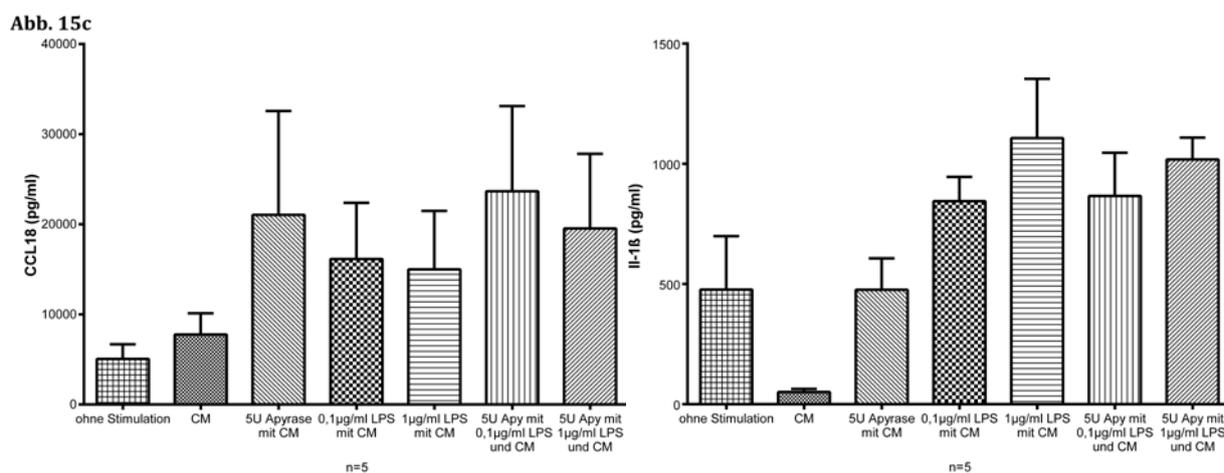


Abb. 15c: Zytokinspiegel von CCL18 und IL-1 β nach 72-stündiger Kultur frisch isolierter Monozyten ohne Stimulation bzw. in CM und mit direkter Stimulation mit LPS und Apyrase. Die CCL18-Produktion wird erneut durch CM leicht erhöht und durch die Zugabe von Apyrase zusätzlich zur Kultur in CM deutlich erhöht. Durch Kultur in CM und Stimulation mit LPS wird die CCL18-Produktion im Vergleich zu CM allein erhöht. Durch Kultur in CM und Stimulation mit LPS und Apyrase wird die CCL18-Synthese auf Werte vergleichbar mit denen der Kultur in CM und Stimulation mit Apyrase alleine erhöht. Die IL-1 β -Produktion wird erneut durch CM deutlich vermindert und durch die Zugabe von Apyrase zusätzlich zur Kultur in CM werden wieder die Baseline-Level der Kultur ohne Stimulation erreicht. Durch Kultur in CM und Stimulation mit LPS wird die IL-1 β -Produktion im Vergleich zu CM allein sehr deutlich erhöht. Durch Kultur in CM und Stimulation mit LPS und Apyrase wird die IL-1 β -Synthese auf Werte vergleichbar mit denen der Kultur in CM und Stimulation mit LPS alleine erhöht.

Des Weiteren veränderte eine Stimulation der in CM kultivierten Monozyten mit LPS nach 48 h die Freisetzung von CCL18 oder IL-1 β nicht über die Ausgangslevel, die mit CM als Medium sowieso erreicht wurden. Auch die kombinierte Stimulation der Monozyten mit ATP und LPS nach 48 h hatte keinen Einfluss auf die Zytokinproduktion. Darüber hinaus hatte die Zugabe von Apyrase zusammen mit LPS nach 48 h Kulturdauer keine Auswirkungen auf die IL-1 β -Konzentration, während der Spiegel von CCL18 durch diese Stimulation marginal erhöht wurde (alle p-Werte > 0.05, Daten nicht abgebildet).

D. Blockade der purinergen Rezeptoren mit Antagonisten (Protokoll 6)

Der Breitspektrum-P2X- und -P2Y-Rezeptor-Antagonist Suramin als auch der selektive P2X₇-Antagonist KN62 alleine zeigten keinen Effekt auf die CCL18- und IL-1 β -Produktion der Monozyten; dagegen erhöhte PPADS, ein unselektiver P2-Rezeptor-Inhibitor, sowohl die CCL18- als auch IL-1 β -Konzentration (Abb. 16a).

Außer KN62, welches zu einer statistisch signifikanten zusätzlichen Reduktion der Konzentration von CCL18 führte, hatte keiner der anderen Antagonisten einen signifikanten Einfluss auf die Auswirkungen der ATP-Stimulation, noch konnte einer der erwähnten

Antagonisten auch nur annähernd die Effekte von ATP auf die Synthese von CCL18 supprimieren (Abb. 16b).

Abb. 16a

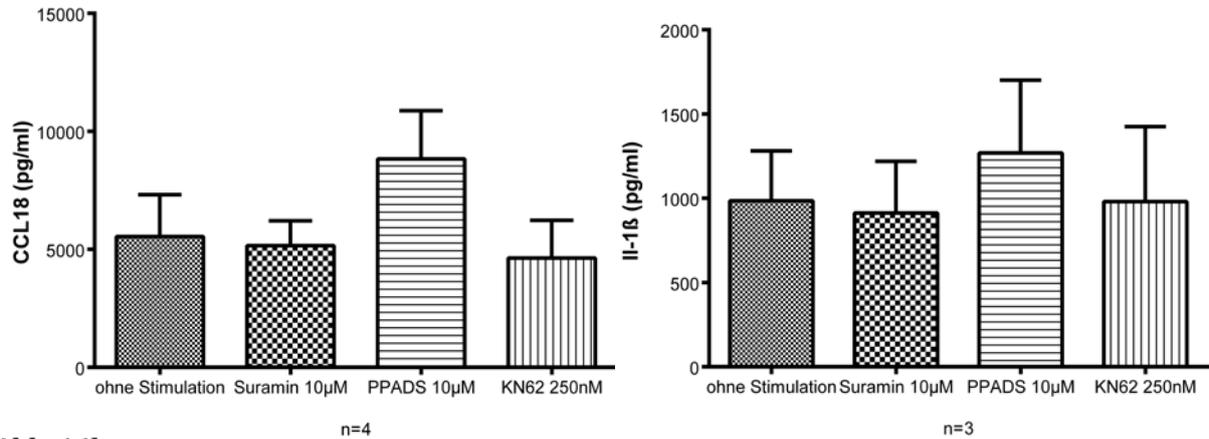


Abb. 16b

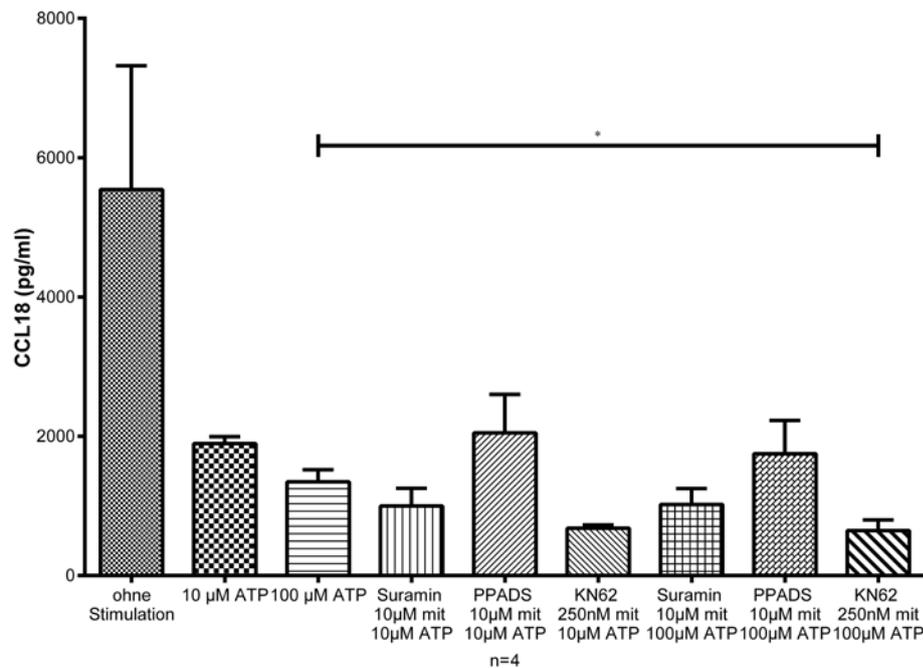


Abb. 16a, b: Zytokinspiegel von CCL18 und IL-1β nach 72-stündiger Kultur frisch isolierter Monozyten ohne Stimulation bzw. nach Zugabe der Inhibitoren Suramin, PPADS und KN62 (a). Die CCL18- und die IL-1β-Produktion wird durch die Zugabe von PPADS erhöht und bleiben durch die Gabe von Suramin und KN62 unverändert (a). Zytokinspiegel von CCL18 nach 72-stündiger Kultur frisch isolierter Monozyten ohne Stimulation bzw. nach Stimulation mit ATP allein und nach Stimulation mit ATP und Zugabe der Inhibitoren Suramin, PPADS und KN62 (b). ATP vermindert dosisabhängig die Produktion von CCL18. Suramin zeigt keinen Einfluss auf diese Reduktion. Bei Zugabe von PPADS zeigt sich ein geringer Anstieg der CCL18-Produktion vergleichbar zur Wirkung von PPADS ohne zusätzliche ATP-Stimulation. KN62 verringert zusätzlich zur Stimulation mit ATP die CCL18-Synthese noch weiter (b).

Aus Abb. 16c wird ersichtlich, dass sich die Effekte der Antagonisten auf die Produktion von IL-1β ähnlich darstellten und keiner der Hemmstoffe den Effekt von ATP inhibieren konnte. Allein Suramin hatte einen leicht antagonistischen Effekt auf

niedrigdosiertes ATP. PPADS hingegen verstärkte den Effekt von hochdosiertem ATP sogar noch leicht.

Abb. 16c

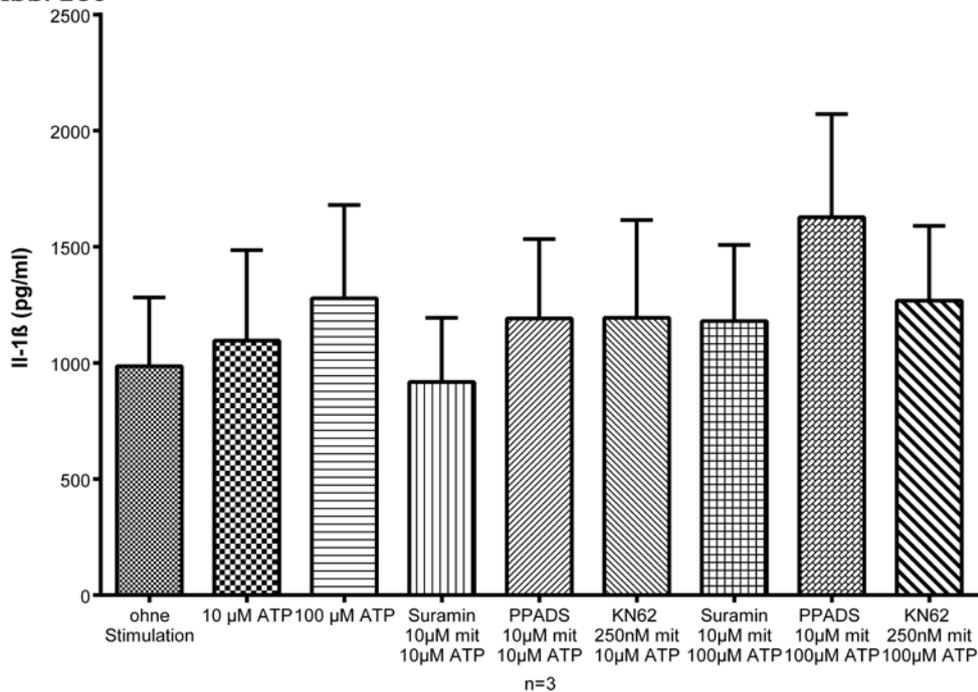


Abb. 16c: Zytokinspiegel von IL-1 β nach 72-stündiger Kultur frisch isolierter Monozyten ohne Stimulation bzw. nach Stimulation mit ATP allein und nach Stimulation mit ATP und Zugabe der Inhibitoren Suramin, PPADS und KN62. ATP erhöht dosisabhängig die Produktion von IL-1 β . Suramin inhibiert die durch ATP erhöhte IL-1 β -Produktion bei niedriger ATP-Dosierung, nicht bei hoher ATP-Dosis. PPADS und KN62 zeigen bei Stimulation mit niedrigdosiertem ATP keinen Effekt, KN62 auch nicht bei einer Stimulation mit hoher ATP-Dosis. PPADS erhöht die IL-1 β -Synthese noch bei Stimulation mit hochdosiertem ATP.

E. ADP, AMP und Adenosin zeigen vergleichbare Effekte auf CCL18- und IL-1 β -Spiegel wie ATP (Protokoll 6)

ADP und AMP sind Produkte der ATP-Hydrolyse durch Apyrase und andere Nukleasen. Daher sollte auch der Einfluss dieser Intermediate untersucht werden. Die Monozyten wurden hierzu mit 10 μ M oder 100 μ M ADP, AMP respektive 1 μ M, 10 μ M oder 50 μ M Adenosin stimuliert. ADP und AMP reduzierten beide die Konzentrationen von CCL18 auf ein Level, vergleichbar zu den Spiegeln nach ATP-Stimulationen (Abb. 17a, b). Adenosin zeigte eine Dosis-abhängige Reduktion von CCL18 in niedrigeren Konzentrationen, während der Effekt mit höheren Konzentrationen weniger ausgeprägt war (Fig. 17c). Im Gegensatz dazu erhöhte es die Konzentration von IL-1 β in einer eindeutig Dosis-abhängigen Weise (Abb. 17d). Sowohl ADP als auch AMP hatten einen zu der Stimulation mit ATP vergleichbaren Effekt auf die Synthese von IL-1 β mit einer Erhöhung der Konzentrationen (Abb. 17a, b).

ADP und AMP zeigten also beide ähnliche Effekte auf die Synthese von CCL18, vergleichbar mit denen von ATP, wenngleich bei den verwendeten Konzentrationen keine Dosisabhängigkeit des Effekts zu beobachten war.

Abb. 17a

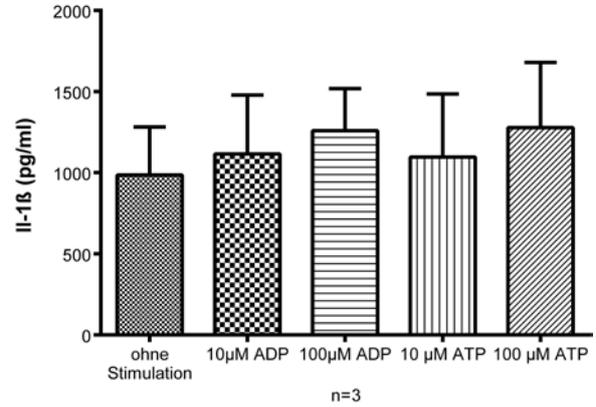
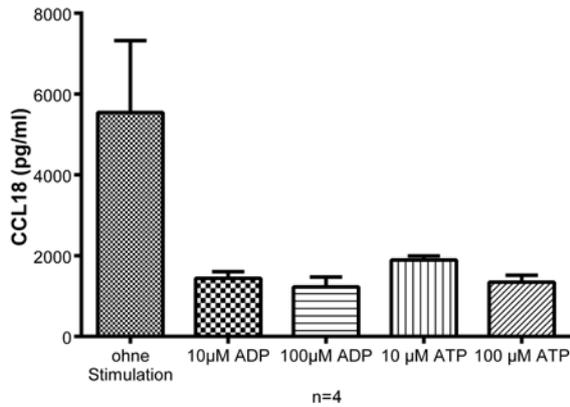


Abb. 17b

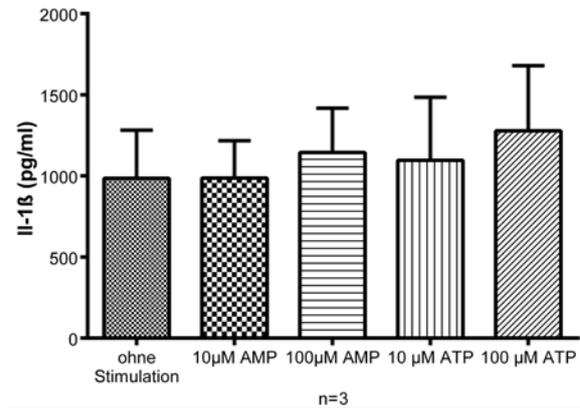
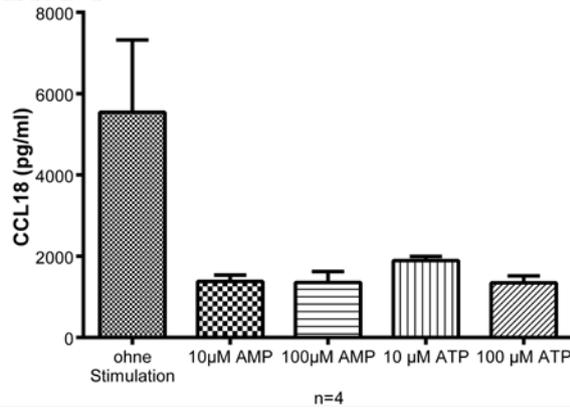


Abb. 17a, b: Zytokinspiegel von CCL18 und IL-1 β nach 72-stündiger Kultur frisch isolierter Monozyten nach Stimulation mit ATP (a, b) im Vergleich zu Stimulation mit ADP (a) oder AMP (b). ADP und AMP reduzieren die CCL18-Produktion vergleichbar zur Reduktion durch ATP. ADP und AMP erhöhen die IL-1 β -Synthese dosisabhängig vergleichbar zur Steigerung der Produktion durch ATP.

Abb. 17c

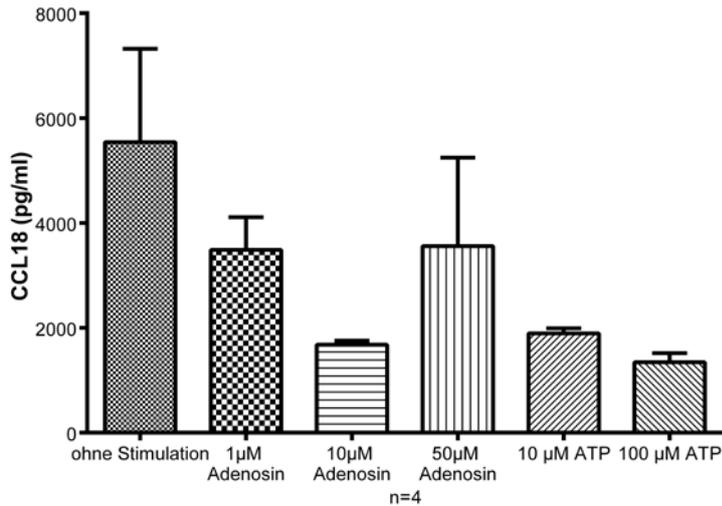


Abb. 17d

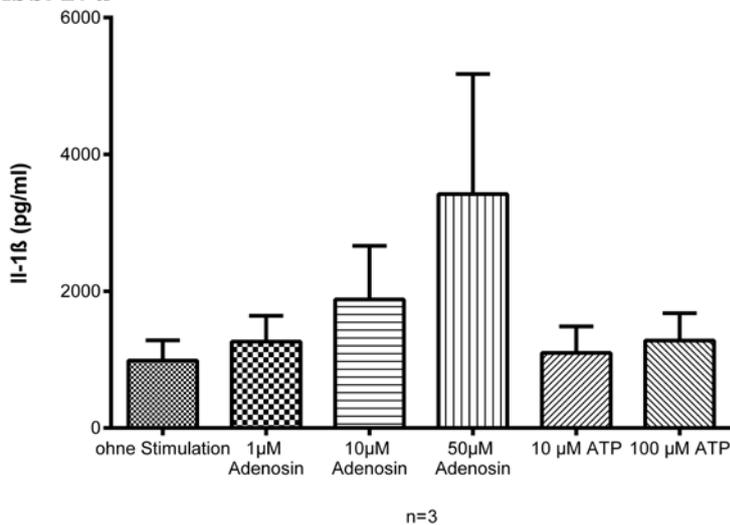


Abb. 17c, d: Zytokinspiegel von CCL18 und IL-1 β nach 72-stündiger Kultur frisch isolierter Monozyten nach Stimulation mit ATP im Vergleich zu Adenosin. Adenosin reduziert die CCL18-Produktion (c). Adenosin steigert die IL-1 β -Synthese dosisabhängig (d).

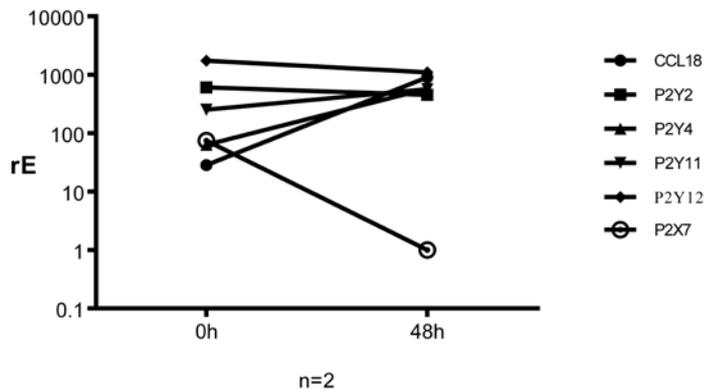
F. *P2X₇ vermittelt den Effekt von ATP auf CCL18 (Protokoll 7)*

Da die bisherigen Ergebnisse der Arbeit gezeigt hatten, dass die Stimulation mit ATP nach 48 h Kulturdauer keinen Einfluss auf die Produktion von Zytokinen mehr hat, war es vorstellbar, dass der/die Rezeptor/en, der/die für die Vermittlung der Effekte des ATP verantwortlich ist/sind, während der Differenzierung verloren geht/gehen. Um diese Hypothese zu überprüfen, untersuchte ich die Gen-Expression verschiedener purinerge Rezeptoren (P2Y₁, P2Y₄, P2Y₁₁, P2Y₁₂ und P2X₇) im Vergleich zur CCL18-Expression über

die Zeit, um den Rezeptor zu ermitteln, dessen Synthese während fortschreitender

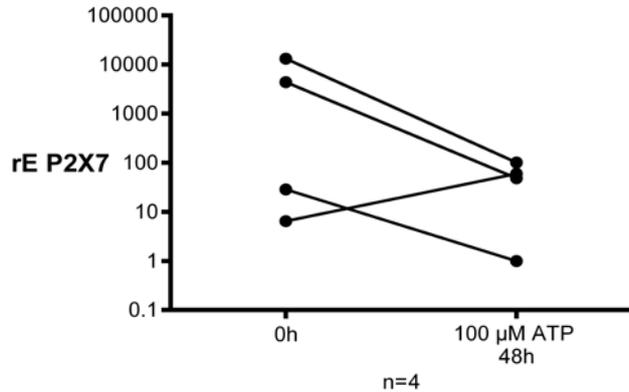
Kulturdauer abfällt.

Abb. 18a



Die durchgeführte quantitative Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion qRT-PCR der Monozyten nach 24 h und 48 h Kultur zeigte, dass die Expression der purinergen Rezeptoren P2Y₂, P2Y₄, P2Y₁₁ und P2Y₁₂ stabil blieb oder mit fortschreitender Zeit sogar noch zunahm. Im Gegensatz dazu fiel die Expression von P2X₇ als einziger der untersuchten Rezeptoren mit der Zeit ab (Abb. 18a).

Abb. 18b



Auch bei Stimulation der Monozyten mit ATP zu Beginn der Kultur kommt es zu einer Herunterregulierung von P2X₇ nach 48h Kulturdauer (Abb. 18b).

Abb. 18a, b: Expression von CCL18 sowie der Rezeptoren P2Y₂, P2Y₄, P2Y₁₁, P2Y₁₂ und P2X₇ frisch isolierter Monozyten ohne Stimulation direkt nach der Isolation sowie nach 48h (a). Die Expression des Rezeptors P2X₇ nimmt nach 48h deutlich ab, die Expression von CCL18 sowie der anderen Rezeptoren bleibt dagegen erhalten.

Expression von P2X₇ frisch isolierter Monozyten direkt nach der Isolation sowie nach Stimulation mit ATP nach 48h (a). Die Expression des Rezeptors P2X₇ nimmt auch nach Stimulation nach 48h deutlich ab (Einzelresultate dargestellt, b).

5. Diskussion

Abhängig vom verwendeten Stimulus führt die Aktivierung von Monozyten und Makrophagen zu einem sehr bunten Bild an Phänotypen, die sich in den beiden Extremen der M1- und M2-Makrophagen ausprägen.^(Schraufstatter, Zhao et al., 2012) Der klassisch aktivierte M1-Phänotyp zeigt entzündungsfördernde Makrophagen, die durch IFN- γ und/oder LPS aktiviert werden. Sie lassen sich durch eine hohe Expression pro-inflammatorischer Zytokine, der iNOS und die Produktion von ROS charakterisieren.^{(Gordon, 2003), (Grage-Griebenow, Flad et al., 2001)} Alternativ aktivierte M2-Makrophagen durchlaufen eine Zellaktivierung als Antwort auf Th2-Zytokine wie IL-4, IL-13 (M2a-Makrophagen), Immunkomplexe mit LPS oder IL-1 β (M2b-Makrophagen), IL-10, TGF- β , Glukokortikoiden (M2c-Makrophagen) oder auf bislang unbekannte Stimuli, die von Tumorzellen und Fibroblasten stammen.^{(Gordon, 2003), (Müller-Quernheim, Potthast et al., 2012), (Prasse, Pechkovsky et al., 2006), (Pechkovsky, Prasse et al., 2010), (Grage-Griebenow, Flad et al., 2001)}

Die Produktion von CCL18 ist ein typischer Marker für alternativ aktivierte Makrophagen^(Gustafsson, Mjösberg et al., 2008), während mit CCL18 stimulierte Monozyten selbst morphologisch IL-4-stimulierten M2-Makrophagen ähneln.^(Schraufstatter, Zhao et al., 2012) Inzwischen ist klar, dass CCL18 nicht nur ein chemischer Lockstoff ist, sondern auch die Generation regulatorischer T-Zellen Treg^(Chang, de Nadai et al., 2010) und die Produktion von Kollagen durch Fibroblasten induziert.^{(Atamas, Luzina et al., 2003), (Luzina, Tsybalyuk et al., 2006)} CCL18 spielt daher eine wichtige Rolle in der Immunopathogenese von fibrotischen Erkrankungen wie der IPF^{(Prasse, Probst et al., 2009), (Prasse, Pechkovsky et al., 2007)} und bei Malignomen.^{(Schutyser, Struyf et al., 2002), (Leung, Yuen et al., 2004), (Struyf, Schutyser et al., 2003), (Ploenes, Scholtes et al., 2013)}

Extrazelluläre ATP-Level werden physiologisch durch ein Gleichgewicht aus Freisetzung und Abbau gesteuert. In gesunden Geweben ist die Konzentration von ATP durch die eng regulierte Freisetzung niedrig. Bei dem Umbau der Lunge im Rahmen der Lungenfibrose oder der Tumorentstehung wird die Gewebearchitektur zerstört, wodurch ATP in den extrazellulären Raum freigesetzt wird. Forschungsergebnisse konnten zuvor zeigen, dass die Konzentration von ATP in den BALF von Patienten mit IPF im Vergleich zu gesunden Personen deutlich erhöht ist.^(Riteau, Gasse et al., 2010) Zudem wurden erhöhte ATP-Spiegel in Gebieten mit Tumorwachstum nachgewiesen.^(Pellegatti, Raffaghello et al., 2008) ATP ist also ein „danger signal“, welches zu einer Aktivierung im Sinne des M1-Phänotyps der Makrophagen führen müsste, trotzdem zeigt sich wie oben beschrieben eine M2-Polarisation.

In dieser Arbeit wurde daher untersucht, inwieweit eATP die M1/M2-Aktivierung von Makrophagen beeinflusst und in welchem Umfang dieser Einfluss eine zeitliche Komponente aufweist.

A. M1-Aktivierung durch ATP

ATP führt in seiner Funktion als „danger signal“ zu einer Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen (APC), welche dendritische Zellen, B-Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten umfassen, wodurch es wiederum zu einer Aktivierung von T-Lymphozyten kommt. ^(Gallucci & Matzinger, 2001) Bei Entzündungen als Ergebnis von Zelluntergang zeigen sich sehr hohe Konzentration von ATP in der Umgebung der entzündeten Region bis in den millimolaren-Bereich. ^(Van Furth, 1982) Diese hohen ATP-Spiegel scheinen entzündlichen Kaskaden anzustoßen, welche zur Produktion inflammatorischer Mediatoren, wie Eikosanoide (z.B. Prostaglandin E2 via COX-2) und Thromboplastin, durch monozytäre Zellen führen. ^{(Dubois, Abramson et al., 1998), (Neary, Rathbone et al., 1996), (Penglis, Cleland et al., 2000), (Bolego, Ceruti et al., 1997), (Lwaleed, Bass et al., 2001)} Stimulation mit LPS und ATP führt zur Reifung und Freisetzung von IL-1 β . ^(Ferrari, Chiozzi et al., 1997) Besonders die kontinuierliche Stimulation mit ATP in höheren Konzentrationen über Stunden hinweg führt zur Apoptose mit DNA-Fragmentierung und letztendlich dem Zusammenbruch des Zellkerns. ^{(Schulze-Lohoff, Hugo et al., 1998), (Zheng, Zychlinsky et al., 1991)} Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch die Balance zwischen ATP und den P2-Rezeptoren, deren Aktivierung eher pro-inflammatorisch wirkt, und Adenosin mit seinen immunsuppressiven P1-Rezeptoren. Dieses Verhältnis, hauptsächlich bedingt durch die Nukleotidasen CD39 und CD73, gerät bei vielen Erkrankungen aus dem Gleichgewicht. So führt bei Tumorerkrankungen beispielsweise die Induktion von Ektonukleotidasen zur Inhibition von T-Lymphozyten, während sich demgegenüber bei der akuten Lungenverletzung ein erhöhter ATP-Spiegel mit einer Aktivierung von P2-Rezeptoren zeigt, welche zu einer verstärkten Inflammation und Gefäßleckage führt. ^{(Deaglio, Dwyer et al., 2007), (Jin, Fan et al., 2010), (Eckle, Fullbier et al., 2007)}

Wir analysierten beispielhaft die Produktion der Zytokine CCL18 und IL-1Ra auf der einen und IL-1 β und TNF- α auf der anderen Seite, um die extremen Endpunkte der Makrophagen-Aktivierung zwischen M1 und M2 widerzuspiegeln. Wie erwartet erhöhte die Stimulation mit dem Danger-Signal ATP die Freisetzung von IL-1 β leicht und zeigte damit eine M1-Aktivierung an, was auf bekannte Effekte zurückzuführen ist. ^{(Ferrari, Chiozzi et al., 1997),}

(Griffiths, Stam et al., 1995) Dieser Anstieg war gering, da die Ko-Stimulation mit LPS, welche nach derzeitigem Stand der Forschung wahrscheinlich zusammen mit ATP zur Reifung von IL-1 β notwendig ist - LPS induziert pro-IL-1 β , welches im durch ATP aktivierten Inflammasom durch die Caspase zu reifem IL-1 β prozessiert wird - in diesem Versuchsaufbau ausgeblieben war. In diesem Aufbau kam es zu einem nur geringen Anstieg von IL-1 β , da für die Prozessierung von IL-1 β durch die alleinige Simulation mit ATP schon ein steady state von pro-IL-1 β vorhanden sein muss. Hingegen fiel die CCL18-Konzentration beständig mit steigender ATP-Stimulation. Ein ähnlicher Effekt der Reduktion auch auf pro-inflammatorische, anti-fibrotische Zytokine wie CCL2 und CCL3 wurde bereits für dendritische Zellen beschrieben. Auch die Spiegel von IL-1Ra fielen mit steigender ATP-Konzentration, was kongruent mit den anderen Ergebnissen ist und ebenfalls auf eine M1-Aktivierung hindeutet, allerdings im Widerspruch zu Beobachtungen an dendritischen Zellen und deren Stimulation mit ATP steht. (la Sala, Ferrari et al., 2001)

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen erhöhte sich die Freisetzung von CCL18 durch die Ko-Kultivierung der Monozyten mit der Tumorzelllinie A549, was als Modell für die Aktivierung der Monozyten zu Tumor-assoziierten Makrophagen stellvertretend für die M2-Seite der Makrophagen-Aktivierungsmuster dient. ATP kann unter bestimmten Umständen sowohl von A549 (unter anderem durch Stress infolge einer hypotonen Umgebung)^(Tatur, Groulx et al., 2007) als auch durch autokrine Stimulation von Monozyten freigesetzt werden.^(Piccini, Carta et al., 2008) Diese ATP-Freisetzung müsste zu einer Verminderung von CCL18 führen. Gleichzeitig exprimiert die Tumorzelllinie A549 Ectonucleotidasen wie z.B. CD73, sodass sich durch die Kokultur mit A549 und den Abbau von Nukleotiden durch Ectonucleotidasen ein ähnlicher Effekt wie durch die Zugabe von Apyrase mit einer erhöhten CCL18-Freisetzung zeigen könnte.^(Grozio, Sociali et al., 2013) Abgesehen von dieser Wirkung von Nucleotidasen ist es möglich, dass durch die Tumorzelllinie A549 ein Zellprodukt freigesetzt wird, welches die Bildung von CCL18 induziert. Die Wirkung des Zellproduktes müsste eine höhere Potenz haben als das ebenfalls zugegebene ATP, welchem es entgegenwirkt. Zu beachten ist dabei allerdings, dass die Höhe von IL-1Ra durch die A549-Zellen unbeeinflusst blieb, was gegen eine typische Aktivierung im Sinne von TAM spricht.^(Mantovani, Sozzani et al., 2002)

Die erarbeiteten Daten zeigen weiterhin, dass naive Monozyten dazu in der Lage sind, intrinsisch und ohne weitere Stimulation zu CCL18- und IL-1Ra-produzierenden, phänotypisch alternativ aktivierten ähnelnden Makrophagen zu differenzieren. Diese Fähigkeit wird deutlich verringert durch die Anwesenheit von extrazellulärem ATP.

Darüber hinaus demonstriert der Anstieg an CCL18 in Anwesenheit des ATP-abbauenden Enzyms Apyrase, dass die intrinsische M2-Differenzierung möglicherweise durch extrazelluläres ATP, das wahrscheinlich durch die Monozyten selbst freigesetzt wird, kontrolliert wird.

Die Steigerung der CCL18-Freisetzung in der Ko-Kultivierung mit A549 scheint eher das Resultat eines löslichen Produktes der Tumorzellen zu sein als die Konsequenz einer direkten Zell-Zell-Interaktion, da der Effekt mit A549-konditioniertem Medium reproduzierbar war. Mosser et al. hatten vorgeschlagen, dass von Tumorzellen stammende Substanzen wie Prostaglandine, Hyaluron-Fragmente und auch extrazelluläre Nukleotide eine spezifische M2-Makrophagen-Subpopulation, die TAM, induzieren können.^(Mosser & Edwards, 2008) Die hier verwendete Zelllinie A549 ist dazu in der Lage, sowohl Hyaluron als auch Prostaglandine zu produzieren.^{(Mulshine, Chow et al., 2010), (Thorén & Jakobsson, 2000)} Gegen die Induktion des M2-Phänotyps in der Ko-Kultur mit A549 durch Prostaglandine spricht allerdings, dass durch die Stimulation von A549-Zellen mit ATP die Expression von Cyclooxygenase-2 und Prostaglandin E2 verstärkt wird.^(Lin, Lee et al., 2012) In den o.g. Experimenten hatte die Stimulation der Adenokarzinomzellen mit ATP allerdings keinen Einfluss auf die Differenzierung der Monozyten. Es ergab sich kein Einfluss auf die CCL18-Konzentration durch das konditionierte Medium, wenn die A549 zuvor mit ATP stimuliert wurden (CM10, CM100). Gegenüber dem unbekanntem Produkt der A549 scheint ATP ein starker Stimulus zu sein, da es auch die Fähigkeiten zur Induktion einer M2-Polarisation durch A549 verringert und die CCL18-Produktion signifikant herunterreguliert. Das bedeutet auch, dass in der Ko-Kultur von A549 und Monozyten das beigegebene ATP eine Wirkung auf die Monozyten entfaltet, nicht aber auf die A549, mit einem Überwiegen der Stimulation durch ATP gegenüber dem unbekanntem Produkt der A549 auf die Monozyten. Der Wirkungsverlust von Apyrase in der Ko-Kultur könnte durch den ATP-Verbrauch durch A549-Zellen hervorgerufen sein, wobei ATP nicht die Stimulationsfähigkeit der A549-Zelllinie verändert, da ATP-stimulierte A549 eine vergleichbare CCL18-Antwort der Monozyten induzieren wie native A549-Zellen. Möglicherweise haben auch die ATP-Abbauprodukte ADP, AMP und Adenosin, die durch die Zugabe von Apyrase entstehen, noch eine zusätzliche Wirkung auf die A549-Zellen, sodass es zu einer Hemmung der Freisetzung des unbekanntem, löslichen Faktors kommt. Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass Adenosin einen apoptotischen Effekt auf A549 entfalten kann^(Otsuki, Kanno et al., 2012); es kann daher durch Entstehung von Adenosin nach Zugabe von Apyrase einfach zu einer Apoptose von A549 kommen, wodurch die Konzentration des unbekanntem Faktors der A549 im Verlauf abnimmt und die Monozyten in geringerem

Ausmaß stimuliert werden. Für diesen Effekt sprechen würden auch die hier gezeigten Ergebnisse, dass das konditionierte Medium eine synergistische Wirkung zusammen mit Apyrase auf die CCL18-Produktion der Monozyten herbeiführt, da bei der Zugabe von CM der oben postulierte, unbekannte, durch A549 produzierte Faktor bereits enthalten ist. In diesem Fall sind der Faktor und der durch ihn hervorgerufene Effekt von einer eventuellen Apoptose der A549-Zellen durch Adenosin nach Zugabe von Apyrase unabhängig.

ATP und der spezifische P2X₇-Agonist BzATP zeigen ein praktisch identisches Muster bei der Verminderung der CCL18-Ausschüttung, was darauf hinweist, dass P2X₇ eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Differenzierungs-Verschiebung hin zu M1-Makrophagen spielen könnte. Zuvor konnte bereits gezeigt werden, dass eine Subpopulation der Monozyten (ca. 70%) P2X₇-Rezeptoren aufweisen, die hinsichtlich Porenbildung, Signaltransduktion und der Produktion von Mediatoren funktionell waren und somit eine Schlüsselrolle einnehmen.^(Aga, Johnson et al., 2002) Es ergab sich allerdings kein Unterschied zwischen ATP und BzATP in ihrer Wirkung auf die Zytokinproduktion, wie dies in zuvor durchgeführten Arbeiten berichtet wurde.^(Grahames, Michel et al., 1999)

In der Zusammenschau der Ergebnisse scheint nun eine Erklärung gefunden, für den scheinbaren Widerspruch zwischen erhöhten extrazellulären ATP-Spiegeln als „danger signal“ bei der Lungenfibrose^(Riteau, Gasse et al., 2010), welche zu einer pro-inflammatorischen M1-Polarisation der Makrophagen führt, und erhöhten CCL18-Leveln, welche ebenfalls bei der Lungenfibrose beobachtet wurden^(Prasse, Probst et al., 2009) und typischerweise im Rahmen einer anti-inflammatorischen M2-Differenzierung der Makrophagen auftritt.^(Schraufstatter, Zhao et al., 2012) So findet nach einer gewissen Zeit ohne Stimulation eine endogene Differenzierung der Monozyten hin zu M2-Makrophagen statt. Wenn nach Ablauf des Zeitfensters diese Polarisation stattgefunden hat, ändern auch hohe Konzentrationen extrazellulären ATPs nichts mehr an der Makrophagen-Differenzierung. Damit ist das gleichzeitige Auftreten hoher ATP-Spiegel und von CCL18-produzierenden M2-Makrophagen bei der Lungenfibrose zu erklären.

B. Zeitliche Limitation der Monozyten-Differenzierung

Aus immunologischer Sicht spielt bei der Vermittlung der Wirkung von ATP hauptsächlich der P2X₇-Rezeptor (P2X₇-R) eine wichtige Rolle, wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde.

Die Verlagerung von einem M2- zu einem M1-Aktivierungsmuster ist abhängig von der Zeitdauer der Kultur, wie die oben genannten Ergebnisse zeigen. ATP muss zu Beginn der Kultur vorhanden sein, um eine Wirkung zu entfalten. Wenn ATP zu späteren Zeitpunkten zugegeben wird (hier nach 48h), hat die endogene Makrophagen-Differenzierung bereits eingesetzt und die Zytokin-Freisetzung kann nicht mehr beeinflusst werden. Dieses Ergebnis weist ebenfalls darauf hin, dass P2X₇ ein wichtiger Rezeptor in der M2/M1-Polarisation durch ATP ist, da P2X₇ während der in-vitro Makrophagen-Differenzierung beachtlich herunterreguliert wird, während die Expression anderer analysierter P2-Rezeptoren stabil bleibt.

Ein ähnliches Ergebnis konnte die Arbeitsgruppe um Adrian et al. bereits im Jahr 2000 nachweisen; allerdings diente ihnen die pro-myeloische Leukämie-Zelllinie HL60 als Modell, bei dem sie einen Monozyten-/ Makrophagen-ähnlichen Phänotyp induzierten, um dann den Verlauf der Rezeptorexpression von purinergen Rezeptoren zu ermitteln. Auch hier war nach 24 h eine 10-fache Herunterregulierung des P2X₇-Rezeptors zu verzeichnen; allerdings konnte in diesem Modell auch eine Verminderung der P2Y₂-Rezeptors festgestellt werden, der bei unseren Untersuchungen mit naiven Monozyten nicht feststellbar war. (Adrian, Bernhard et al., 2000)

Die CCL18-Konzentration fiel beständig mit steigender ATP-Stimulation. Ein ähnlicher Effekt der Reduktion auch auf pro-inflammatorische, anti-fibrotische Zytokine wie CCL2 und CCL3 wurde bereits für dendritische Zellen beschrieben; erstaunlicherweise scheint diese Wirkung auf einer Beteiligung der Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₁ zu beruhen. (Horckmans, Marcet et al., 2006)

Pelegrin et al. konnten zeigen, dass der Mechanismus, der den Wechsel von einem pro-inflammatorischen zu einem anti-inflammatorischen Phänotyp bewirkt, nicht durch einen Verlust des P2X₇-Rezeptors bedingt war, sondern durch eine Entkopplung des Rezeptors von der Aktivierung des Inflammasoms. (Pelegrin & Surprenant, 2009) In dem in dieser Arbeit verwendeten Modell konnte gezeigt werden, dass naive Monozyten, die keiner Stimulation ausgesetzt waren und somit keine Polarisierung erfuhren, zwar letztendlich ebenfalls einen M2-Phänotyp aufwiesen, aber die M2-Differenzierung ging im Vergleich zu den Ergebnissen von Pelegrin et al. in dem hier verwendeten Versuchsaufbau mit einem Verlust des P2X₇-Rezeptors einher.

Das Phänomen einer fluktuierenden Expression von Levels der Rezeptoren wurde auch schon für andere Rezeptoren beschrieben. Die P2-Rezeptoren betreffend wurden ähnliche Eigenschaften für den P2Y₂-Rezeptor in frühen Differenzierungsstadien von Thymozyten beschrieben. (Koshiba, Apasov et al., 1997)

Die Regulation der P2X₇-Expression wird positiv reguliert durch die pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ und durch LPS (synergistisch mit IFN- γ).^{(Humphreys & Dubyak, 1998), (Humphreys & Dubyak, 1996)} Dieser Zusammenhang passt sehr gut zu dem Ergebnis dieser Arbeit, dass durch den Verlust von P2X₇ über die Zeit alternativ aktivierte, anti-inflammatorische M2-Makrophagen entstehen. Die Konzentration von intrazellulärem cyclischen AMP hingegen wirkt immunsuppressiv und korreliert negativ mit der Expression von P2X₇, ebenso verhindert die Zugabe von TGF- β die Hochregulierung von P2X₇ nach Stimulation mit LPS und IFN- γ .^{(Humphreys & Dubyak, 1998), (Gadeock, Tran et al., 2010)}

C. *Wirkung purinerner Antagonisten*

Die unspezifischen Antagonisten PPADS und Suramin zeigten keinen Effekt bezogen auf die Wirkung der ATP-Stimulation. Dieses Ergebnis stimmt mit der o.g. Hypothese überein, dass ATP seine Wirkung über die Aktivierung des P2X₇-Rezeptors vermittelt, da diese Antagonisten keinen Einfluss auf P2X₇ haben. Im Gegensatz dazu ist die Ineffektivität des spezifischen P2X₇-Inhibitors KN62 auf die Stimulation mit ATP nicht einfach zu erklären. Obwohl die Ergebnisse nicht signifikant sind, so weisen sie doch darauf hin, dass KN62 die Effekte von ATP auf die Verringerung der CCL18-Produktion sogar verstärkt. Dies steht im Gegensatz zu der Annahme, dass P2X₇ das Hauptziel für ATP ist, das zu der beobachteten Wirkung führt. Allerdings bindet KN62 auch an die Calmodulin-dependent protein-kinase CaMK II und inhibiert ihre Aktivierung mit einer IC₅₀ von 0,9 μ M. Es konnte gezeigt werden, dass die Blockade der CaMK II die Freisetzung von CCL3 (MIP-1 α) reduziert^(Matsumoto, Murao et al., 2008), welches eine starke Homologie zu CCL18 aufweist. Es ist daher denkbar, dass die CaMK II auch bei der Freisetzung von CCL18 eine Rolle spielt und ihre Inhibition durch KN62 zu einer weiteren Reduktion der CCL18-Konzentration führt.

In der Arbeit von Grahames et al. wurde gezeigt, dass sowohl KN62 als auch PPADS die ATP-induzierte Steigerungen der IL-1 β -Konzentration verhindern konnte. Die dabei verwendeten Konzentrationen lagen allerdings deutlich über den der in dieser Arbeit eingesetzten Antagonisten: für KN62 1 μ M und damit viermal so hoch wie die hier verwendete Dosis, respektive 100 μ M PPADS (zehnfach über der hier gewählten Konzentration).^(Grahames, Michel et al., 1999) Die von uns gewählten Mengen der Inhibitoren wurden mit Hinblick auf die IC₅₀ und eventuell auftretende Nebeneffekte ausgewählt. So ist für KN62 eine IC₅₀ von 15nM angegeben für die Inhibition von P2X₇ und die oben erwähnten

Nebenerscheinungen der CaMK II-Inhibition werden mit einer IC₅₀ von 0,9µM angegeben. Für PPADS mit einer vom Hersteller angegebenen IC₅₀ für P2X-Rezeptoren von 1-2,6µM und für Suramin mit der IC₅₀ von 150-310nM^(King, Dacquet et al., 1996) (mit den Nebenwirkungen einer Blockade der Topoisomerase II, Inhibition von Wachstumsfaktoren wie FGFa, FGFb und PGDF) müsste bei den hier verwendeten Konzentrationen der Agenzien ein beobachtbarer Effekt nachzuweisen sein. Leider konnten für die Bedingungen im Rahmen dieser Arbeit keine Halbwertszeit der Antagonisten gefunden werden; denkbar wäre also auch, dass die Wirkung der Inhibitoren zu kurz andauert im Vergleich zur Persistenz der ATP-Level und ihre Gabe zu Beginn keine Folgen hatte, sodass ATP bzw. seine Abbauprodukte bei einer Kulturdauer über 72 h dann nach dem Wirkverlust dieser Inhibitoren den zuvor beschriebenen Effekt zeigen könnte.

Die wichtige und vielseitige Rolle von P2X₇ im Immunsystem und speziell bei Monozyten wurde schon zuvor beschrieben, beispielsweise führt eine loss-of-function-Mutation im Gen für den P2X₇-Rezeptor zu einer beeinträchtigten ATP-induzierten Apoptose, die Funktion des P2X₇-Rezeptors geht außerdem mit antimikrobiellen Eigenschaften von Makrophagen einher^{(Shemon, Sluyter et al., 2006), (Aga, Johnson et al., 2002)} und pro-inflammatorische Zytokine können selbst die Expression von P2X₇ verstärken.^(Gu, Zhang et al., 2000)

D. Einfluss der Stimulation mit LPS

Hinsichtlich der Synthese von CCL18 scheint ATP ein sehr starkes Warnsignal darzustellen, das die CCL18-Produktion tiefgreifend vermindert, wohingegen LPS nur einen geringen Einfluss auf die Freisetzung von CCL18 hat. Der Einfluss von LPS auf die Konzentration von CCL18 wurde schon zuvor Alveolarmakrophagen und Monozyten betreffend diskutiert. Bei AM konnte gezeigt werden, dass die Gabe von LPS zu einer Verminderung der CCL18-Freisetzung führt.^(Kollert, Probst et al., 2009) In anderen Untersuchungen wurde hingegen gezeigt, dass in bestimmten monozytären Subpopulationen und in dendritischen Zellen die Stimulation mit LPS die Freisetzung von CCL18 erhöht, in reifenden dendritischen Zellen wird CCL18 durch LPS dagegen reduziert.^{(Hieshima, Imai et al., 1997), (Pivarsci, Gombert et al., 2004), (Vulcano, Struyf et al., 2003)} Es ist möglich, dass die pro-inflammatorische Wirkung von LPS, welche eine Reduktion von CCL18 erwarten ließe, durch das LPS-induzierte Zytokin IL-10 maskiert wird, welches seinerseits wiederum die Synthese von CCL18 erhöht.^{(Prasse, Pechkovsky et al., 2006), (Prasse, Germann et al., 2007)} Die hier dargestellten Ergebnisse

unterstützen die Erkenntnisse von Laliberte et al. und Sanz et al., dass ein Priming mit LPS nicht essentiell notwendig ist für die IL-1 β -Freisetzung als Reaktion auf eine Stimulation mit ATP. (Laliberte, Egger et al., 1999), (Sanz & Di Virgilio, 2000) Umgekehrt können Monozyten IL-1 β unabhängig von P2X₇ über eine Stimulation von Toll-like-Rezeptoren TLR mit LPS freisetzen^(Ward, West et al., 2010), sehr wahrscheinlich da Monozyten in der Lage sind, selbst ATP nach Stimulation ihrer Pathogen-erkennenden Rezeptoren freizusetzen und damit die IL-1 β -Sekretion auf einem autokrinen Weg zu induzieren. (Piccini, Carta et al., 2008) Allerdings war in diesem Versuchsaufbau die Sekretion von IL-1 β wie in der Literatur zuvor beschrieben mit am höchsten unter kombinierter Stimulation mit ATP und LPS; ATP allein zeigte keinen großen Einfluss auf die Freisetzung von IL-1 β .

Bei der Kultur in konditioniertem Medium zeigte sich, dass das CM die Wirkung von LPS auf die Monozyten deutlich verändert. CM alleine erhöht die Konzentrationen von CCL18 und senkt jene von IL-1 β . Durch die Stimulation mit LPS und CM hingegen steigen die Spiegel von CCL18 noch weiter stark an. Diese Interaktion zwischen bakteriellen Endotoxinen wie LPS als PAMPs und CM mit noch unbekannt Substanzen als DAMPs könnte als Erklärung für die bisher unklaren Mechanismen der akuten Exazerbation der IPF dienen, bei der auch deutlich erhöhte CCL18-Konzentrationen gefunden werden können. (Schupp, Binder et al., 2015) Daneben werden bei der akuten Exazerbation der IPF auch einige, ganz bestimmte pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β vermehrt gebildet. (Schupp, Binder et al., 2015) Dies stimmt mit den hier gefundenen Ergebnissen überein, bei denen auch die IL-1 β -Konzentrationen zwar durch CM vermindert werden, aber durch die Stimulation mit CM und LPS gemeinsam deutlich erhöht werden. Dieser Zusammenhang erklärt, warum die akute Exazerbation der IPF nicht allein durch einen exogenen Trigger wie LPS bedingt zu sein scheint, sondern durch eine Kombination endogener, bereits vorliegender Pathomechanismen zusammen mit einem exogenen Trigger.

E. Effekte der ATP-Abbauprodukte

In Anwesenheit des ATP-abbauenden Enzyms Apyrase kommt es zu einem Anstieg von CCL18, was darauf hinweist, dass die intrinsische M2-Differenzierung durch extrazelluläres ATP, das wahrscheinlich durch die Monozyten selbst freigesetzt wird, kontrolliert wird. Die Steigerung der CCL18-Freisetzung nach der Zugabe von Apyrase lässt sich auch durch eine weitere Degradation von AMP zu Adenosin durch monozytäre 5'-Nukleotidasen erklären

(CD39).^(Sunderman, 1990) Adenosin hat im Gegensatz zu ATP eine eher immunsuppressive Wirkung und reguliert überaktive Immunantworten herunter, vor allem in einer subakuten Phase nach der akuten Inflammation um die Immunreaktion zu begrenzen. Insbesondere konnte in der Literatur eine Reduktion von TNF- α - und Interleukin IL-12-Spiegeln und eine erleichterte Freisetzung von IL-10 gezeigt werden, welche eher für eine alternative Aktivierung der Makrophagen sprechen würde.^{(Haskó, Pacher et al., 2007), (Sitkovsky & Ohta, 2005)} Allerdings zeigen die hier aufgeführten Ergebnisse, dass die Zugabe von Adenosin ebenso wie ADP und AMP ebenfalls die Produktion von CCL18 vermindert und die Synthese von IL-1 β steigert. Diese Abbauprodukte von ATP stellen also scheinbar wie ATP selbst „danger signals“ dar. Allerdings wurde durch die Aktivierung des Adenosin-Rezeptors A2B auch eine vermehrte pro-inflammatorische IL-6-Synthese durch Makrophagen und dendritische Zellen nachgewiesen.^{(Wilson, Kurtz et al., 2011), (Ryzhov, Zaynagetdinov et al., 2007), (Cekic & Linden, 2016)} Ein vergleichbarer Mechanismus ist auch hier denkbar, sodass die Monozyten in pro-inflammatorische Makrophagen differenzieren und die Produktion von CCL18 vermindert wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass nach ATP-Priming ADP und AMP in der Lage sind, in Mikroglia-Zellen eine P2X₇-Aktivierung zu bewirken und konsekutiv die IL-1 β -Spiegel zu erhöhen.^(Chakfe, Seguin et al., 2002)

Der Widerspruch zwischen der erhöhten Synthese von CCL18 durch die Zugabe von Apyrase und die verminderte CCL18-Produktion durch Adenosin direkt lässt sich am ehesten dadurch erklären, dass das Substrat der zugegebenen Apyrase nur das durch die Monozyten selbst freigesetzte ATP ist, welches in geringeren Konzentrationen vorliegt als bei der exogenen Stimulation in dieser Arbeit.

Zudem kommt es bei der Zugabe von Apyrase kontinuierlich zu einem Abbau von ATP zu AMP und danach zu einem Abbau von AMP zu Adenosin nur durch monozytäre 5'-Nukleotidasen (CD39)^(Sunderman, 1990), welcher den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellen dürfte. Somit ist in diesem Fall durch Zugabe von Apyrase mit einer kontinuierlichen, geringfügigen Stimulation durch Adenosin zu rechnen, während die direkte Stimulation durch Adenosin im Rahmen dieser Arbeit einmalig zu Beginn der Kultur mit hohen Konzentrationen erfolgte. Durch die kontinuierliche Stimulation niedriger Konzentrationen mit Adenosin durch Apyrase erhöht sich die CCL18-Konzentration und es findet eine Differenzierung zu M2-Makrophagen statt. Durch eine Stimulation mit hohen Konzentrationen nur zu Beginn der Kultur scheint dagegen eine M1-Polarisierung zu erfolgen. Hohe Konzentrationen exogenen Adenosins scheinen die Reifung von Monozyten zu Makrophagen hin zu Zellen ähnlich dendritischen Zellen zu verändern und auch endogenes

Adenosin scheint die Reifung von Monozyten zu unterbinden.^(Haskó, Pacher et al., 2007) Diese Unterschiede in Kinetik und Höhe der Stimulation mittels Adenosin scheinen von großer Bedeutung für die Differenzierung zu sein und könnten auch in diesem Fall eine Rolle spielen.

Zusammenfassend führt das Hinzufügen von Apyrase zu einer Differenzierung zu M2-Makrophagen genauso wie es Hinweise auf eine M1-Aktivierung gibt, obwohl die Mechanismen, die zu den verschiedenen Typen der Polarisation führen, noch unklar sind.

Die beiden ATP-Degradationsprodukte ADP und AMP, die durch die Einwirkung von Apyrase entstehen, zeigen eine ähnliche Wirkung auf die Zytokinproduktion der Monozyten wie das Ausgangsprodukt ATP, was auf die Induktion eines M1-Phänotyps hinweist. Dieser Effekt ist bei der Zugabe von Apyrase so zu erwarten gewesen, da bereits gezeigt werden konnte, dass nach vorausgehendem ATP-Priming sowohl ADP als auch AMP in der Lage sind, eine P2X₇-Aktivierung in Mikroglia zu bewirken und so die Konzentration von IL-1 β zu erhöhen.^(Chakfe, Seguin et al., 2002) Diese Beobachtung konnte in dieser Arbeit ebenfalls nachgewiesen werden, interessanterweise führte die Zugabe von Apyrase auch zu einer Erhöhung der CCL18-Antwort (siehe oben).

Im Gegensatz zu diesen o.g. Beobachtungen zeigte sich bei dieser Arbeit allerdings auch ohne Priming ein Anstieg der Konzentration von IL-1 β nach Stimulation mit ADP und AMP. Im Vergleich zur Apyrase fiel die Freisetzung von CCL18 allerdings ab und die beiden Produkte ADP und AMP zeigten ein ähnliches Verhalten wie ATP. Insgesamt lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit beobachtet wurde, dass entweder ein Priming mit ATP bei Monozyten im Gegensatz zu Mikroglia keine relevante Rolle spielt, um den Effekt von ADP und AMP über P2X₇ zu vermitteln, oder dass wahrscheinlich ein Priming mit ATP durch das von den Monozyten selbst freigesetzte ATP stattfinden kann.

Adenosin zeigte im Hinblick auf IL-1 β das gleiche Verhalten wie ATP, bezüglich CCL18 kam es bei niedrigen Konzentrationen von Adenosin zuerst zu einem Abfall (ähnlich wie bei ATP), bei höheren Konzentrationen allerdings zu einem Anstieg der CCL18-Konzentration. Diese Beobachtung könnte die Zunahme des CCL18-Spiegels bei der Zugabe von Apyrase erklären; Adenosin als Endprodukt der kombinierten Degradation von ATP durch Apyrase zu AMP und dann via CD39 zu Adenosin führt zu einer vermehrten Freisetzung von CCL18.

In Untersuchungen von Link et al. und Bouma et al. konnte gezeigt werden, dass Adenosin generell eher eine anti-inflammatorische Wirkung aufweist. Dazu passt die Erhöhung der CCL18-Spiegel nach Stimulation. Neben einer Reduktion von der pro-

entzündlichen Zytokine IL-6, IL-8, TNF- α und IL-12 konnte durch die Stimulation von Monozyten mit Adenosin auch die Produktion von IL-10 induziert werden,^(Link, Kino et al., 2000)
(Bouma, Stad et al., 1994) welches als anti-inflammatorisches Zytokin eine M2-Aktivierung in Monozyten initiiert. Dies könnte ebenfalls eine Erklärung für den CCL18-Anstieg bei höheren Konzentrationen zugegebenen Adenosins und der Apyrase sein; die Adenosin-vermittelte Steigerung der IL-10-Synthese würde somit eine M2-Differenzierung der Monozyten hervorrufen und dadurch die Produktion von CCL18 erhöhen.

F. Ausblick

Die aktuellen Therapieoptionen sind im Rahmen der fibrotischen Erkrankungen der Lunge wie auch bei pulmonalen Malignomen noch unbefriedigend. Die Mortalität von Lungenkarzinomen und der IPF ist auch unter Ausschöpfung aller therapeutischen Maßnahmen sehr hoch.

Pathogenetisch spielt die Differenzierung von Monozyten zu M2-Makrophagen mit der Generation eines pro-fibrotischen Zytokin-Milieus und der Rekrutierung kollagenbildender Fibroblasten bei der IPF eine wichtige Rolle. Auf der anderen Seite ist eine Reihe von Krankheiten mit überschießenden M1-Antworten assoziiert, beispielsweise die Sarkoidose, aber auch die COPD, die rheumatoide Arthritis und die Osteoarthritis, die Psoriasis, die allergische Dermatitis, der M. Crohn und das Asthma bronchiale. Aus der vorliegenden Arbeit wird der Zusammenhang zwischen erhöhten eATP-Konzentrationen und einer eindeutigen Differenzierung von Monozyten zu M1-Makrophagen, vermittelt über den purinergen P2X₇-Rezeptor, ersichtlich. Dieser Rezeptor könnte damit aufgrund seiner wichtigen Rolle im Rahmen der Makrophagen-Differenzierung ein pharmakologisches Ziel darstellen. Eine pharmakologische Intervention könnte dabei entweder auf eine agonistische Wirkung abzielen und damit eine M1-Differenzierung begünstigen, beispielsweise um die überschießende M2-Antwort bei der IPF einzudämmen. Auf der anderen Seite könnte auch die Induktion der M2-Differenzierung ein interessantes Ziel darstellen, um mit spezifischen Antagonisten des P2X₇-Rezeptors eine übermäßige Inflammation zum Stillstand zu bringen. Neben KN62 selbst stehen mit den von KN62 abgeleiteten Substanzen MRS 2306, MRS 2464, MRS 2447, AZ11645373, A-740003, A-438079 sowie weiteren Derivaten weitere funktionelle Antagonisten zur Verfügung.^(Romagnoli, Baraldi et al., 2008) Neben dem hier verwendeten spezifischen Agonisten BzATP stehen keine weiteren Substanzen dieser Klasse zur Verfügung, die gezielt

am P2X₇-Rezeptor wirken, sodass weitere Studien mit dem Ziel, Alternativen für BzATP als spezifischen P2X₇-Agonisten zu ermitteln, von Nutzen sein könnten. Neben weiteren Erkrankungen zeigt die folgende Tabelle mögliche Pathologien, deren Patienten potentiell von einer Therapie mit einer Beeinflussung der Makrophagen-Polarisation profitieren könnten (Tabelle modifiziert nach Sica et al. (Sica & Mantovani, 2012)):

Funktion	Agens	Erkrankungen
M1-Induktion	P2X ₇ -Agonisten	Atopische Dermatitis, Ovarialkarzinom, Asthma bronchiale, Mammakarzinom, Pankreaskarzinom, malignes Melanom, Fibrosarkom, kutanes B-Zell-Lymphom
M2-Induktion	P2X ₇ -Antagonisten	Diabetes mellitus, Atherosklerose, Glomerulonephritis

Zudem wurden durch die Arbeit eine Reihe weiterer Fragen aufgezeigt. Von großem Interesse ist dabei die weitere Bestimmung des löslichen Produktes der Tumorzelllinie A549, die zur Induktion einer M2-Differenzierung aus den Monozyten führt. Dies würde einen tieferen Einblick in die pathogenetischen Abläufe der Tumorprogression und die malignombedingten Veränderungen der Immunreaktionen ermöglichen.

Erstaunlicherweise hat sich der spezifische P2X₇-Antagonist KN62 in unseren Versuchen als wirkungslos erwiesen. Dieser Zusammenhang und die mögliche Interaktion mit der CaMK II im Speziellen sollten weiter beleuchtet werden. Zudem wäre ein zu den in dieser Arbeit mit ATP-Rezeptor-Antagonisten durchgeführten Experimenten vergleichbarer Versuchsaufbau wünschenswert, bei dem weitere spezifischen P2X₇-Rezeptor-Antagonisten (außer KN62) und deren Einfluss auf die Zytokin-Expression untersucht werden.

Eine Limitation dieser Arbeit ergibt sich aus den teilweise geringen Probandenzahlen. Sinnvollerweise sollte eine Validierung der Daten durch Versuche an einem größeren Kollektiv erfolgen, gegebenenfalls mit einer Kontrolle durch Stimulationsreihen mit von Patienten mit IPF und Sarkoidose gespendeten Monozyten. Diese Durchführung der Experimente mit Monozyten von erkrankten Patienten sollte auch durchgeführt werden, da in dieser Arbeit nur Proben gesunder, junger Probanden eingeschlossen sind, deren Zellen in ihren Mechanismen und Verhalten von denen erkrankter Patienten abweichen können. Das hier erforschte grundlegende Reaktionsmuster dient dabei als Basis für weitere Arbeiten.

6. Zusammenfassung

Physiologische Konzentrationen von extrazellulärem ATP sind streng durch ein Gleichgewicht aus Freisetzung und Abbau reguliert. Pathologisch erhöhte ATP-Level werden im Zusammenhang mit Gewebeschädigung als Danger-Signal bei Entzündung, Lungenfibrose oder Krebserkrankungen beobachtet und können immunologische Signalwege modulieren.

Darum wurde in dieser Arbeit der Einfluss von ATP auf die Aktivierung von naiven humanen Monozyten mit besonderem Fokus auf die Produktion der typischen Zytokine durch M1- und M2-Makrophagen untersucht. Monozyten allein, in Ko-Kultur mit der Tumorzelllinie A549 oder in A549-konditioniertem Medium wurden mit ATP bzw. verschiedenen ATP-Derivaten (BzATP, ADP, AMP, Adenosin), dem ATP-abbauenden Enzym Apyrase, LPS und purinergen Rezeptorantagonisten (Suramin, PPADS, KN62) für 72 h kultiviert.

Extrazelluläres ATP und BzATP verschieben die Differenzierung der Monozyten in eine pro-inflammatorische Richtung hin zu klassisch aktivierten M1-Makrophagen, wenn die Stimulation zu Beginn der Kultur stattfindet. Diese Verlagerung zu einem M1-Phänotyp zeigt sich in der Dosis-abhängigen Reduktion der CCL18-Konzentration bei gleichzeitigem Anstieg von IL-1 β . Dieser Effekt scheint durch P2X₇ vermittelt zu werden, da es keinen Unterschied in der Effektivität der Stimulation zwischen ATP und BzATP, einem spezifischen P2X₇-Agonisten, gibt. Ohne Stimulation differenzieren sich die kultivierten naiven Monozyten zu M2-ähnlichen Makrophagen, was sich durch einen erhöhten CCL18-Spiegel zeigt. Werden die Stimulanzien erst 48 h nach Beginn der Kultur zugegeben, haben diese keinen Einfluss mehr auf die Freisetzung der Zytokine. Die Reifung der Monozyten zu M2-ähnlichen Makrophagen reduziert die Expression von P2X₇ und macht sie damit unempfindlich gegenüber Stimulationen mit ATP. Die M2-Aktivierung der Makrophagen bei der IPF ist trotz hoher ATP-Spiegel dominierend, da auch diese hohen Spiegel auf den bereits differenzierten M2-Makrophagen keinen Einfluss mehr haben.

Zusammenfassend führt ATP zu einer Reifung von Monozyten zu M1-Makrophagen, vermittelt über den P2X₇-Rezeptor. Der Verlust des P2X₇-Rezeptors während der Reifung zu M2-Makrophagen ohne Stimulation macht die Makrophagen inert gegen ATP-Stimuli.

7. Literaturverzeichnis, Abbildungsverzeichnis

- Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA. (2006). International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy. *Pharmacological Reviews* 58: 281–341. DOI: 10.1124/pr.58.3.3
- Adinolfi E, Callegari MG, Ferrari D, Bolognesi C, Minelli M, Wieckowski MR, Pinton P, Rizzuto R, Virgilio F Di. (2005). Basal activation of the P2X7 ATP receptor elevates mitochondrial calcium and potential, increases cellular ATP levels, and promotes serum-independent growth. *Molecular biology of the cell* 16: 3260–3272. DOI: 10.1091/mbc.E04-11-1025
- Adrian K, Bernhard MK, Breitinger HG, Ogilvie A. (2000). Expression of purinergic receptors (ionotropic P2X1-7 and metabotropic P2Y1-11) during myeloid differentiation of HL60 cells. *Biochimica et Biophysica Acta- Gene Structure and Expression* 1492: 127–138. DOI: 10.1016/S0167-4781(00)00094-4
- Aga M, Johnson CJ, Hart AP, Guadarrama AG, Suresh M, Svaren J, Bertics PJ, Darien BJ. (2002). Modulation of monocyte signaling and pore formation in response to agonists of the nucleotide receptor P2X(7). *Journal of leukocyte biology* 72: 222–32.
- Agostini C, Trentin L, Perin a, Facco M, Siviero M, Piazza F, Basso U, Adami F, Zambello R, Semenzato G. (1999). Regulation of alveolar macrophage-T cell interactions during Th1-type sarcoid inflammatory process. *The American journal of physiology* 277: L240–L250.
- Anon. (1999). Statement on Sarcoidosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 160: 736–755. DOI: 10.1164/ajrccm.160.2.ats4-99
- Antoniades HN, Bravo M a, Avila RE, Galanopoulos T, Neville-Golden J, Maxwell M, Selman M. (1990). Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 86: 1055–64. DOI: 10.1172/JCI114808
- Arend WP. (2002). The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 13: 323–340. DOI: 10.1016/S1359-6101(02)00020-5
- Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C. (1998). Interleukin-1 Receptor Antagonist: Role in Biology. *Annu. Rev. Immunol* 16: 27–55. DOI: 10.1146/annurev.immunol.16.1.27
- Atamas SP, Luzina IG, Choi J, Tsybalyuk N, Carbonetti NH, Singh IS, Trojanowska M, Jimenez SA, White B. (2003). Pulmonary and Activation-Regulated Chemokine Stimulates Collagen Production in Lung Fibroblasts. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 29: 743–749. DOI: 10.1165/rcmb.2003-0078OC
- Bäumer I, Zissel G, Schlaak M, Müller-Quernheim J. (1997). Th1/Th2 Cell Distribution in Pulmonary Sarcoidosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 16: 171–177.
- Baumgartner KB, Samet JM, Stidley C a, Colby T V, Waldron J a. (1997). Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 155: 242–8. DOI: 10.1164/ajrccm.155.1.9001319
- Berlin M, Fogdell-Hahn A, Olerup O, Eklund A, Grunewald J. (1997). HLA-DR predicts the prognosis in Scandinavian patients with pulmonary sarcoidosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 156: 1601–1605. DOI: 10.1164/ajrccm.156.5.9704069
- Bingisser R, Speich R, Zollinger A, Russi E, Frei K. (2000). Interleukin-10 secretion by alveolar macrophages and monocytes in sarcoidosis. *Respiration; International Review of Thoracic Diseases* 67: 280–286. DOI: 10.1159/000029511
- du Bois RM, Kirby M, Balbi B, Saltini C, Crystal RG. (1992). T-lymphocytes that accumulate

- in the lung in sarcoidosis have evidence of recent stimulation of the T-cell antigen receptor. *Am Rev Respir Dis* 145: 1205–1211. DOI: 10.1164/ajrccm/145.5.1205
- Bolego C, Ceruti S, Brambilla R, Puglisi L, Cattabeni F, Burnstock G, Abbracchio MP. (1997). Characterization of the signalling pathways involved in ATP and basic fibroblast growth factor-induced astrogliosis. *British journal of pharmacology* 121: 1692–9. DOI: 10.1038/sj.bjp.0701294
- Boot RG, Verhoek M, de Fost M, Hollak CE, Maas M, Bleijlevens B, van Breemen MJ, van Meurs M, Boven LA, Laman JD, Moran MT, Cox TM, Aerts JM. (2004). Marked elevation of the chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: A novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention. *Blood* 103: 33–39. DOI: 10.1182/blood-2003-05-1612
- Bouma MG, Stad RK, van den Wildenberg F a, Buurman W a. (1994). Differential regulatory effects of adenosine on cytokine release by activated human monocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 153: 4159–68.
- Cai M, Bonella F, He X, Sixt SU, Sarria R, Guzman J, Costabel U. (2013). CCL18 in serum, BAL fluid and alveolar macrophage culture supernatant in interstitial lung diseases. *Respiratory Medicine* 107: 1444–1452. DOI: 10.1016/j.rmed.2013.06.004
- Capelli A, Di Stefano A, Lusuardi M, Gnemmi I, Donner CF. (2002). Increased macrophage inflammatory protein-1alpha and macrophage inflammatory protein-1beta levels in bronchoalveolar lavage fluid of patients affected by different stages of pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 236–241. DOI: 10.1164/rccm.2106084
- Cekic C, Linden J. (2016). Purinergic regulation of the immune system. *Nature Reviews Immunology* 16: 177–192. DOI: 10.1038/nri.2016.4
- Chakfe Y, Seguin R, Antel JP, Morissette C, Malo D, Henderson D, Seguela P. (2002). ADP and AMP Induce Interleukin-1beta Release from Microglial Cells through Activation of ATP-Primed P2X7 Receptor Channels. *Journal of neuroscience* 22: 3061–3069. DOI: 20026250
- Chang Y, de Nadai P, Azzouli I, Morales O, Delhem N, Vorng H, Tomavo S, Ait Yahia S, Zhang G, Wallaert B, Chenivresse C, Tscopoulos A. (2010). The chemokine CCL18 generates adaptive regulatory T cells from memory CD4+ T cells of healthy but not allergic subjects. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24: 5063–72. DOI: 10.1096/fj.10-162560
- Chen G. (2002). TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway. *Science* 296: 1634–1635. DOI: 10.1126/science.1071924
- Cool CD, Groshong SD, Rai PR, Henson PM, Stewart JS, Brown KK. (2006). Fibroblast foci are not discrete sites of lung injury or repair: The fibroblast reticulum. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 174: 654–658. DOI: 10.1164/rccm.200602-205OC
- Costabel U, Guzman J, Drent M. (2005). *Sarcoidosis*. Drent U. MC (ed). European Respiratory Society.
- Costabel U, Guzman J. (2003). [Pulmonary fibrosis. Classification, diagnosis, therapy]. *Der Internist* 44 Suppl 1: S35–43. DOI: 10.1007/s00108-003-0977-6
- Costabel U, Guzman J, Bonella F, Oshimo S. (2007). Bronchoalveolar lavage in other interstitial lung diseases. *Semin Respir Crit Care Med* 28: 514–524. DOI: 10.1055/s-2007-991525
- Cottin V. (2006). Interstitial lung disease: Are we missing formes frustes of connective tissue disease? *European Respiratory Journal* 28: 893–896. DOI: 10.1183/09031936.00101506
- Coultas DB, Zumwalt RE, Black WC, Sobonya RE. (1994). The epidemiology of interstitial lung diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 150: 967–972. DOI: 10.1164/ajrccm.150.4.7921471
- Dai H, Guzman J, Chen B, Costabel U. (2005). Production of soluble tumor necrosis factor receptors and tumor necrosis factor-alpha by alveolar macrophages in sarcoidosis and extrinsic allergic alveolitis. *Chest* 127: 251–6. DOI: 10.1378/chest.127.1.251

- Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjyoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of Experimental Medicine* 204: 1257–1265. DOI: 10.1084/jem.20062512
- Demedts M, Costabel U. (2002). ATS/ERS international multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *European Respiratory Journal* 19: 794–796. DOI: 10.1183/09031936.02.00492002
- Denis M, Cormier Y, Fournier M, Tardif J, Laviolette M. (1991). Tumor necrosis factor plays an essential role in determining hypersensitivity pneumonitis in a mouse model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5: 477–483.
- Devergne O, Emilie D, Peuchmaur M, Crevon MC, D'Agay MF, Galanaud P. (1992). Production of cytokines in sarcoid lymph nodes: preferential expression of interleukin-1 beta and interferon-gamma genes. *Hum. Pathol.* 23: 317–323.
- Dinarello CA. (2005). Blocking IL-1 in systemic inflammation. *The Journal of Experimental Medicine* 201: 1355–1359. DOI: 10.1084/jem.20050640
- Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB journal* 12: 1063–1073. DOI: 9737710
- Dubyak GR, El-Moatassim C. (1993). Signal transduction via P₂-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *American Physiological Society* 265: 577–606.
- Eckle T, Fullbier L, Wehrmann M, Houry J, Mittelbronn M, Ibla J, Rosenberger P, Eltzschig HK. (2007). Identification of Ectonucleotidases CD39 and CD73 in Innate Protection during Acute Lung Injury. *The Journal of Immunology* 178: 8127–8137. DOI: 10.4049/jimmunol.178.12.8127
- Ettensohn DB, Lalor PA, Roberts Jr. NJ. (1986). Human alveolar macrophage regulation of lymphocyte proliferation. *Am Rev Respir Dis* 133: 1091–1096.
- Faner R, Rojas M, Macnee W, Agusti A. (2012). Abnormal Lung Aging in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* : 1–41. DOI: 10.1164/rccm.201202-0282PP
- Fernandez IE, Eickelberg O. (2012). New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 380: 680–8. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)61144-1
- Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Dal Susino M, Melchiorri L, Baricordi OR, Di Virgilio F. (1997). Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P_{2Z} receptor of human macrophages. *Journal of immunology* 159: 1451–8.
- Ferrari D, Stroh C, Schulze-Osthoff K. (1999). P_{2X7}/P_{2Z} purinoreceptor-mediated activation of transcription factor NFAT in microglial cells. *Journal of Biological Chemistry* 274: 13205–13210. DOI: 10.1074/jbc.274.19.13205
- Fraig M, Shreesha U, Savici D, Katzenstein A-LA. (2002). Respiratory bronchiolitis: a clinicopathologic study in current smokers, ex-smokers, and never-smokers. *The American journal of surgical pathology* 26: 647–653. DOI: 10.1097/00000478-200205000-00011
- Van Furth R. (1982). Current View on the Mononuclear Phagocyte System. *Immunobiology* 161: 178–185. DOI: 10.1016/S0171-2985(82)80072-7
- Gadeock S, Tran JNSN, Georgiou JG, Jalilian I, Taylor RM, Wiley JS, Sluyter R. (2010). TGF- β 1 prevents up-regulation of the P_{2X7} receptor by IFN- γ and LPS in leukemic THP-1 monocytes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1798: 2058–2066. DOI: 10.1016/j.bbmem.2010.07.022
- Gallucci S, Matzinger P. (2001). Danger signals: SOS to the immune system. *Current Opinion in Immunology* 13: 114–119. DOI: 10.1016/S0952-7915(00)00191-6
- Garrington TP, Johnson GL. (1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein

- kinase signaling pathways. *Current Opinion in Cell Biology* 11: 211–218. DOI: 10.1016/S0955-0674(99)80028-3
- Gaur U, Aggarwal BB. (2003). Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. 1403–1408 pp. DOI: 10.1016/S0006-2952(03)00490-8
- Gever JR, Cockayne DA, Dillon MP, Burnstock G, Ford APDW. (2006). Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 452: 513–537. DOI: 10.1007/s00424-006-0070-9
- Gillies K. (2010). *Interstitial Lung Disease* DOI: 10.1093/innovait/inq138
- Goebeler M, Trautmann A, Voss A, Bröcker E V, Toksoy A, Gillitzer R. (2001). Differential and sequential expression of multiple chemokines during elicitation of allergic contact hypersensitivity. *The American journal of pathology* 158: 431–440. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63986-7
- Gordon S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3: 23–35. DOI: 10.1038/nri978
- Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. (2001). Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *Journal of leukocyte biology* 69: 11–20.
- Grahames CB, Michel a D, Chessell IP, Humphrey PP. (1999). Pharmacological characterization of ATP- and LPS-induced IL-1beta release in human monocytes. *British journal of pharmacology* 127: 1915–1921. DOI: 10.1038/sj.bjp.0702732
- Griffiths RJ, Stam EJ, Downs JT, Otterness IG. (1995). ATP induces the release of IL-1 from LPS-primed cells in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 154: 2821–8.
- Grozio A, Sociali G, Sturla L, Caffa I, Soncini D, Salis A, Raffaelli N, De Flora A, Nencioni A, Bruzzone S. (2013). CD73 Protein as a Source of Extracellular Precursors for Sustained NAD⁺ Biosynthesis in FK866-treated Tumor Cells. *Journal of Biological Chemistry* 288: 25938–25949. DOI: 10.1074/jbc.M113.470435
- Gu BJ, Zhang WY, Bendall LJ, Chessell IP, Buell GN, Wiley JS. (2000). Expression of P2X7 purinoceptors on human lymphocytes and monocytes: evidence for nonfunctional P2X7 receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C1189-1197. DOI: 10.1155/2014/164309
- Gustafsson C, Mjösberg J, Matussek A, Geffers R, Matthiesen L, Berg G, Sharma S, Buer J, Ernerudh J. (2008). Gene expression profiling of human decidual macrophages: Evidence for immunosuppressive phenotype. *PLoS ONE* 3 DOI: 10.1371/journal.pone.0002078
- Hancock A, Armstrong L, Gama R, Millar A. (1998). Production of interleukin 13 by alveolar macrophages from normal and fibrotic lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 18: 60–65. DOI: 10.1165/ajrcmb.18.1.2627
- Hardie DG, Hawley SA. (2001). AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays* 23: 1112–1119. DOI: 10.1002/bies.10009
- Haskó G, Pacher P, Deitch EA, Vizi ES. (2007). Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors. *Pharmacology and Therapeutics* 113: 264–275. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2006.08.003
- Hauber H-P, Gholami D, Meyer A, Pforte A. (2003). Increased interleukin-13 expression in patients with sarcoidosis. *Thorax* 58: 519–24. DOI: 10.1136/thorax.58.6.519
- Hayden MS, Ghosh S. (2012). NF-κB, the first quarter-century: Remarkable progress and outstanding questions. *Genes and Development* 26: 203–234. DOI: 10.1101/gad.183434.111
- Hehlgans T, Pfeffer K. (2005). The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: Players, rules and the games. *Immunology* 115: 1–20. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2005.02143.x
- Hieshima K1, Imai T, Baba M, Shoudai K, Ishizuka K, Nakagawa T, Tsuruta J, Takeya M, Sakaki Y, Takatsuki K, Miura R, Opdenakker G, Van Damme J, Yoshie O, Nomiyama H. (1997). A novel human CC chemokine PARC that is most homologous to macrophage-inflammatory protein-1 alpha/LD78 alpha and chemotactic for T lymphocytes, but not for

- monocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 159: 1140–9. DOI: 10.4049/jimmunol.180.3.1598
- Horckmans M, Marcet B, Marteau F, Bulté F, Maho A, Parmentier M, Boeynaems JM, Communi D. (2006). Extracellular adenine nucleotides inhibit the release of major monocyte recruiters by human monocyte-derived dendritic cells. *FEBS Letters* 580: 747–754. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.12.091
- Humphreys BD, Dubyak GR. (1996). Induction of the P2z/P2X7 nucleotide receptor and associated phospholipase D activity by lipopolysaccharide and IFN-gamma in the human THP-1 monocytic cell line. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 157: 5627–5637.
- Humphreys BD, Dubyak GR. (1998). Modulation of P2X7 nucleotide receptor expression by pro- and anti-inflammatory stimuli in THP-1 monocytes. *Journal of leukocyte biology* 64: 265–73.
- Hunninghake GW, Schwarz MI. (2007). Does current knowledge explain the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis? A perspective. *Proceedings of the American Thoracic Society* 4: 449–52. DOI: 10.1513/pats.200702-036MS
- Iannuzzi MC, Rybicki BA, Teirstein AS. (2007). Sarcoidosis. *New England Journal of Medicine* 357: 2153–2165. DOI: 10.1056/NEJMra071714
- Ina Y, Takada K, Yamamoto M, Morishita M, Miyachi A. (1990). Antigen-presenting capacity in patients with sarcoidosis. *Chest* 98: 911–916. DOI: 10.1378/chest.98.4.911
- Jakubzick C, Choi ES, Joshi BH, Keane MP, Kunkel SL, Puri RK, Hogaboam CM. (2003). Therapeutic Attenuation of Pulmonary Fibrosis Via Targeting of IL-4- and IL-13-Responsive Cells. *The Journal of Immunology* 171: 2684–2693. DOI: 10.4049/jimmunol.171.5.2684
- Jin D, Fan J, Wang L, Thompson LF, Liu A, Daniel BJ, Shin T, Curiel TJ, Zhang B. (2010). CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: A novel mechanism of tumor-induced immune suppression. *Cancer Research* 70: 2245–2255. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3109
- Jonas L, Schuett C, Neels P, Walzel H, Siegl E. (1990). Electron microscopic study of receptor mediated endocytosis of a monoclonal antibody (RoMo-1) against the surface marker CD 14 of human monocytes. *Acta Histochem (Jena)* 89: 339–344.
- Judson M. (2008). Sarcoidosis: clinical presentation, diagnosis, and approach to treatment. *The American journal of the medical sciences* 335: 26–33. DOI: 10.1097/MAJ.0b013e31815d8276
- Kage H, Borok Z. (2012). EMT and interstitial lung disease. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* : 1. DOI: 10.1097/MCP.0b013e3283566721
- Kalluri R, Neilson EG. (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* 112: 1776–1784. DOI: 10.1172/JCI200320530
- Kamenetsky M, Middelhaufe S, Bank EM, Levin LR, Buck J, Steegborn C. (2006). Molecular Details of cAMP Generation in Mammalian Cells: A Tale of Two Systems. *Journal of Molecular Biology* 362: 623–639. DOI: 10.1016/j.jmb.2006.07.045
- Kaneko Y, Kuwano K, Kunitake R, Kawasaki M, Hagimoto N, Miyazaki H, Maeyama T, Tanaka T, Matsuba T, Hara N. (1999). Immunohistochemical localization of B7 costimulating molecules and major histocompatibility complex class II antigen in pulmonary sarcoidosis. *Respiration; international review of thoracic diseases* 66: 343–8. DOI: 29405
- Kantrow SP, Meyer KC, Kidd P, Raghu G. (1997). The CD4/CD8 ratio in BAL fluid is highly variable in sarcoidosis. *European Respiratory Journal* 10: 2716–2721. DOI: 10.1183/09031936.97.10122716
- Kapanci Y, Desmouliere A, Pache JC, Redard M, Gabbiani G. (1995). Cytoskeletal protein modulation in pulmonary alveolar myofibroblasts during idiopathic pulmonary fibrosis: Possible role of transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 152: 2163–2169. DOI:

10.1164/ajrccm.152.6.8520791

Katzenstein ALA, Myers JL. (1998). Idiopathic pulmonary fibrosis: Clinical relevance of pathologic classification. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 157: 1301–1315. DOI: 10.1164/ajrccm.157.4.9707039

Keane MP, Strieter RM, Belperio JA. (2005). Mechanisms and mediators of pulmonary fibrosis. *Critical reviews in immunology* 25: 429–463. DOI: 1b0356b42a8fd5b5,5e8465d26d674ad0 [pii]

Khakh BS, Burnstock G, Kennedy CL, King BF, North RA, Séguéla P, Voigt MM, Humphrey PPA. (2001). International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacological reviews* 53: 107–118.

Khalil N, O'Connor RN, Unruh HW, Warren PW, Flanders KC, Kemp A, Berezney OH, Greenberg AH. (1991). Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta in idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 5: 155–162.

Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D, Chapman HA. (2006). Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 13180–13185. DOI: 10.1073/pnas.0605669103

King BF, Dacquet C, Ziganshin AU, Weetman DF, Burnstock G, Vanhoutte PM, Spedding M. (1996). Potentiation by 2,2'-pyridylisatogen tosylate of ATP-responses at a recombinant P2Y1 purinoceptor. *Br J Pharmacol* 117: 1111–1118.

King TE, Schwarz MI, Brown K, Tooze JA, Colby T V., Waldron JA, Flint A, Thurlbeck W, Cherniack RM. (2001). Idiopathic pulmonary fibrosis: Relationship between histopathologic features and mortality. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 164: 1025–1032. DOI: 10.1164/rccm.200307-1025OC

Kollert F, Probst C, Müller-Quernheim J, Zissel G, Prasse A. (2009). CCL18 production is decreased in alveolar macrophages from cigarette smokers. *Inflammation* 32: 163–168. DOI: 10.1007/s10753-009-9115-5

Koshiha M, Apasov S, Sverdlov V, Chen P, Erb L, Turner JT, Weisman G a, Sitkovsky M V. (1997). Transient up-regulation of P2Y2 nucleotide receptor mRNA expression is an immediate early gene response in activated thymocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 831–836. DOI: 10.1073/pnas.94.3.831

Krupa WM, Dewan M, Jeon MS, Kurtin PJ, Younge BR, Goronzy JJ, Weyand CM. (2002). Trapping of misdirected dendritic cells in the granulomatous lesions of giant cell arteritis. *American Journal of Pathology* 161: 1815–1823. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64458-6

Kuhn C, McDonald JA. (1991). The roles of the myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis. Ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis. *The American journal of pathology* 138: 1257–65.

Kusano F, Tanaka Y, Marumo F, Sato C. (2000). Expression of C-C chemokines is associated with portal and periportal inflammation in the liver of patients with chronic hepatitis C. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 80: 415–422.

Labasi JM, Petrushova N, Donovan C, McCurdy S, Lira P, Payette MM, Brissette W, Wicks JR, Audoly L, Gabel C a. (2002). Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 168: 6436–6445. DOI: 10.4049/jimmunol.168.12.6436

Laliberte RE, Egglar J, Gabel CA. (1999). ATP treatment of human monocytes promotes caspase-1 maturation and externalization. *Journal of Biological Chemistry* 274: 36944–36951. DOI: 10.1074/jbc.274.52.36944

Lasithiotaki I, Antoniou KM, Vlahava V-M, Karagiannis K, Spandidos DA, Siafakas NM, Sourvinos G. (2011). Detection of herpes simplex virus type-1 in patients with fibrotic lung

- diseases. *PLoS ONE* 6 DOI: 10.1371/journal.pone.0027800
- Lem VM, Lipscomb MF, Weissler JC, Nunez G, Ball EJ, Stastny P, Toews GB. (1985). Bronchoalveolar cells from sarcoid patients demonstrate enhanced antigen presentation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 135: 1766–71.
- Leung SY, Yuen ST, Chu KM, Mathy JA, Li R, Chan ASY, Law S, Wong J, Chen X, So S. (2004). Expression profiling identifies chemokine (C-C motif) ligand 18 as an independent prognostic indicator in gastric cancer. *Gastroenterology* 127: 457–469. DOI: 10.1053/j.gastro.2004.05.031
- Li X, Li N, Ban C, Zhu M, Xiao B, Dai H. (2011). Idiopathic pulmonary fibrosis in relation to gene polymorphisms of transforming growth factor-beta1 and plasminogen activator inhibitor 1. *Chinese medical journal (English)* 124: 1923–1927.
- Li Y, Jiang D, Liang J, Meltzer EB, Gray A, Miura R, Wogensen L, Yamaguchi Y, Noble PW. (2011). Severe lung fibrosis requires an invasive fibroblast phenotype regulated by hyaluronan and CD44. *The Journal of experimental medicine* 208: 1459–71. DOI: 10.1084/jem.20102510
- Lin C-C, Lee I-T, Wu W-L, Lin W-N, Yang C-M. (2012). Adenosine triphosphate regulates NADPH oxidase activity leading to hydrogen peroxide production and COX-2/PGE2 expression in A549 cells. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* 303: L401–L412. DOI: 10.1152/ajplung.00090.2012
- Link AA, Kino T, Worth JA, McGuire JL, Crane ML, Chrousos GP, Wilder RL, Elenkov IJ. (2000). Ligand-activation of the adenosine A2a receptors inhibits IL-12 production by human monocytes. *Journal of immunology* 164: 436–442. DOI: ji_v164n1p436 [pii]
- Lopez-Castejon G, Brough D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 22: 189–195. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2011.10.001
- Lüllmann-Rauch R. (2006). *Taschenlehrbuch Histologie. 2., komple.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Luzina IG, Papadimitriou JC, Anderson R, Pochetuhen K, Atamas SP. (2006). Induction of prolonged infiltration of T lymphocytes and transient T lymphocyte-dependent collagen deposition in mouse lungs following adenoviral gene transfer of CCL18. *Arthritis and Rheumatism* 54: 2643–2655. DOI: 10.1002/art.21950
- Luzina IG, Tsybalyuk N, Choi J, Hasday JD, Atamas SP. (2006). CCL18-stimulated upregulation of collagen production in lung fibroblasts requires Sp1 signaling and basal Smad3 activity. *Journal of Cellular Physiology* 206: 221–228. DOI: 10.1002/jcp.20452
- Lwaleed BA, Bass PS, Cooper AJ. (2001). The biology and tumour-related properties of monocyte tissue factor. *Journal of Pathology* 193: 3–12. DOI: 10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH770>3.0.CO;2-Z
- Mantovani A, Sica A, Locati M. (2005). Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 23: 344–346. DOI: 10.1016/j.immuni.2005.10.001
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology* 25: 677–686. DOI: 10.1016/j.it.2004.09.015
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. (2002). Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology* 23: 549–555. DOI: 10.1016/S1471-4906(02)02302-5
- Martinetti M, Luisetti M, Cuccia M. (2002). HLA and sarcoidosis: New pathogenetic insights. *Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Diseases* 19: 83–95.
- Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. (2006). Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *The Journal of Immunology* 177: 7303–7311. DOI: 10.4049/jimmunol.177.10.7303

- Martinez JA, King TE, Brown K, Jennings CA, Borish L, Mortenson RL, Khan TZ, Bost TW, Riches DW. (1997). Increased expression of the interleukin-10 gene by alveolar macrophages in interstitial lung disease. *The American journal of physiology* 273: L676-83.
- Matsumoto K, Murao K, Imachi H, Nishiuchi T, Cao W, Yu X, Li J, Ahmed RA, Iwama H, Kobayashi R, Tokumitsu H, Ishida T. (2008). The role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase cascade on MIP-1alpha gene expression of ATL cells. *Experimental hematology* 36: 390-400. DOI: 10.1016/j.exphem.2007.11.013
- Miyara M1, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S, Kambouchner M, Valeyre D, Chapelon-Abrie C, Debré P, Piette JC, Gorochov G. (2006). The immune paradox of sarcoidosis and regulatory T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 203: 359-370. DOI: 10.1084/jem.20050648
- Mosser DM, Edwards JP. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology* 8: 958-969. DOI: 10.1038/nri2448
- Mubarak KK1, Montes-Worboys A, Regev D, Nasreen N, Mohammed KA, Faruqi I, Hensel E, Baz MA, Akindipe OA, Fernandez-Bussy S, Nathan SD, Antony VB. (2012). Parenchymal trafficking of pleural mesothelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal* 39: 133-140. DOI: 10.1183/09031936.00141010
- Müller-Quernheim UC, Potthast L, Müller-Quernheim J, Zissel G. (2012). Tumor-Cell Co-Culture Induced Alternative Activation of Macrophages Is Modulated by Interferons *In Vitro*. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 32: 169-177. DOI: 10.1089/jir.2011.0020
- Mulshine JL, Chow G, Tauler J. (2010). Cytokines and growth factors stimulate hyaluronan production: Role of hyaluronan in epithelial to mesenchymal-like transition in non-small cell lung cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010 DOI: 10.1155/2010/485468
- Myrtek D, Müller T, Geyer V, Derr N, Ferrari D, Zissel G, Dürk T, Sorichter S, Luttmann W, Kuepper M, Norgauer J, Di Virgilio F, Virchow JC Jr, Idzko M. (2008). Activation of Human Alveolar Macrophages via P2 Receptors: Coupling to Intracellular Ca²⁺ Increases and Cytokine Secretion. *The Journal of Immunology* 181: 2181-2188. DOI: 10.4049/jimmunol.181.3.2181
- de Nadaï P1, Charbonnier AS, Chenivresse C, Sénéchal S, Fournier C, Gilet J, Vorng H, Chang Y, Gosset P, Wallaert B, Tonnel AB, Lassalle P, Tsicopoulos A. (2006). Involvement of CCL18 in allergic asthma. *J Immunol* 176: 6286-6293. DOI: 10.4049/jimmunol.176.10.6286
- Nagaoka I, Trapnell BC, Crystal RG. (1990). Upregulation of platelet-derived growth factor-A and -B gene expression in alveolar macrophages of individuals with idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* 85: 2023-2027. DOI: 10.1172/JCI114669
- Navaratnam V, Fleming KM, West J, Smith CJP, Jenkins RG, Fogarty A, Hubbard RB. (2011). The rising incidence of idiopathic pulmonary fibrosis in the UK. *Thorax* 66: 462-467. DOI: 10.1136/thx.2010.148031
- Neary JT, Rathbone MP, Cattabeni F, Abbracchio MP, Burnstock G. (1996). Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. *Trends in Neurosciences* 19: 13-18. DOI: 10.1016/0166-2236(96)81861-3
- Newton K, Dixit VM. (2012). Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 DOI: 10.1101/cshperspect.a006049
- Nicod LP, Isler P. (1997). Alveolar Macrophages in Sarcoidosis Coexpress High Levels of CD86 (B7.2), CD40, and CD30L. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 17: 91-96. DOI: 10.1165/ajrcmb.17.1.2781
- North RA. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological reviews* 82: 1013-1067. DOI: 10.1152/physrev.00015.2002
- Nunes H, Bouvry D, Soler P, Valeyre D. (2007). Sarcoidosis. *Orphanet journal of rare diseases* 2: 46. DOI: 10.1186/1750-1172-2-46
- Otsuki T, Kanno T, Fujita Y, Tabata C, Fukuoka K, Nakano T, Gotoh A, Nishizaki T. (2012).

- A3 adenosine receptor-mediated p53-dependent apoptosis in Lu-65 human lung cancer cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 30: 210–20. DOI: 10.1159/000339058
- Pan LH, Yamauchi K, Uzuki M, Nakanishi T, Takigawa M, Inoue H, Sawai T. (2001). Type II alveolar epithelial cells and interstitial fibroblasts express connective tissue growth factor in IPF. *European Respiratory Journal* 17: 1220–1227. DOI: 10.1183/09031936.01.00074101
- Pardo A, Selman M. (2002a). Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis. *The international journal of biochemistry & cell biology* 34: 1534–1538. DOI: 10.1016/S1357-2725(02)00091-2
- Pardo A, Selman M. (2002b). Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 7: d1743-61.
- Pardo A, Smith KM, Abrams J, Coffman R, Bustos M, McClanahan TK, Grein J, Murphy EE, Zlotnik A, Selman M. (2001). CCL18/DC-CK-1/PARC up-regulation in hypersensitivity pneumonitis. *Journal of leukocyte biology* 70: 610–616.
- Pechkovsky D V., Prasse A, Kollert F, Engel KMY, Dentler J, Luttmann W, Friedrich K, Müller-Quernheim J, Zissel G. (2010). Alternatively activated alveolar macrophages in pulmonary fibrosis-mediator production and intracellular signal transduction. *Clinical Immunology* 137: 89–101. DOI: 10.1016/j.clim.2010.06.017
- Pelegri P, Surprenant A. (2009). Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1beta release through pyrophosphates. *EMBO J* 28: 2114–2127. DOI: 10.1038/emboj.2009.163
- Pellegatti P, Raffaghello L, Bianchi G, Piccardi F, Pistoia V, Di Virgilio F. (2008). Increased level of extracellular ATP at tumor sites: In vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS ONE* 3 DOI: 10.1371/journal.pone.0002599
- Penglis PS, Cleland LG, Demasi M, Caughey GE, James MJ. (2000). Differential regulation of prostaglandin E2 and thromboxane A2 production in human monocytes: implications for the use of cyclooxygenase inhibitors. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 165: 1605–1611. DOI: 10.4049/jimmunol.165.3.1605
- Piccini A, Carta S, Tassi S, Lasiglie D, Fossati G, Rubartelli A. (2008). ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1beta and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 8067–8072. DOI: 10.1073/pnas.0709684105
- Pietinalho A, Ohmichi M, Hirasawa M, Hiraga Y, Löfroos AB, Selroos O. (1999). Familial sarcoidosis in Finland and Hokkaido, Japan - A comparative study. *Respiratory Medicine* 93: 408–412. DOI: 10.1053/rmed.1999.0579
- Pivarcsi A, Gombert M, Dieu-Nosjean MC, Lauerma A, Kubitzka R, Meller S, Rieker J, Muller A, Da Cunha L, Haahtela A, Sonkoly E, Fridman WH, Alenius H, Kemeny L, Ruzicka T, Zlotnik A, Homey B. (2004). CC chemokine ligand 18, an atopic dermatitis-associated and dendritic cell-derived chemokine, is regulated by staphylococcal products and allergen exposure. *J Immunol* 173: 5810–5817. DOI: 0022-1767/04/\$02.00
- Ploenes T, Scholtes B, Krohn A, Burger M, Passlick B, Müller-Quernheim J, Zissel G. (2013). CC-Chemokine Ligand 18 Induces Epithelial to Mesenchymal Transition in Lung Cancer A549 Cells and Elevates the Invasive Potential. *PLoS ONE* 8 DOI: 10.1371/journal.pone.0053068
- Prasse A, Zissel G, Lützen N, Schupp J, Schmiedlin R, Gonzalez-Rey E, Rensing-Ehl A, Bacher G, Cavalli V, Bevec D, Delgado M, Müller-Quernheim J. (2010). Inhaled vasoactive intestinal peptide exerts immunoregulatory effects in sarcoidosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 182: 540–548. DOI: 10.1164/rccm.200909-1451OC
- Prasse A, Germann M, Pechkovsky D V., Markert A, Verres T, Stahl M, Melchers I, Luttmann W, Müller-Quernheim J, Zissel G. (2007). IL-10-producing monocytes differentiate to

- alternatively activated macrophages and are increased in atopic patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119: 464–471. DOI: 10.1016/j.jaci.2006.09.030
- Prasse A, Pechkovsky D V., Toews GB, Jungraithmayr W, Kollert F, Goldmann T, Vollmer E, Müller-Quernheim J, Zissel G. (2006). A vicious circle of alveolar macrophages and fibroblasts perpetuates pulmonary fibrosis via CCL18. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 173: 781–792. DOI: 10.1164/rccm.200509-1518OC
- Prasse A, Pechkovsky D V., Toews GB, Schäfer M, Eggeling S, Ludwig C, Germann M, Kollert F, Zissel G, Müller-Quernheim J. (2007). CCL18 as an indicator of pulmonary fibrotic activity in idiopathic interstitial pneumonias and systemic sclerosis. *Arthritis and Rheumatism* 56: 1685–1693. DOI: 10.1002/art.22559
- Prasse A, Probst C, Bargagli E, Zissel G, Toews GB, Flaherty KR, Olschewski M, Rottoli P, Müller-Quernheim J. (2009). Serum CC-chemokine ligand 18 concentration predicts outcome in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 179: 717–723. DOI: 10.1164/rccm.200808-1201OC
- Radstake TRDJ, van der Voort R, ten Brummelhuis M, de Waal Malefijt M, Looman M, Figdor CG, van den Berg WB, Barrera P, Adema GJ. (2005). Increased expression of CCL18, CCL19, and CCL17 by dendritic cells from patients with rheumatoid arthritis, and regulation by Fc gamma receptors. *Annals of the rheumatic diseases* 64: 359–67. DOI: 10.1136/ard.2003.017566
- Raghu G, Freudenberger TD, Yang S, Curtis JR, Spada C, Hayes J, Sillery JK, Pope CE, Pellegrini CA. (2006). High prevalence of abnormal acid gastro-oesophageal reflux in idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal* 27: 136–142. DOI: 10.1183/09031936.06.00037005
- Rappl G, Pabst S, Riemann D, Schmidt A, Wickenhauser C, Schütte W, Hombach AA, Seliger B, Grohé C, Abken H. (2011). Regulatory T cells with reduced repressor capacities are extensively amplified in pulmonary sarcoid lesions and sustain granuloma formation. *Clinical Immunology* 140: 71–83. DOI: 10.1016/j.clim.2011.03.015
- Rassow, Joachim; Deutzmann, Rainer; Hauser, Karin; Netzker R. (2006). *Duale Reihe Biochemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Riteau N, Gasse P, Fauconnier L, Gombault A, Couegnat M, Fick L, Kanellopoulos J, Quesniaux VF, Marchand-Adam S, Crestani B, Ryffel B, Couillin I. (2010). Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 182: 774–783. DOI: 10.1164/rccm.201003-0359OC
- Rivest S, Lacroix S, Vallières L, Nadeau S, Zhang J, Laflamme N. (2000). How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 223: 22–38. DOI: pse22304 [pii]
- Rock JR, Barkauskas CE, Cronic MJ, Xue Y, Harris JR, Liang J, Noble PW, Hogan BLM. (2011). Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: E1475–E1483. DOI: 10.1073/pnas.1117988108
- Romagnoli R, Baraldi PG, Cruz-Lopez O, Lopez-Cara C, Preti D, Borea PA, Gessi S. (2008). The P2X7 receptor as a therapeutic target. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 12 DOI: 10.1517/14728222.12.5.647
- Rossi GA, Zocchi E, Sacco O, Balbi B, Ravazzoni C, Damiani G. (1986). Alveolar macrophage stimulation of T-cell proliferation in autologous mixed lymphocyte reactions. Role of HLA-DR antigens. *Am Rev Respir Dis* 133: 78–82.
- Rostène W, Kitabgi P, Parsadaniantz SM. (2016). Chemokines: a new class of neuromodulator? *Nature reviews. Neuroscience* 8: 895–903. DOI: 10.1038/nrn2255

- Rothkrantz-Kos S, Van Dieijen-Visser MP, Mulder PGH, Drent M. (2003). Potential usefulness of inflammatory markers to monitor respiratory functional impairment in sarcoidosis. *Clinical Chemistry* 49: 1510–1517. DOI: 10.1373/49.9.1510
- Rybicki B, Sinha R, Iyengar S, Gray-McGuire C, Elston RC, Iannuzzi MC; SAGA Study Consortium. (2005). A sarcoidosis genetic linkage consortium: The sarcoidosis genetic analysis (SAGA) study. *Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Diseases* 22: 115–122.
- Ryzhov S, Zaynagetdinov R, Goldstein AE, Novitskiy S V., Blackburn MR, Biaggioni I, Feoktistov I. (2007). Effect of A2B Adenosine Receptor Gene Ablation on Adenosine-Dependent Regulation of Proinflammatory Cytokines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 324: 694–700. DOI: 10.1124/jpet.107.131540
- la Sala A, Ferrari D, Corinti S, Cavani A, Di Virgilio F, Girolomoni G. (2001). Extracellular ATP Induces a Distorted Maturation of Dendritic Cells and Inhibits Their Capacity to Initiate Th1 Responses. *The Journal of Immunology* 166: 1611–1617. DOI: 10.4049/jimmunol.166.3.1611
- Sanz JM, Di Virgilio F. (2000). Kinetics and mechanism of ATP-dependent IL-1 beta release from microglial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164: 4893–4898. DOI: ji_v164n9p4893 [pii]
- Schmidt RF, Lang F, Thews G. (2005). *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie* Schraufstatter IU, Zhao M, Khaldoyanidi SK, Discipio RG. (2012). The chemokine CCL18 causes maturation of cultured monocytes to macrophages in the M2 spectrum. *Immunology* 135: 287–298. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2011.03541.x
- Schulze-Lohoff E, Hugo C, Rost S, Arnold S, Gruber A, Brüne B, Sterzel RB. (1998). Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured mesangial cells via P2Z/P2X7 receptors. *The American journal of physiology* 275: F962–F971.
- Schupp JC, Binder H, Jäger B, Cillis G, Zissel G, Müller-Quernheim J, Prasse A. (2015). Macrophage activation in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS ONE* 10 DOI: 10.1371/journal.pone.0116775
- Schutyser E, Struyf S, Proost P, Opdenakker G, Laureys G, Verhasselt B, Peperstraete L, Van de Putte I, Saccani A, Allavena P, Mantovani A, Van Damme J. (2002). Identification of biologically active chemokine isoforms from ascitic fluid and elevated levels of CCL18/pulmonary and activation-regulated chemokine in ovarian carcinoma. *Journal of Biological Chemistry* 277: 24584–24593. DOI: 10.1074/jbc.M112275200
- Schutyser E. (2005). Involvement of CC chemokine ligand 18 (CCL18) in normal and pathological processes. *Journal of Leukocyte Biology* 78: 14–26. DOI: 10.1189/jlb.1204712
- Schutyser E, Struyf S, Wuyts A, Put W, Geboes K, Grillet B, Opdenakker G, Van Damme J. (2001). Selective induction of CCL18/PARC by staphylococcal enterotoxins in mononuclear cells and enhanced levels in septic and rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunology* 31: 3755–3762. DOI: 10.1002/1521-4141(200112)31:12<3755::AID-IMMU3755>3.0.CO;2-O
- Selman M. (2003). The Spectrum of Smoking-Related Interstitial Lung Disorders: The Never-Ending Story of Smoke and Disease. *Chest* 124: 1185–1187. DOI: 10.1378/chest.124.4.1185
- Semenzato, G.; Bortoli, M.; Brunetta, E.; Agostini C. (2005). *Sarcoidosis*. Drent U. MC (ed). European Respiratory Society.
- Shearer JD, Richards JR, Mills CD, Caldwell MD. (1997). Differential regulation of macrophage arginine metabolism: a proposed role in wound healing. *The American journal of physiology* 272: E181–E190.
- Shemon AN, Sluyter R, Fernando SL, Clarke AL, Dao-Ung LP, Skarratt KK, Saunders BM, Tan KS, Gu BJ, Fuller SJ, Britton WJ, Petrou S, Wiley JS. (2006). A Thr357 to Ser polymorphism in homozygous and compound heterozygous subjects causes absent or reduced P2X7 function and impairs ATP-induced mycobacterial killing by macrophages. *Journal of*

- Biological Chemistry* 281: 2079–2086. DOI: 10.1074/jbc.M507816200
- Sica A, Mantovani A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas. *Journal of Clinical Investigation* 122: 787–795. DOI: 10.1172/JCI59643
- Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. (2006). Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy. *European Journal of Cancer* 42: 717–727. DOI: 10.1016/j.ejca.2006.01.003
- Sims JE, Giri JG, Dower SK. (1994). The two interleukin-1 receptors play different roles in IL-1 actions. *Clinical immunology and immunopathology* 72: 9–14. DOI: 10.1006/clin.1994.1100
- Sin DD, Miller BE, Duvoix A, Man SF, Zhang X, Silverman EK, Connett JE, Anthonisen NA, Wise RA, Tashkin D, Celli BR, Edwards LD, Locantore N, Macnee W, Tal-Singer R, Lomas DA; ECLIPSE Investigators. (2011). Serum PARC/CCL-18 concentrations and health outcomes in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 183: 1187–1192. DOI: 10.1164/rccm.201008-1220OC
- Sitkovsky M V., Ohta A. (2005). The “danger” sensors that STOP the immune response: The A2 adenosine receptors? *Trends in Immunology* 26: 299–304. DOI: 10.1016/j.it.2005.04.004
- Souza CA, Müller NL, Flint J, Wright JL, Churg A. (2005). Idiopathic pulmonary fibrosis: Spectrum of high-resolution CT findings. *American Journal of Roentgenology* 185: 1531–1539. DOI: 10.2214/AJR.04.1599
- Stahl M, Schupp J, Jaeger B, Schmid M, Zissel G, Müller-Quernheim J, Prasse A. (2013). Lung collagens perpetuate pulmonary fibrosis via CD204 and M2 macrophage activation. *PLoS ONE* 8 DOI: 10.1371/journal.pone.0081382
- Steele MP, Speer MC, Loyd JE, Brown KK, Herron A, Slifer SH, Burch LH, Wahidi MM, Phillips JA 3rd, Sporn TA, McAdams HP, Schwarz MI, Schwartz DA. (2005). Clinical and pathologic features of familial interstitial pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 172: 1146–1152. DOI: 10.1164/rccm.200408-1104OC
- Struyf S, Schutyser E, Gouwy M, Gijssbers K, Proost P, Benoit Y, Opdenakker G, Van Damme J, Laureys G. (2003). PARC/CCL18 is a plasma CC chemokine with increased levels in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol* 163: 2065–2075. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63564-X
- Sunderman FW. (1990). The clinical biochemistry of 5'-nucleotidase. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 20: 123–139.
- Taflin C, Miyara M, Nochy D, Valeyre D, Naccache JM, Altare F, Salek-Peyron P, Badoual C, Bruneval P, Haroche J, Mathian A, Amoura Z, Hill G, Gorochov G. (2009). FoxP3+ Regulatory T Cells Suppress Early Stages of Granuloma Formation but Have Little Impact on Sarcoidosis Lesions. *The American Journal of Pathology* 174: 497–508. DOI: 10.2353/ajpath.2009.080580
- Tatur S, Groulx N, Orlov SN, Grygorczyk R. (2007). Ca²⁺-dependent ATP release from A549 cells involves synergistic autocrine stimulation by coreleased uridine nucleotides. *The Journal of physiology* 584: 419–35. DOI: 10.1113/jphysiol.2007.133314
- The National Center for Biotechnology Information. (n.d.). IL1B interleukin 1, beta [Homo sapiens]. *The National Center for Biotechnology Information* [online] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=3553> (Accessed 4 January 2013)
- Thorén S, Jakobsson PJ. (2000). Coordinate up- and down-regulation of glutathione-dependent prostaglandin E synthase and cyclooxygenase-2 in A549 cells: Inhibition by NS-398 and leukotriene C4. *European Journal of Biochemistry* 267: 6428–6434. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01735.x
- Törnroth-Horsefield, S.; Neutze R. (2008). Opening and closing the metabolite gate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:

19565–19566.

University of Leeds. (n.d.). Nature's batteries' may have helped power early lifeforms. [online] Available from: <http://www.sciencedaily.com/releases/2010/05/100525094906.htm> (Accessed 19 December 2012)

Venet A, Hance AJ, Saltini C, Robinson BW, Crystal RG. (1985). Enhanced alveolar macrophage-mediated antigen-induced T lymphocyte proliferation in sarcoidosis. *Journal of Clinical Investigation* 75: 293–301. DOI: 10.1172/JCI11688

Vulcano M, Struyf S, Scapini P, Cassatella M, Bernasconi S, Bonecchi R, Calleri A, Penna G, Adorini L, Luini W, Mantovani A, Van Damme J, Sozzani S. (2003). Unique Regulation of CCL18 Production by Maturing Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 170: 3843–3849. DOI: 10.4049/jimmunol.170.7.3843

Wahlström J, Berlin M, Sköld CM, Wigzell H, Eklund A, Grunewald J. (1999). Phenotypic analysis of lymphocytes and monocytes/macrophages in peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid from patients with pulmonary sarcoidosis. *Thorax* 54: 339–46. DOI: 10.1136/thx.54.4.339

Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death and Differentiation* 10: 45–65. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401189

Wallace WA, Ramage EA, Lamb D, Howie SE. (1995). A type 2 (Th2-like) pattern of immune response predominates in the pulmonary interstitium of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis (CFA). *Clinical and experimental immunology* 101: 436–41. DOI: 10.1111/j.1365-2249.1995.tb03131.x

Wallace WAH, Howie SEM. (1999). Immunoreactive interleukin 4 and interferon- γ expression by type II alveolar epithelial cells in interstitial lung disease. *The Journal of Pathology* 187: 475–480. DOI: 10.1002/(sici)1096-9896(199903)187:4<475::aid-path268>3.0.co;2-n

Ward JR, West PW, Ariaans MP, Parker LC, Francis SE, Crossman DC, Sabroe I, Wilson HL. (2010). Temporal interleukin-1 β secretion from primary human peripheral blood monocytes by P2X7-independent and P2X7-dependent mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 285: 23147–23158. DOI: 10.1074/jbc.M109.072793

Wilson JM, Kurtz CC, Black SG, Ross WG, Alam MS, Linden J, Ernst PB. (2011). The A2B Adenosine Receptor Promotes Th17 Differentiation via Stimulation of Dendritic Cell IL-6. *The Journal of Immunology* 186: 6746–6752. DOI: 10.4049/jimmunol.1100117

Winterbauer RH, Lammert J, Selland M, Wu R, Corley D, Springmeyer SC. (1993). Bronchoalveolar lavage cell populations in the diagnosis of sarcoidosis. *Chest* 104: 352–361. DOI: 10.1378/chest.104.2.352

Wojtan P, Mierzejewski M, Osińska I, Domagała-Kulawik J. (2016). Macrophage polarization in interstitial lung diseases. *Central European Journal of Immunology* 2: 159–164. DOI: 10.5114/ceji.2016.60990

Wynn TA. (2004). Fibrotic disease and the TH1/TH2 paradigm. *Nature Reviews Immunology* 4: 583–594. DOI: 10.1038/nri1412

Zeiser R, Penack O, Holler E, Idzko M. (2011). Danger signals activating innate immunity in graft-versus-host disease. *Journal of Molecular Medicine* 89: 833–845. DOI: 10.1007/s00109-011-0767-x

Zheng LM, Zychlinsky A, Liu C-C, Ojcius DM, Ding J, Young -E. (1991). Extracellular ATP as a Trigger for Apoptosis or Programmed Cell Death. *Journal of Cell Biology* 112: 279–288. DOI: 10.1083/jcb.112.2.279

Ziegenhagen MW, Rothe ME, Schlaak M, Müller-Quernheim J. (2003). Bronchoalveolar and serological parameters reflecting the severity of sarcoidosis. *European Respiratory Journal* 21: 407–413. DOI: 10.1183/09031936.03.00010403

Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ,

MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116 DOI: 10.1182/blood-2010-02-258558

Zimmermann H. (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 362: 299–309. DOI: 10.1007/s002100000309

Zissel G, Ernst M, Schlaak M, Müller-Quernheim J. (1997). Accessory function of alveolar macrophages from patients with sarcoidosis and other granulomatous and nongranulomatous lung diseases. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* 45: 75–86.

Bildnachweis:

Abb. 1: Biolegend, The path to legendary discovery – Macrophage polarization: M1 vs M2, <https://www.biolegend.com/NewsLegend/022311/index.htm> (Stand 01.02.2013, 15.00 Uhr)

Abb. 2: Fernandez, I. E., and O. Eickelberg. 2012. New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 380:680-688.

Abb. 3: PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM - KLINIKAI KÖZPONT, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet (Klinisches Zentrum der Universität Pécs, Institut für Immunologie und Biotechnologie, deutsche Version), Separation der Blutzellen,

http://www.immbio.hu/de/edu/pr_ficoll_de09.pdf (Stand 17.01.2013, 16.00 Uhr)

Abb. 4: MACS technology – the basic principle, Miltenyi Biotec, <https://www.miltenyibiotec.com/Products-and-Services/MACS-Cell-Separation/MACS-Technology/Basic-principle.aspx> (Stand 17.01.2013, 21.00 Uhr)

Abb. 5: Modifiziert nach Leinco technologies, Sandwich ELISA Step by Step Diagram, <http://blog.leinco.com/2010/sandwich-elisa-step-by-step-diagram/> (Stand: 21.01.2013, 13.00 Uhr)

Abb. 6: Modifiziert nach Schoolworkhelper - St. Rosemary Educational Institution, PCR: Uses, Steps, Purpose, <http://schoolworkhelper.net/pcr-uses-steps-purpose/> (Stand 21.01.2013, 16.00 Uhr)

Abb. 7-18: Legende: * p<0,05 signifikant
 ** p<0,01 sehr signifikant
 *** p>0,001 höchst signifikant

8. Publikation

Abstract at the 46th Annual Meeting of the Society for Leukocyte Biology 2013. ATP Regulates Macrophage Cellular Plasticity by the Inhibition of Monocyte-derived Alternatively

Activated Macrophages Differentiation - Gernot Zissel, Benedikt F. Scherr, Kerstin Höhne, Tobias Müller, Korcan C. Ayata, Joachim Müller-Quernheim, Marco Idzko. Department of Pneumology, University Medical Centre Freiburg, Freiburg, Germany

PLOS ONE. Chemokine (C-C motif) ligand CCL18-downregulation and temporal limitation of differentiation in monocytes by extracellular adenosine-5'-triphosphate (ATP) - Benedikt F. Scherr, Tobias Müller, C. Korcan Ayata, Kerstin Höhne, Joachim Müller-Quernheim, Marco Idzko, Gernot Zissel (Manuscript in review, Manuscript Number: PONE-D-19-07753)

9. Anhang

A. *Lebenslauf*

Entnahme aus datenschutzrechtlichen Gründen

B. *Eidesstattliche Versicherung*

Eidesstattliche Versicherung gemäß § 8 Absatz 1 Nr. 3 der Promotionsordnung der Universität Freiburg für die Medizinische Fakultät

Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema

„Einfluss von ATP und seinen Derivaten auf die Aktivierung von Monozyten“

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Ordnung der Albert-Ludwigs-Universität zur Sicherung der Redlichkeit in der Wissenschaft habe ich zur Kenntnis genommen und akzeptiert

Die Dissertation oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.

Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.

Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erkläre und nichts verschwiegen habe.

Ort und Datum

Unterschrift (Benedikt Florian Scherr)

C. Erklärung zum Eigenanteil

Studienkonzept: Prof. Dr. rer. nat. G. Zissel, B. Scherr

Durchführung Versuche und Auswertung: B. Scherr

Durchführung Datenrecherche: B. Scherr

Betreuung der Arbeit: Prof. Dr. rer. nat. G. Zissel

Publikation: B. Scherr, Prof. Dr. rer. nat. G. Zissel, PD Dr. med. T. Müller, Dr. rer. nat. C.

Korcan Ayata, Dr. rer. nat. Kerstin Höhne, Prof. Dr. med. Joachim Müller-Quernheim, Prof.

Dr. med. Marco Idzko

D. Danksagung

Meinem Doktorvater und Betreuer, Herrn Professor Dr. rer. nat. Gernot Zissel, gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, die sehr geduldige Unterstützung und engagierte Betreuung in theoretischen und praktischen Fragen, die Einarbeitung in die experimentelle Medizin und Bereitstellung des Labors, die Korrektur meiner Manuskripte und seine stetige Hilfsbereitschaft.

Herrn Privatdozent Dr. med. Torben Pottgießer danke ich für das Zweitgutachten.

Bei dem ärztlichen Direktor der Abteilung für Pneumologie, Herrn Professor Dr. med. Joachim Müller-Quernheim, möchte ich mich für sein Interesse am Fortschritt meiner Arbeit und die Korrektur der Veröffentlichung bedanken.

Frau Dr. rer. nat. Kerstin Höhne, Herrn Dr. med. Till Ploenes und Lars Potthast danke ich für die Einarbeitung in die Methodik der Arbeit, die Unterstützung und Hilfestellung bei Problemen jeder Art und ihr Interesse an meiner Arbeit.

Desweiteren bedanken möchte ich mich bei Sofia Kamenenker für ihren Einsatz, ihre stetige Hilfsbereitschaft und die Bereitstellung der benötigten Materialien.

Herzlich danke ich allen Doktoranden und Diplomanden des Labors, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen, von denen ich viel lernen konnte und die immer für eine gute Stimmung und ein tolles Klima gesorgt haben.

Ich möchte außerdem den großzügigen Blutspendern für ihre Hilfe herzlich danken.

Schlussendlich gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern, und daneben meinen Geschwistern und all meinen Freunden, die mich in allen Belangen und in allen Lagen immer unterstützt haben und mir mein Studium und diese Arbeit so erst möglich gemacht haben.