

**Aus der Medizinischen Klinik, Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität  
München**

**Direktor: Professor Dr. med. D. Schlöndorff**

**Einfluss von 17 $\beta$ -Östradiol und 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> auf die Funktion von Zellen  
der monozytischen Zellreihe**

**Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**George Vlotides, 2003**

**Aus der Medizinischen Klinik, Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität  
München**

**Direktor: Professor Dr. med. D. Schlöndorff**

**Einfluss von 17 $\beta$ -Östradiol und 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> auf die Funktion von Zellen  
der monozytischen Zellreihe**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
George Vlotides, 2003

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. R. Gärtner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. R. Lorenz  
Prof. Dr. med. H.P. Schwarz

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. M. Angstwurm

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 05.06.2003

## **Danksagung**

Mein herzlichster Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. R. Gärtner, für die Bereitstellung des Themas sowie die interessanten Diskussionen, konstruktive Kritik, Unterstützung und besonders Motivation bei der Durchführung der Arbeit.

Bei Herrn Dr. med. M. Angstwurm möchte ich mich für die intensive Betreuung, das Einarbeiten in zellbiologische und durchflußzytometrische Methoden sowie für die Förderung selbstständigen wissenschaftlichen Arbeitens und Denkens und für zahlreiche Anregungen und Ratschläge bedanken.

Ganz besonders danke ich Frau Petra Rank für die hervorragende Zusammenarbeit, für ihre Unterstützung bei der alltäglichen Arbeit im Labor und insbesondere für das ausgesprochen herzliche und freundschaftliche Arbeitsklima.

Herrn Prof. Dr. med. H. W. Ziegler-Heitbrock am Institut für Immunologie danke ich für die freundliche Gabe der monozytischen Zelllinie Mono Mac VI und bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Schramm möchte ich mich für die Bereitstellung diverser Geräte bedanken.

Ebenso möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranden Antje Sander und Stephan Schwarz für die freundliche Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung und bei meiner Kommilitonin Natalie Jetter für das Korrekturlesen des Manuskripts bedanken.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I. Einleitung</b>	7
1) 17 $\beta$ -Östradiol	7
1.1) Allgemeine Grundlagen - Östrogenbiosynthese	7
1.2) Geschlecht und Klinik	8
1.3) Mechanismen der Östrogenrezeptoraktivierung in Zielzellen	9
1.4) Östrogenrezeptoren in Lymphozyten	9
1.5) Östrogenrezeptoren in Makrophagen	11
1.6) Östrogene und Gerinnung	13
2) 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> (Calcitriol)	13
2.1) Vitamin D – allgemeine Grundlagen	13
2.2) Interaktion von Vitamin D mit immunkompetenten Zellen	15
2.3) Calcitriol und Differenzierung	17
<b>II. Zielsetzung der Arbeit</b>	18
<b>III. Materialien und Methoden</b>	19
3.1 Verwendete Substanzen und Materialien	19
3.2 Verwendete Antikörper	20
3.3 Geräte	20
3.4 Durchflußzytometrie	22
3.5 Zelllinien	24
3.5.1 Mono Mac 6-Zellen	24
3.5.2 THP-1-Zellen	25
3.5.3 Zellzählung mit dem Coulter-Counter	26
3.5.4 Vitalitätsprüfung mit Acridinorange / Ethidiumbromid	26
3.5.5 Kryokonservierung der Zellen	26
3.5.6 Erfassung und Quantifizierung von Oberflächenantigenen bei den Zelllinien	27
3.6 Periphere Blutmonozyten	29
3.6.1 Isolierung der Zellen	29
3.6.2 Kultur	30
3.6.3 Erfassung und Quantifizierung von Oberflächenantigenen bei den Blutmonozyten	30
3.7 Trypsin-Methode für die durchflußzytometrische DNS-Phasen-Analyse	32
3.7.1 Prinzip der DNS-Phasen-Analyse	32
3.7.2 Einstellung des Gerätes	33
3.7.3 Vorbereitung der MM6-Zellen für die durchflußzytometrische DNS-Analyse	34
3.8 Bestimmung von Tumor Necrosis Factor $\alpha$	34
3.9 Datenverarbeitung/ statistische Auswertung	36
<b>IV. Methodische Vorversuche</b>	37
4.1 Optimierung der für die Anzucht in well plates pro well benötigten Zellzahl	37
4.2 Untersuchung des Einflusses des Farbstoffes Phenolrot im Kulturmedium auf die Proliferation der Zellen	38
4.3 Untersuchung des Einflusses der Lage der Zellen in der Kulturplatte auf ihre Proliferation	38
4.4 Beurteilung der Isolationsmethode der peripheren Blutmonozyten	40
4.5 Methodik zur Bestimmung der Oberflächenexpression vom TF bei den peripheren Blutmonozyten	41
4.5.1 Basaler und LPS-induzierter TF ohne Fc-Rezeptor-Block	41
4.5.2 Basaler und LPS-induzierter TF mit Fc-Rezeptor-Block	42
4.5.3 Vitalität der Zellen und basaler TF im Verlauf der in vitro-Kultur	43
4.5.4 LPS-Empfindlichkeit der Zellen im Verlauf der Kultur	44
4.6 Methodik zur Bestimmung der Oberflächenexpression vom TF bei MM6-Zellen	46
4.6.1 Basale TF-Expression; Bedeutung der Blockierung von Fc-Rezeptoren	46
4.6.2 Vergleich von Gesamtpopulation und CD14-positiven Zellen im Hinblick auf die basale TF-Expression	47
<b>V Ergebnisse Calcitriol</b>	49
5.1 MM6-Zellen	49
5.1.1 Einfluß von Calcitriol auf die CD14-Expression	49
5.1.2 Einfluß von Calcitriol auf die basale und LPS-induzierte TF-Expression	51
5.1.3 LPS-Empfindlichkeit der Zellen unter Calcitriol bezüglich TNF $\alpha$ -Produktion	52
5.2 THP-1-Zellen	53
5.2.1 Einfluß von Calcitriol auf die CD14-Expression	53
5.2.2 Einfluß von Calcitriol auf die basale und LPS-induzierte TF-Expression	55
5.3 Periphere Blutmonozyten	57

5.3.1 Einfluß von Calcitriol auf die CD14-Expression.....	57
5.3.2 Einfluß von Calcitriol auf die basale und LPS-induzierte TF-Expression.....	58
5.3.3 LPS-Empfindlichkeit der Zellen unter Calcitriol bezüglich der Produktion von TNF $\alpha$ .....	59
<b>VI Ergebnisse 17<math>\beta</math>-Östradiol</b> .....	61
6.1 MM6-Zellen.....	61
6.1.1 Einfluß von E <sub>2</sub> auf die Proliferation.....	61
6.1.2 Basale Oberflächenexpression von TF unter E <sub>2</sub> .....	63
6.1.3 Einfluss von E <sub>2</sub> auf die LPS-induzierte TF-Expression .....	64
6.1.4 LPS-Empfindlichkeit der Zellen unter E <sub>2</sub> bezüglich der TNF $\alpha$ -Produktion .....	69
6.2 THP-1-Zellen .....	70
6.2.1 Einfluß von E <sub>2</sub> auf die LPS-induzierte TF-Expression.....	70
6.3 Periphere Blutmonozyten .....	73
6.3.1 Einfluß von E <sub>2</sub> auf TF ohne Vit.D <sub>3</sub> .....	74
6.3.2 Einfluß von LPS und E <sub>2</sub> auf CD14-Expression ohne Vit.D <sub>3</sub> .....	75
6.3.3 Einfluß von E <sub>2</sub> auf TNF $\alpha$ ohne Vit.D <sub>3</sub> .....	75
6.3.4 Einfluß von E <sub>2</sub> auf TF mit Vit.D <sub>3</sub> .....	76
6.3.5 Einfluß von LPS und E <sub>2</sub> auf die CD14-Expression mit Vit.D <sub>3</sub> .....	77
6.3.6 Einfluß von E <sub>2</sub> auf TNF $\alpha$ mit Vit.D <sub>3</sub> .....	78
<b>VII. Diskussion</b> .....	79
7.1 Zusammenfassung.....	79
7.2 Methodische Vorversuche .....	79
7.3 Calcitriol .....	81
7.4 Östradiol .....	83
7.5 Interaktion Östradiol/ Calcitriol.....	85
<b>VIII. Literaturverzeichnis</b> .....	86
<b>IX. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	97
<b>X. Anhang</b> .....	98
<b>XI. Lebenslauf</b> .....	100

## I. Einleitung

### 1) 17 $\beta$ -Östradiol

#### 1.1) Allgemeine Grundlagen - Östrogenbiosynthese

Östrogene und Progesterone sind die Hauptsyntheseprodukte der Zellen des Ovars. Die Biosynthese beider Hormongruppen geht vom Pregnenolon aus, das einen Vorläufer aller Steroidhormone darstellt. Progesteron entsteht in den Granulosazellen durch 17 $\beta$ -Hydroxylierung von Pregnenolon. Da die Zellen nur sehr geringe Konzentrationen der Enzyme P450c17 und C17,20-Lyase (zur Androgenbiosynthese) und keine P450c21- bzw. P450c11 $\beta$ -Enzyme (zur Cortisolbiosynthese) enthalten, ist Progesteron das Endprodukt.

Androgene stellen die Prohormone der Östrogene dar. Der Hauptweg für die Biosynthese im Ovar ist der  $\Delta$ 4-Stoffwechselweg, in dem die Enzyme 17 $\alpha$ -Hydroxylase und C17,20-Lyase Progesteron in Androstendion überführen. Da diese Enzyme nicht in den Granulosazellen vorhanden sind, muß diese enzymatische Umwandlung in den Theca-interna-Zellen erfolgen. Das gebildete Androstendion diffundiert in die Granulosazellen, in denen es durch die 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase teilweise zu Testosteron hydroxyliert wird. Der entscheidende Schritt ist die Umwandlung von Androstendion in Östron bzw. von Testosteron in Östradiol durch den 19-Hydroxylase-Aromatase-Komplex (Abb.1). Das Enzym spaltet die CH<sub>2</sub>-OH-Seitenkette ab und aromatisiert Ring A. Nach der Menopause produziert das Ovar nur minimale Mengen von Östradiol bzw. Östron, so daß die Nebennierenrinde der wesentliche Faktor bei der Östrogensynthese wird. Dieses Organ setzt jedoch nicht Östrogene frei, sondern deren Prohormon Androstendion, das in peripheren Geweben, die den Aromatasekomplex besitzen (z.B. Fettgewebe, Muskel, Leber, Haarfollikel oder Gehirn), in Östradiol überführt wird.

Östron kann zu Östronsulfat konjugiert werden, welches eine Speicherform darstellt, die in Östron rücküberführt werden kann. Östriol wird v.a. im Blut und im Urin von schwangeren Frauen gefunden. Es entsteht aus Östron durch Hydroxylierung am C-Atom 16 und durch Reduktion der Ketogruppe des C-Atoms 17 (Löffler & Petrides 1988). Bei Männern wird ein Teil des Östradiols im Hoden produziert (<20 %), die größte Menge (>80 %) entsteht aber peripher durch Aromatisierung aus Testosteron (Masi et al 1995)

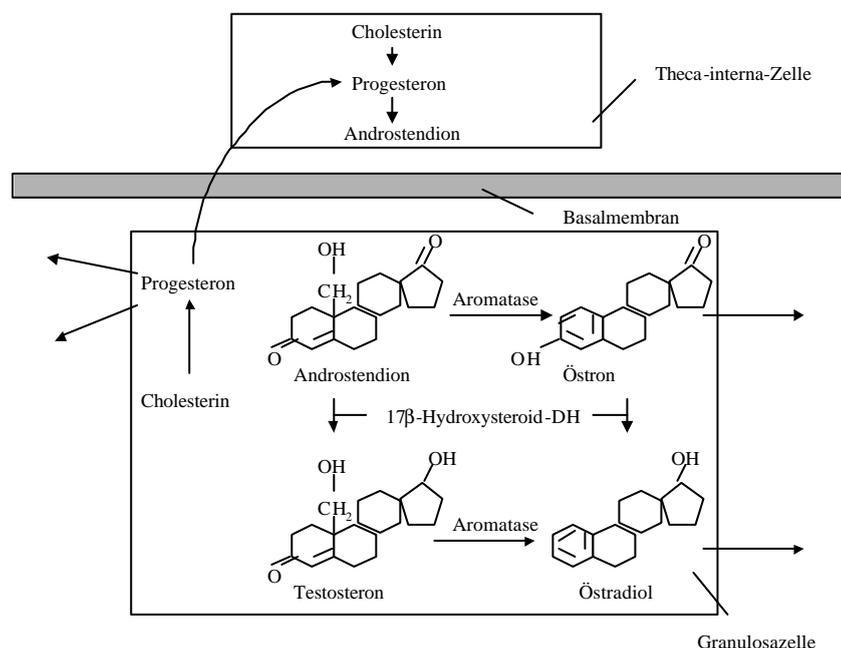


Abb.1: Östrogenbiosynthese: Kooperation zwischen Granulosa- und Theca-interna-Zellen (Löffler & Petrides 1988)

## 1.2) Geschlecht und Klinik

Es ist auffällig, daß Autoimmunerkrankungen viel häufiger bei Frauen als bei Männern auftreten (Tab.1). Der systemische Lupus erythematoses (SLE) wird in den meisten Fällen während oder nach der Pubertät manifest, wobei Frauen im gebärfähigen Alter (16-50 Jahre) am häufigsten betroffen sind. Die SLE-Rate von betroffenen Männern zu Frauen beträgt nach der Pubertät 1:10, bei Kindern 1:3 und bei den Älteren 1:8 (Lahita 1996a).

<i>Erkrankung</i>	<i>Rate Frauen / Männer</i>
SLE	9:1
Rheumatoide Arthritis	2-4:1
M. Basedow	4-8:1
Hashimoto Thyreoiditis	25:1
Sjögren Syndrom	9:1
Myasthenia gravis	2:1
Multiple Sklerose	1-5:1

Tab.1 Geschlechtsgebundene Unterschiede von Autoimmunerkrankungen (Lahita 1996a, Ansar et al 1999)

Ursache dieser erhöhten Rate an Autoimmunerkrankungen bei Frauen könnte eine im Vergleich zu Männern intensivere humorale und zelluläre Immunantwort sein. (Ahmed et al 1985). Frauen haben höhere Immunglobulinkonzentrationen als Männer und produzieren höhere AK-Mengen nach Immunisierung gegen verschiedene Mikroorganismen (Rhodes et al 1969, Butterworth et al 1967). Studien mit Dialysepatienten, welche mit Hepatitis-B-Virus infiziert waren, haben gezeigt, daß Frauen häufiger Anti-Hbe Antikörper entwickelten und Hbe-Antigen negativ wurden, wohingegen Männer häufiger chronische Hbe-Antigen Träger blieben (London & Drew 1969).

Ein zusätzlicher Hinweis auf eine stärkere zelluläre Immunantwort in Frauen ist die häufigere Abstoßung von Transplantaten und ihre relative Resistenz auf Immuntoleranz (Graff et al 1969, Dresser 1962).

Da gerade Frauen im gebärfähigen Alter viel häufiger von Autoimmunerkrankungen betroffen sind, hat man die Konzentration von Sexualhormonen und anderen metabolischen Faktoren in Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) und SLE evaluiert und dabei Unterschiede gesehen (Junghers et al 1982, Masi et al 1984, Lahita et al 1983, Hedman et al 1989).

Es wurden speziell niedrige Androgen-Spiegel in männlichen RA-Patienten und in männlichen und weiblichen SLE-Patienten ein veränderter Östron- Metabolismus mit einer Dominanz von feminisierenden 16-hydroxylierten Metaboliten beobachtet (Lahita et al 1981, Cutolo et al 1986, Cutolo et al 1988).

Als Folge dieser immunmodulatorischen Aktivität von gonadalen Steroiden wurde in den letzten Jahrzehnten eine Sexualhormon-Substitutionstherapie für verschiedene immunabhängige Erkrankungen eingeführt, die aber im Endeffekt sehr unterschiedliche Ergebnisse zeigte (Myron et al 1964, Agnello et al 1983, Jungers et al 1985, Cutolo et al 1991, Lahita 1993, Hall et al 1994).

- ↑ Immunglobulinspiegel (IgM)
- ↑ Antigen- spezifische Antikörper
- ↑ Autoantikörper

- ↑ Mengen an T-Helfer- Zellen
- ↓ Fähigkeit Hauttransplantate zu empfangen

Tab.2 Unterschiede bezüglich der weiblichen Immunantwort (Lahita 1996b)

### 1.3) Mechanismen der Östrogenrezeptoraktivierung in Zielzellen

Ein allgemeines Modell der Wirkung von Steroiden, wie in Abb.2 gezeigt, kann man für die Wirkung sowohl von Östrogen, als auch von Progesteron, Androgen und Glukokortikoiden einsetzen. Es ist wahrscheinlich so, daß freie Steroide durch passive Diffusion in alle Zellen eindringen, sie verbleiben aber bevorzugt in bestimmten Zielzellen, was durch die Ausbildung eines Komplexes hoher Affinität mit dem spezifischen Steroidrezeptor induziert wird. Die Bindung der Steroide führt zur Aktivierung des Rezeptormoleküls, was zu Konformationsänderungen und posttranslationalen Veränderungen des Rezeptors selbst als auch zu Veränderungen in der Protein-Protein-Bindung im Rezeptorkomplex führt. Danach bindet der aktivierte Komplex (Steroidrezeptor) mit hoher Affinität an spezifische DNS-Sequenzen, die man „steroid response elements“ (SRE) nennt. Die SRE wirken als Transkriptionsfaktor und modulieren die Transkriptionsrate von steroidempfindlichen Genen oder verstärken posttranskriptionelle Schritte und verändern somit die spezifische mRNA Produktion (Landers & Spelsberg 1992).

Im Immunsystem sind bis zum jetzigen Zeitpunkt Östrogenrezeptoren in Thymuszellen (Nilsson et al 1984, Danel et al 1983, Carbone et al 1986, Wuesten et al 1986), CD8+ T Zellen (Stimson 1988, Cutolo et al 1993b, Cohen et al 1983, Weusten et al 1986), murinen Makrophagen und humanen monozytischen Zelllinien (Frazier-Jessen & Kovacs 1995, Gulshan et al 1990, Szekeres-Bartho et al 1985, Danel et al 1985) und humanen peripheren mononukleären Zellen (Carbone et al 1986, Ranelletti et al 1988) identifiziert worden. Des weiteren sind Östrogenbindungsstellen in Makrophagen aus synovialem Gewebe (Cutolo et al 1993b, Cutolo et al 1996), in peripheren Blutmonozyten (Wada et al 1992, Suenaga et al 1996) und neuerdings auch in CD4+ T-Zellen und B-Zellen beschrieben worden (Suenaga et al 1998, Benten et al 1998).

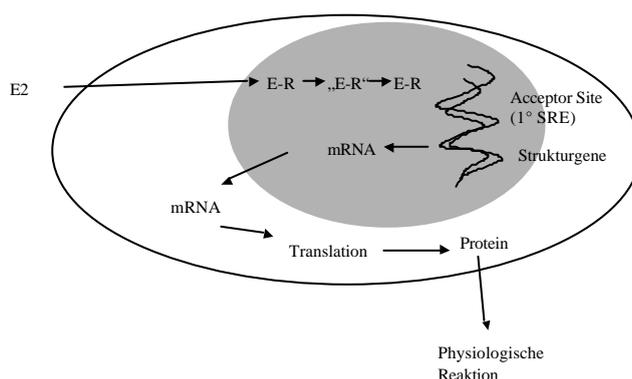


Abb.2: Allgemeines Modell für die Steroidaktion auf Zielzellen (Cutolo et al 1995)

### 1.4) Östrogenrezeptoren in Lymphozyten

Frühe Studien zeigten das Vorhandensein von Östrogenrezeptoren in T-Lymphozyten, die vom Ductus thoracicus isoliert wurden. Solche Rezeptoren exprimierten wohl nur die OKT8-positiven Zellen vom suppressor/cytotoxic Phänotyp (Cohen et al 1983). Diese Beobachtung wurde durch andere Studien bestätigt (Stimson 1988, Cutolo et al 1993b), und damit wurde

der Verdacht verstärkt, daß T-Lymphozyten (OKT8+/CD8+) spezifische Zielzellen für Östrogene sein könnten. Andere Studien schlugen vor, daß pharmakologische Östrogenkonzentrationen die Immunglobulinproduktion durch eine Inhibition der T-Zellfunktion sowohl bei Mäusen als auch beim Menschen beeinflussen könnten (Paavonen et al 1981, Ansar et al 1985).

Die Beschreibung von Östrogenrezeptoren in CD8+ (suppressor/cytotoxic) CD29+ (lang lebende „Gedächtnis“) T-Lymphozyten, die sowohl die normale als auch die rheumatoide Synovia infiltrieren, unterstützt den Verdacht einer Beteiligung von Östrogenen bei der Immunantwort (Cutolo et al 1993b). CD29 ist die gemeinsame  $\beta$ -Untereinheit der „sehr späten Antigen-Proteine“ („very late antigen (VLA) proteins“). Es gehört zur Integrin-Familie und beeinflußt im wesentlichen Zell-Matrix-Interaktionen (Hynes 1987). Die selben CD29+ T-Zellen wurden als Antigen-erfahrene („Gedächtnis“-) Lymphozyten (CD45RO+) identifiziert. Die Verschlechterung der Aktivität einer RA unter Östrogen, könnte die Folge einer Hemmung solcher „Suppressor (Gedächtnis“) T-Zellen (CD8+, CD29+, CD45R+) sein (Cutolo et al 1993b, Hazes et al 1989, Rudge et al 1983). Es zeigte sich, daß Lymphozyten von weiblichen im Vergleich zu männlichen Mäusen nach Immunstimulation sowohl in vivo als auch in vitro höhere Mengen an IFN- $\gamma$  produzieren (Huygen & Paifliet 1984, McFarland & Bigley 1989). Nachfolgende Studien wiesen nach, daß die Expression des IFN- $\gamma$ -Gens durch einen direkten Effekt von Östrogenen in physiologischen Konzentrationen erhöht werden kann. Die ausgeprägteste Reaktion auf Östrogen wurde bei T-lymphoiden Zelllinien beobachtet, die mit Östrogenrezeptorexpressionsplasmid transfiziert wurden, um eine hohe konstitutive Rezeptorexpression zu garantieren (Fox et al 1991).

Das genannte Vorhandensein von Östrogenrezeptoren in CD8+ T-Zellen ist konsistent mit der Östrogen-vermittelten Erhöhung der IFN- $\gamma$ -Genexpression, da die CD8+ T-Zellen für den größten Anteil der IFN- $\gamma$ -Produktion verantwortlich zu sein scheinen (Budd et al 1987). Es ist bekannt, daß IFN- $\gamma$  sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunität beeinflusst, indem es die Effektorfunktion von Lymphozyten, die Aktivierung von Makrophagen, die Produktion verschiedener Zytokine und die MHC-Molekülexpression in verschiedenen Zelltypen induziert.

Neuere Studien zeigten aber, daß Östrogene eher einen hemmenden Effekt auf die T-Zell-abhängige und -unabhängige (zellvermittelte) Immunantwort haben, welcher teilweise durch eine Unterregulation der Genexpression von inflammatorischen Zytokinen wie TNF $\alpha$  und IFN- $\gamma$  vermittelt wird (Salem et al 2000b). E<sub>2</sub> hemmt die PPD-(purified protein derivative) spezifische Typ-IV-Überempfindlichkeitsreaktion in weiblichen Mäusen, indem es die IL-2 und IFN- $\gamma$ -Produktion erniedrigt und die IL-4 und IL-10 Produktion PPD-stimulierter lymphatischer Zellen erhöht. Zusätzlich zu dieser Umverteilung des Th1/Th2-Gleichgewichts Richtung Th2 scheint E<sub>2</sub> die Funktion von APC-(Antigen präsentierende Zellen) zu unterdrücken (Salem et al 2000a). Ebenso bei Mäusen erhöht eine Langzeitbehandlung mit Östrogen die Anzahl der Plasmazellen und führt zu einer vermehrten Produktion sowohl von Immunglobulinen als auch von Autoantikörpern (Verthelyi & Ahmed 1998). Auch im humanen Model scheint Östrogen eine ähnliche Wirkung zu haben, wobei der Effekt in mononukleären Mischkulturen deutlich stärker ist als in reinen B-Zell-Populationen (Kanda et al 1999, Kanda & Tamaki 1999). Diese Östrogen-induzierte B-Zell-Aktivierung scheint also weniger durch einen direkten Einfluß auf B-Zellen, sondern eher indirekt über eine Stimulation von Monozyten und eine nachfolgend erhöhte IL-10-Produktion vermittelt zu sein.

Es ist tatsächlich so, daß eine erhöhte B-Zell-Aktivität unter Östrogenen zumindest teilweise die Besonderheiten der weiblichen Immunantwort erklären kann. Es handelt sich aber wahrscheinlich um das Endglied einer Kette von Reaktionen und Interaktionen aller Immunzellen, wobei die pluripotente Zelle der monozytischen Zellreihe in ihren

verschiedenen Erscheinungsformen eine wesentliche Effektorzelle der Östrogenwirkung zu sein scheint.

### 1.5) Östrogenrezeptoren in Makrophagen

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden Östrogenrezeptoren in verschiedenen Zellen der Monozyten/Makrophagen-Reihe beschrieben, wie z.B. in murinen Makrophagen und humanen monozytischen Zelllinien (Frazier-Jessen & Kovacs 1995, Gulshan et al 1990, Szekeres-Bartho et al 1985, Danel et al 1985), in Makrophagen aus synovialen Gewebe (Cutolo et al 1993b, Cutolo et al 1996) und in peripheren Blutmonozyten (Wada et al 1992, Suenaga et al 1996). Die meisten Untersuchungen wurden aber im Rahmen rheumatischer Erkrankungen wie z.B. SLE und RA durchgeführt (Abb.3).

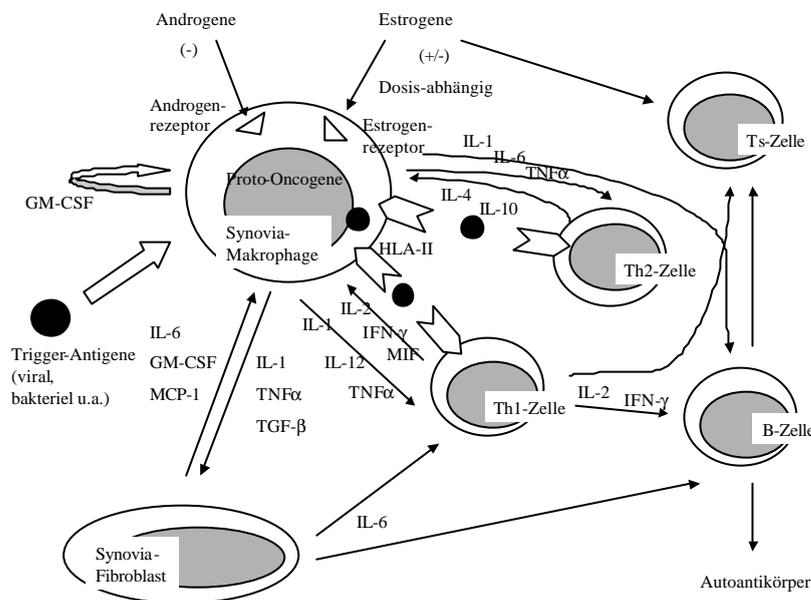


Abb.3 Schematische Darstellung der komplexen Interaktion zwischen Sexualhormonen und Makrophagen bei der Immunantwort auf Ebene des rheumatoiden Synovialgewebes (Cutolo 1999).

Das Vorhandensein von Östrogenrezeptoren in Synovia-Makrophagen von normaler und RA-Synovia (Cutolo et al 1993b) wird von früheren Studien unterstützt, die gezeigt hatten, daß Östrogene sowohl die Differenzierung als auch die Funktion von humanen Makrophagen *in vitro* beeinflussen können (Barak et al 1985, Schreiber et al 1988). Außerdem zeigten *in vivo*-Studien, daß die Langzeitbehandlung von weiblichen Mäusen mit Östrogen die Makrophagenproliferation, die Phagozytosefähigkeit bestimmter Antigene und die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle erhöht (Boorman et al 1980, Flynn 1986). Die Östrogeneffekte auf monozytische Zellen sind vielfältig: Östradiol hemmt die Leukozytenadhäsion und die transendotheliale Migration bei Kaninchen *in vivo* (Nathan et al 1999), es hemmt die Migration m-ox-LDL (minimally oxidized low-density lipoprotein)-stimulierter humaner THP-1-Zellen *in vitro* (Okada et al 1997), es erhöht die PDGF-B (platelet derived growth factor B) mRNA-Produktion von THP-1-Zellen (Shanker et al 1995), es hemmt die Lipidakkumulation in humanen von Monozyten abstammenden Makrophagen (McCrohon et al 1999) und es hemmt die MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1)-induzierte Chemotaxis humaner Monozyten (Yamada et al 1996).

Des weiteren wurde der Effekt von kultivierten Synovia-Makrophagen auf die Metabolisierung von Sexualhormonen untersucht und es zeigte sich, daß diese Zellen Testosteron in seine Metaboliten umwandeln können (Cutolo et al 1993a). Außerdem sind mit Vitamin D- oder GM-CSF-behandelte humane myeloische THP-1-Zellen in der Lage, über eine verstärkte Expression des Enzyms Aromatase Testosteron in Östrogen umzuwandeln (Jakob et al 1995).

Ziel vieler Studien war es, den *in (ex)vivo* und *in vitro* Einfluß von Östrogenen auf die Zytokinproduktion (IL-1, IL-6, IL-10, TNF $\alpha$  u.a.) und Sekretion von Zellen der monozytischen Zellreihe zu untersuchen (zusammengefaßt unter anderem in Tab.3). Am häufigsten wurde die IL-1-Produktion, einem Polypeptid, das von Monozyten und Makrophagen produziert wird und ein wichtiger Mediator einer Reihe inflammatorischer und immunologischer Reaktionen ist, untersucht (Dinarello 1984, Durum et al 1985). Es wurde beschrieben, daß Östrogene in niedrigen Konzentrationen ( $<10^{-9}$  M) die IL-1 Produktion humaner Monozyten (Polan et al 1988, Mori et al 1990) und der monozytischen THP-1-Zellen (Shanker et al 1994b) erhöhen, in höheren Konzentrationen ( $>10^{-7}$  M) zeigt sich dagegen ein hemmender Effekt (Mori et al 1990, Morishita et al 1999). Andere Studien zeigten aber auch bei höheren Östrogenkonzentrationen (bis  $10^{-5}$  M) einen stimulierenden Einfluß (Li et al 1993, Polan et al 1989). Außerdem erhöht Östrogen in physiologischen Konzentrationen die IL-1-Produktion von Peritonealmakrophagen der Ratte (Hu et al 1988) und erhöht die LPS-induzierte IL-1-Produktion der monoblastischen Zelllinie HL-60 nach Vitamin D-Vorbehandlung (Mori et al 1992). Es wird also ersichtlich, hier am Beispiel für IL-1, daß die Zytokinsekretion monozytischer Zellen tatsächlich einer sehr feinen Regulation von Sexualhormonen unterliegt, die aber teilweise bei ihrer Erforschung sehr unterschiedliche Ergebnisse zeigt, welche möglicherweise stark vom Ursprung (human, Ratte, Maus usw.), vom Differenzierungsgrad (peripher zirkulierend, adhärent, peritoneal, monozytisch, monoblastisch) und von der Behandlungsmethode (Isolierung, Kultur, Östrogeneinwirkung) der Zielzelle beeinflußt wird.

Spezies	Effekt	Referenzen
Human	↑ CFU-GM Progenitor Zellproliferation	Maoz et al 1985, Barak et al 1986
Human, Maus	↑ Phagozytose	Vernon-Roberts 1969, Baranao et al 1992
Guinea Schwein	↑ Fc-Rezeptorexpression	Friedman et al 1985, Schreiber et al 1988
Guinea Schwein	↑ Fc-Rezeptor-Vermittelte AG-Clearance	Friedman et al 1985, Schreiber et al 1988
Human, Ratte	↑↓ TNF $\alpha$ mRNA Expression	Shanker et al 1994a, Chao et al 1991
Human, Ratte, Maus	↑↓ TNF $\alpha$ Produktion	Shanker et al 1994a, Chao et al 1991, Ralston et al 1990, Mori et al 1990, Mori et al 1992, D'Agostino et al 1999
Human	↑↓ IL-1 mRNA Expression	Flynn 1984, Hu et al 1988, Polan et al 1988, Stock et al 1989, Polan et al 1989, Pacifici et al 1989, Shanker et al 1994b
Human	↑↓ IL-1 Produktion	Flynn 1984, Hu et al 1988, Polan et al 1988, Stock et al 1989, Polan et al 1989, Pacifici et al 1989, Shanker et al 1994b
Ratte	↑↓ Superoxid-Produktion	Chao et al 1994
Ratte	↑↓ Hydrogenperoxid-Produktion	Chao et al 1994
Ratte	↑↓ NO-, Nitritproduktion	Chao et al 1994
Human	↓ oxidative Modifikation von LDL	Maziere et al 1991
Ratte	↓ Superoxid-Produktion	Mohan & Jacobson 1993

Tab.3 Östrogeneffekte auf Makrophagen (modifiziert von Miller L & Hunt JS 1996)

## 1.6) Östrogene und Gerinnung

Es ist allgemein bekannt, daß Frauen generell im Vergleich zu Männern eine erhöhte Thromboseneigung haben, die besonders unter dem Einfluß hoher Spiegel an weiblichen Sexualhormonen, wie z.B. während der Schwangerschaft, noch deutlicher wird. Retrospektive und prospektive Studien haben gezeigt, daß Frauen, die orale Kontrazeptiva nehmen, ein erhöhtes Risiko haben, an venösen und arteriellen Thrombosen zu erkranken (Poller 1978, Vessey 1982), besonders auch dann, wenn sie gleichzeitig Antikardiolipin-Antikörper haben (Julkunen HA 1991, Bruneau et al 1986). Eine Studie untersuchte kürzlich den Einfluß der Einnahme von oralen Kontrazeptiva auf die Tissue Factor-Expression von Monozyten und zeigte, daß die Monozyten dieser Frauen signifikant höhere Mengen an TF generieren (Hölschermann et al 1999).

TF ist ein membrangebundenes einzelkettiges Glykoprotein (Edgington et al 1991), welches nach Kontakt mit Blut die Gerinnung aktiviert und letztendlich zur Bildung eines Thrombus führt. Dieses Protein bildet einen Komplex mit Faktor VII/VIIa, katalysiert dadurch die proteolytische Aktivierung der Gerinnungsfaktoren IX und X und führt zur Aktivierung des extrinsischen Gerinnungsweges (Nemerson 1988). Obwohl TF normalerweise nicht von Leukozyten exprimiert wird, kann seine Expression in Monozyten induziert werden, welche die einzigen zirkulierenden Blutzellen sind, die diese Fähigkeit besitzen. Effektive Induktoren der TF-Expression von Monozyten in Suspension (in Vollblut, im Gegensatz zur Zellkultur) sind LPS, Immunkomplexe und der aktivierte Komplementfaktor (C5a) (Osterud 1998).

Es wurden klinische Studien durchgeführt, welche Hämostaseparameter während ovarieller Stimulation für *in vitro*-Fertilisation (Aune et al 1993, Biron et al 1997) und während hormoneller Substitutionstherapie (Aune et al 1995) untersuchten, welche aber teilweise widersprüchliche Ergebnisse zeigten. Der *in vitro*-Effekt von Östrogen auf die monozytische TF-Expression wurde dahingegen kaum erforscht.

## 2) 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (Calcitriol)

### 2.1) Vitamin D – allgemeine Grundlagen

Die beiden wichtigsten Vertreter der Gruppe der Calciferole (D-Vitamine) sind Vitamin D<sub>2</sub> (Ergocalciferol) und Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol). Vitamin D<sub>2</sub> leitet sich vom Provitamin Ergosterol ab, das nur in Pflanzen synthetisiert werden kann, Vitamin D<sub>3</sub> vom Provitamin 7-Dehydrocholesterin, das bei Tieren auch aus Cholesterin synthetisiert werden kann. Aus dem oben genannten Grund sind Calciferole im eigentlichen Sinn keine Vitamine und könnten zumindest nach ihrem Wirkungsmechanismus auch den Hormonen zugerechnet werden.

Die Biosynthese von Vit.D<sub>2</sub> erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie die von Vit.D<sub>3</sub> (s.u.). Vit.D<sub>2</sub> (Ergocalciferol) wird unter Einwirkung von UV-Licht in der Haut aus Ergosterin, welches aus pflanzlicher Nahrung stammt, gebildet. Auch beim Vit.D<sub>2</sub> ist die biologisch aktive Form hydroxyliert (1,25-Dihydroxyergocalciferol). Limitierend für die Biosynthese der biologisch wirksamen Vitamine aus den Provitaminen ist nicht die Verfügbarkeit des Provitamins, sondern die photochemische Hautreaktion. Eine endogene Überproduktion von Vit.D wird durch Rückkopplungsmechanismen verhindert, die die Synthese des Provitamins aus Cholesterin hemmen.

Biosynthese des Vitamin D<sub>3</sub> (Abb.4):

Cholesterin wird in der Leber in 7-Dehydrocholesterin mit Hilfe des Enzyms Cholesterindehydrogenase umgewandelt. Das in der Haut aufgenommene 7-Dehydrocholesterin, welches ein Provitamin von D<sub>3</sub> darstellt, wird in einer UV-Licht-abhängigen Reaktion in Cholecalciferol durch Spaltung des Ringes B umgewandelt. Cholecalciferol ist zwar das fertige Vitamin, jedoch nur schwach aktiv. Es wird durch Hydroxylierungen in die biologisch aktive Form überführt. Cholecalciferol wird nach

Transport in die Leber zu 25-Hydroxycholecalciferol (25-D<sub>3</sub>) hydroxyliert. 25-Hydroxycholecalciferol wird in der Niere erneut hydroxyliert, wobei 1,25-Dihydroxycholecalciferol entsteht (Kreutzig 1994).

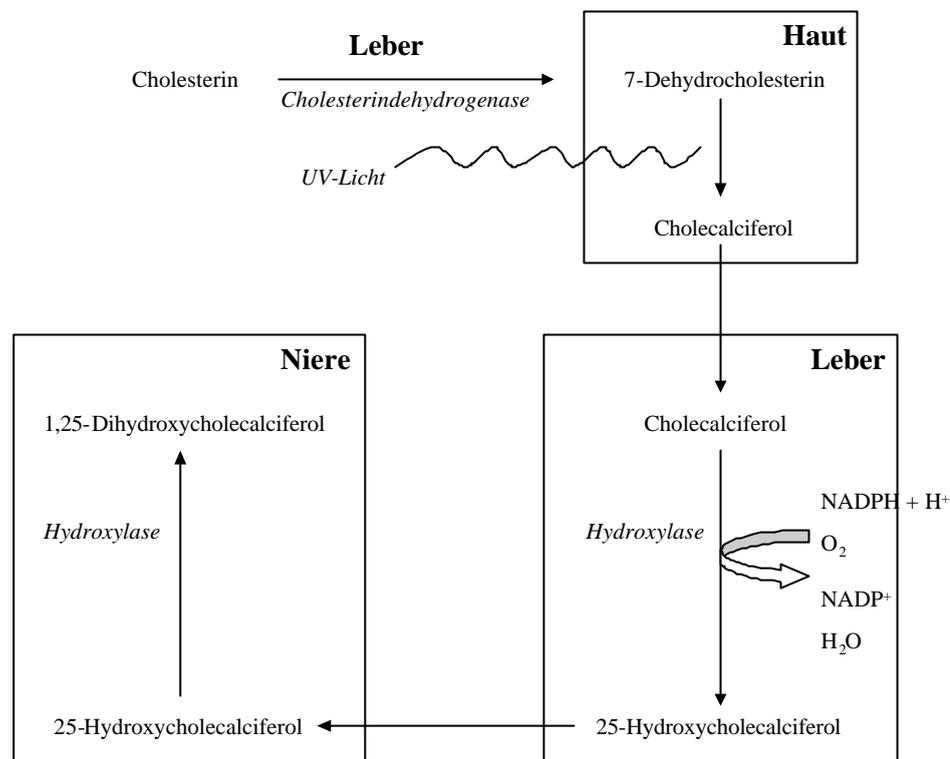


Abb.4 Biosynthese des Vitamin D<sub>3</sub> aus Cholesterin (Kreutzig 1994)

Stoffwechselwirkungen des Calciferols:

Die Calciferole sind zusammen mit Parathormon und Thyreocalcitonin für die Calciumhomöostase von besonderer Bedeutung. Ihre Aufgabe besteht darin, einem Abfall des Plasmacalciumspiegels entgegenzuwirken. Dieses Ziel kann auf verschiedenen Wegen erreicht werden: durch vermehrte intestinale Calciumresorption, durch gesteigerte renale Calciumreabsorption und durch gesteigerte Calciummobilisation, wobei das Skelettsystem unter normalen Bedingungen einen nahezu unerschöpflichen Calciumspeicher darstellt.

Für die intestinale Calciumresorption ist ein aktives Transportsystem notwendig, das den Calciumtransport vom Lumen auf die Serosaseite gegen ein Konzentrationsgefälle gewährleistet. Dieser Calciumtransport benötigt ein sehr spezifisches, vermutlich aus mehreren Proteinen bestehendes Transportsystem, welches vor allem ein calciumbindendes Protein enthält. Die Biosynthese dieses Transportsystems findet nur in Anwesenheit von 1,25-Dihydroxycholecalciferol statt. Intestinale Mukosazellen enthalten ein zytosolisches Rezeptorprotein, welches spezifisch 1,25-Dihydroxycholecalciferol bindet. Man nimmt an, daß die Wirkungsweise von Vitamin D analog zum Wirkungsmechanismus der Steroidhormone ist (s.o.) und letztendlich die Transkriptionsrate derjenigen Gene verändert, welche für das Calciumtransportsystem kodieren. Dies erklärt, daß die Wirkung von Calciferolen erst nach einer Latenzzeit von einigen Stunden zu beobachten ist.

Unter Einwirkung von 1,25-Dihydroxycholecalciferol steigt die Calcium- und Phosphatreabsorption in den Nieren. Dieser Effekt läßt sich allerdings nur dann nachweisen, wenn Parathormon vorhanden ist.

Im Gegensatz zur Wirkung der Calciferole auf die intestinale Mukosa ist über den molekularen Mechanismus der Calciferolwirkung am Knochen relativ wenig bekannt. Man

weiß schon lange, daß es – besonders nach Vitamin D-Überdosierung – zu einer massiven Entmineralisierung des Skelettsystems kommen kann, jedoch konnte erst in jüngster Zeit nachgewiesen werden, daß auch physiologische Calciferolmengen zu einer Calciummobilisierung führen. Man nimmt an, daß Calciferole in den Osteoklasten, ähnlich wie in der intestinalen Mukosa, die Biosynthese eines Calciumtransportsystems induzieren. Möglicherweise lösen sie auch die Differenzierung von Makrophagen zu Osteoklasten aus. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß Parathormon am Knochen nur in Anwesenheit von Calciferolen wirkt (Löffler & Petrides 1988).

## 2.2) Interaktion von Vitamin D mit immunkompetenten Zellen

Die Entdeckung von  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin  $D_3$  Rezeptoren vor über 15 Jahren auf Monozyten/Makrophagen und aktivierten Lymphozyten (Provvedini et al 1983, Bhalla et al 1983), führte zur Erkenntnis weiterer Eigenschaften dieses Hormones. Rezeptoren für  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin  $D_3$  sind in verschiedenen Geweben vorhanden, wie z.B. in normalen und malignen epithelialen Zellen, Lymphozyten, Thymozyten und in den meisten kernhaltigen Zellen des Körpers (Provvedini et al 1983). Abgesehen vom fast ubiquitären Vorkommen dieser Rezeptoren sind manche Zelltypen sogar in der Lage,  $25(OH)_2D_3$  zu seinen nachfolgenden Metaboliten mit Hilfe einer spezifischen  $1\alpha$ -Hydroxylase zu metabolisieren (Abb.5), welche einer anderen Regulation als die renale  $25-OH-1\alpha$ -Hydroxylase unterliegt. Diese Zellen (Keratinozyten, Gliazellen vom Knochen, von der Plazenta und vom Gehirn, Monozyten/Makrophagen und Pneumozyten) können alle  $1,25(OH)_2D_3$  synthetisieren, aber wahrscheinlich nur im Sinne einer regionalen Verteilung. Aufgrund dieser parakrinen Eigenschaften kann  $1,25(OH)_2D_3$  auch als zytokinähnliches Molekül bezeichnet werden (Casteels et al 1995).

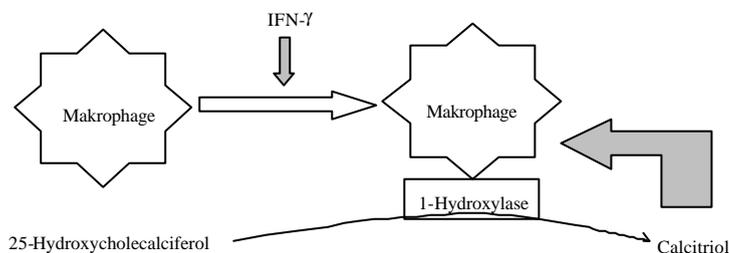


Abb.5 Die Bedeutung von Calcitriol für die Aktivierung humaner Makrophagen. Die Inkubation humaner Makrophagen mit IFN- $\gamma$  führt zu einer erhöhten Expression des Enzyms 1-Hydroxylase, welches inaktives zirkulierendes 25-Hydroxycholecalciferol in Calcitriol umbauen kann. Da dadurch Makrophagen weiter aktiviert werden, ist dieser Vorgang ein Beispiel für einen autokrinen Feedback-Mechanismus (Roit et al 1996).

$1,25(OH)_2D_3$  steigert die Fähigkeit von Monozyten/Makrophagen zur Adhärenz, Chemotaxis und Phagozytose (Gavison & Bar-Shavit 1989). Außerdem erhöht es ihre Zytotoxizität, die  $H_2O_2$ - und die Sauerstoffradikalproduktion, ein Effekt, der zur effektiveren Abtötung von intrazellulären(Myko)-Bakterien führt (Provvedini et al 1986, Girasole et al 1990, Lemire 1992, Cohen et al 1986). Calcitriol erhöht die Hitzeschockproteinproduktion und schützt die Monozyten vor Hitzeschäden (Polla et al 1986).

Die Ergebnisse bezüglich des Effektes vom Calcitriol auf die akzessorische Zellfunktion von Makrophagen sind weniger eindeutig (Rigby & Waugh 1992, Shinbori et al 1992). Das grundlegende Problem bei der Interpretation dieser Daten ist, daß bei den verschiedenen Studien unterschiedliche Zellen als monozytische Zielzellen benutzt wurden. Wenn normale Monozyten mit Calcitriol inkubiert werden, kommt es zu einer Abnahme der akzessorischen

Zellfunktion, einer Unterregulation der AG-präsentierenden Kapazität, einer Erniedrigung der HLA-Klasse-II-AG-Expression und einer reduzierten Zytokinproduktion (Tokuda & Mizuki 1992, Xu et al 1993). Dagegen reagieren leukämische monozytische Zelllinien unter Calcitriol mit einer erhöhten AG-präsentierenden Kapazität und HLA-Klasse-II-Expression (Rigby et al 1992).

Periphere T-Lymphozyten exprimieren Vitamin D-Rezeptoren nur nach Stimulation, im Gegensatz zu den medullären Thymozyten, die auch im konstitutiven Zustand solche Rezeptoren exprimieren (Hewison 1992). Obwohl gezeigt wurde, daß T-Lymphozyten direkte Zielzellen für  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sein können, werden in gemischten Immunzellpopulationen die Effekte von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf T-Lymphozyten hauptsächlich über dessen Effekte auf Monozyten/Makrophagen als AG-präsentierende Zellen vermittelt (Van Ham et al 1989, Provvedini & Manolagas 1989, Bhalla et al 1984, Manolagas et al 1986, Haq 1989, Iho et al 1985). Lemire et al (1994) zeigten, daß 1,25-Dihydroxyvitamin  $\text{D}_3$  die Sekretion von IL-12, einem Schlüsselzytokin bezüglich der Aktivierung von Lymphozyten, hemmt. IL-12 induziert die Differenzierung von Vorläufer-T-Zellen zu T-Helfer-Zellen (Th1) und aktiviert auch direkt diese Th1-Zellen. Durch diese Hemmung der IL-12-Produktion wird das Th1/Th2-Gleichgewicht Richtung Th2 verschoben (Lemire et al 1995).

Bezüglich der B-Lymphozyten hemmt  $1,25$ -Dihydroxyvitamin  $\text{D}_3$  sowohl ihre Proliferation als auch die Immunglobulinproduktion. Diese Effekte werden auch hier teilweise durch eine direkte Wirkung auf die B-Lymphozyten, zum größten Teil aber durch die Unterregulation der akzessorischen Zellfunktion der Monozyten/Makrophagen und die Inhibition der Th-Funktion vermittelt (Müller et al 1991).

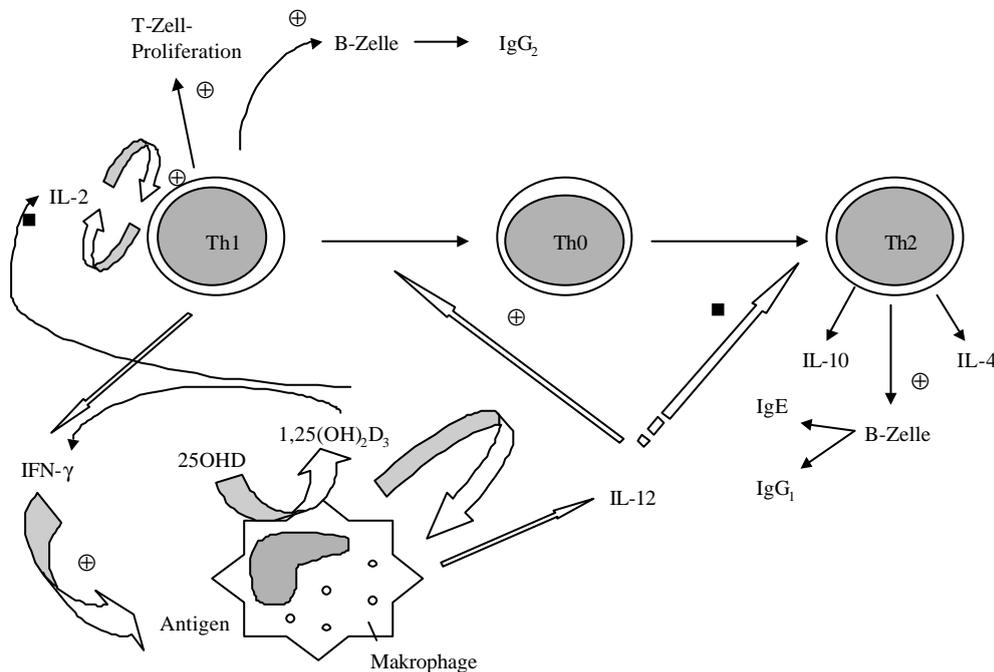


Abb.6 Wirkung von  $1,25$ -Dihydroxyvitamin  $\text{D}_3$  auf das Immunsystem: Die Makrophagen aktivieren T-Lymphozyten direkt (Zell-Zell-Kontakt) und indirekt (Zytokine, z.B. IL-12). Bei der Aktivierung spielt IL-12 eine zentrale Rolle.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  wird gleichzeitig von den aktivierten Makrophagen produziert und kann als ein eingebauter feedback loop betrachtet werden, weil es die IL-12-Produktion herunterreguliert und zur T- und B-Zell-Aktivierung führt (Casteels et al 1995).

### 2.3) Calcitriol und Differenzierung

Der Differenzierungseffekt von Calcitriol auf myeloische Zellen wurde erstmals 1981 bei der myeloischen leukämischen Zelllinie M1, welche von der Maus stammt, beschrieben (Abe et al 1981), wobei Calcitriol die Lysozymproduktion und die Phagozytose dieser Zellen erhöhte. Daraufhin fanden Studien auch im humanen System statt und es wurde gezeigt, daß Zellen der myeloischen leukämischen Zelllinie HL-60 nach Calcitriol-Gabe sich ebenfalls differenzieren lassen und in ihrem Wachstum gehemmt werden (Miyaura et al 1981, Tanaka et al 1982, Mangelsdorf et al 1984). Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei primären leukämischen Proben von Patienten mit myeloischer Leukämie gezeigt (Minker et al 1986). Provvedini et al (1986) untersuchten auch den Einfluß von Calcitriol auf normale isolierte Blutmonozyten. Dabei wurde herausgestellt, daß bei diesen Zellen im Verlauf ihrer *in vitro* Kultur diejenigen morphologischen Veränderungen, die zu einem ausdifferenzierteren makrophagenähnlichen Phänotyp führen, zu einem früheren Zeitpunkt als bei den Kontrollzellen stattfinden. Bei weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, daß Calcitriol die Fc $\alpha$ R/CD89-Expression von peripheren Monozyten, THP-1-, U-937- und MM6-Zellen erhöht, die konstitutive und IL-4-induzierte Fc $\epsilon$ RII/CD23-Expression der U-937-Zellen und der Monozyten erniedrigt und die Fc $\gamma$ RI/CD64-, Fc $\gamma$ RII/CD32- und Fc $\gamma$ RIII/CD16-Expression der Monozyten senkt (Boltz-Nikulescu et al 1995). Calcitriol führt zur Unterregulation der HLA-DR-, HLA-DP- und HLA-DQ-Expression von Monozyten und erhöht die CD14-Expression der U-937- und MM6-Zellen und weniger ausgeprägt auch der Monozyten (Spittler et al 1997, Frankenberger et al 1997).

Bezüglich der CD11-Expression ist der Calcitrioleffekt zelltypabhängig: bei den unreifen U-937 kommt es zu einer Zunahme, bei den reifen Monozyten dagegen zu einer Abnahme der CD11a-, CD11b- und CD11c-Expression (Spittler et al 1997). CD11b ist ein Monozyten- und Granulozyten-spezifisches AG, das der  $\alpha$ -Untereinheit des Komplementfaktor 3-Rezeptors entspricht, CD14 ein Monozyten/Makrophagen-Rezeptor, welcher spezifisch für die Bindung an LPS ist. Da die Expression dieser zwei Antigene stark vom Differenzierungszustand der Zellen abhängt, werden sie oft als Differenzierungsmarker benutzt. Bei der Entwicklung eines Endotoxinindikatorsystems mit Hilfe von humanen monozytischen Zelllinien wurden die Zellen (U-937, THP-1, MM6) mit Calcitriol vorbehandelt, um die CD14-Expression zu erhöhen und dadurch ihre LPS-Empfindlichkeit zu steigern (Eperon & Jungi 1996, Eperon et al 1997).

Der Einfluß von Calcitriol auf das Gerinnungssystem wurde noch nicht grundlegend untersucht. Es gibt Hinweise dafür, daß Calcitriol, ähnlich den Retinoinsäuren, eine antikoagulatorische Wirkung ausübt, indem es eine Hochregulation von Thrombomodulin und eine Unterregulation von TF in unreifen monozytischen Zellen bewirkt (Koyama & Hirosawa 1998, Koyama et al 1998). Eine solche differenzierungsinduzierende Wirkung, die mit einer Erniedrigung der prokoagulatorischen Aktivität einhergeht, könnte von großem Nutzen bei Leukämiepatienten sein, die oft an thromboembolischen Komplikationen ihrer Grunderkrankung leiden. Es gibt Studien, in denen Vitamin D<sub>3</sub>-Verbindungen bei Patienten mit positiven Ergebnissen therapeutisch eingesetzt wurden (Koeffler et al 1985, Kelsey et al 1992, Mellibovsky et al 1993), das grundlegende Problem besteht aber darin, daß eine ausreichende Differenzierung der Zellen *in vivo* erst bei solchen Vitamin D-Konzentrationen auftritt, die auch systemisch eine Hypercalcämie bewirken.

Calcitriol ist also ein sehr potentes Vitamin/Hormon mit starken immunmodulierenden Eigenschaften, seine genaue Interaktion mit immunologischen Zellen und besonders die Interaktion mit anderen Steroidhormonen hat aber noch viele ungeklärte Aspekte.

## II. Zielsetzung der Arbeit

Ziel unserer Studie ist es, den Einfluß von  $17\beta$ -Östradiol und  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin  $D_3$  auf Monozyten/Makrophagen im humanen *in vitro* System zu untersuchen. Unter der Annahme, daß diese Hormone das Proliferationsverhalten, den basalen Phänotyp/Differenzierungsgrad und die Stimulierbarkeit monozytischer Zellen regulieren können, sollten folgende Parameter untersucht werden:

- **Proliferationskinetik**

Bestimmung des Wachstumsfaktors unreifer monozytischer Zellen unter dem Einfluß steigender Östrogenkonzentrationen im Kulturmedium.

- **DNS-Verteilungsmuster**

Durchflußzytometrische DNS-Phasen-Analyse der MM6-Zellen unter Östrogeneinfluß.

- **CD14-Expression**

Quantifizierung des klassischen Differenzierungsmarkers CD14 mittels Durchflußzytometrie. Es sollte dabei der konstitutive Differenzierungsgrad der Zielzellen definiert und eine mögliche Regulation durch beide Hormone untersucht werden.

- **TF-Expression**

Durchflußzytometrische Bestimmung der Expression von TF vor und nach Hormonbehandlung der Zellen. Es sollten dabei Hinweise sowohl bezüglich des Differenzierungs- als auch des basalen Stimulierungszustandes der Zellen erfasst werden. Anschließend *in vitro* Stimulation der Zellen mit LPS und Untersuchung des Einflusses dieser Hormone auf die induzierte TF-Expression.

- **TNF $\alpha$ -Produktion**

Mittels ELISA sollte der Einfluß von  $17\beta$ -Östradiol und Calcitriol auf die Fähigkeit monozytischer Zellen, nach Stimulation mit LPS das Zytokin TNF $\alpha$  zu produzieren, untersucht werden.

Um die Effekte dieser Hormone parallel auf ursprünglich unterschiedlich differenzierte monozytische Zellen zu untersuchen, sollten zwei monozytische Zelllinien humanen Ursprungs, die THP-1- und MM6-Zellen, und reife isolierte periphere Blutmonozyten als Zielzellen benutzt werden.

Durch die Bestimmung von Proliferationsverhalten, Oberflächenmolekülexpression und Zytokinsekretion unterschiedlich differenzierter monozytischer Zellen sollten wichtige Informationen über den Einfluß von Östrogenen und Vitamin  $D_3$  auf ein weites Spektrum monozytischer Eigenschaften und Funktionen erfasst und in der Diskussion der Arbeit analysiert werden.

### **III. Materialien und Methoden**

#### **3.1 Verwendete Substanzen und Materialien**

American Can Company, Greenwich:  
Parafilm

Costar-Tecnomara, Fernwald:  
24 well cell culture cluster, hydrophil, Cat.Nr.: 3524  
Kulturflaschen, hydrophil (75 cm<sup>2</sup>, Faßvermögen 250 ml), Cat.Nr.: 3376

Saarstedt:  
Auflaufpipetten

Eppendorf:  
1,4 ml- Zentrifugiergefäße mit/ohne Deckel

Greiner:  
50 ml- Zentrifugiergefäße (Blue cap)

Gibco BRL:  
RPMI 1640 ohne Phenolrot Cat.Nr.: 31870-074  
RPMI 1640 mit Phenolrot Cat.Nr.: 32404-014  
L-Glutamin Cat.Nr.: 043-05030H  
MEM oder NEAA (Nicht essentielle Aminosäuren, 100 x) Cat.Nr.: 11140-035  
Fötale Kälberserum (FKS), Cat.Nr. 10-106-151  
Dulbecco's PBS, Cat.Nr.: 14190

Böhringer Mannheim GmbH:  
Penstrep (Penicillin 200 U/ml und Streptomycin 200 µg/ml), Cat.Nr. 210404  
RNAse, Cat.Nr.: 1119915

Sigma Chemie:  
OPI Media Supplement, Cat.Nr.: 0-5003  
1 $\alpha$ ,25-Dihydroxycholecalciferol, Cat.Nr.: D1530  
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) Cat.Nr.: P-7626  
Lipopolyssaccharid (LPS) from *Salmonella* Minnesota, Cat.Nr.: L-6261  
Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF), Cat.Nr.: G5035  
17 $\beta$ -Östradiol, Cat.Nr.: E 8875  
Propidiumiodid, Cat.Nr.: P 4170

Becton Dickinson:  
CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit, Cat.Nr.: 340242  
DNA Quality Control Particles. Cat.Nr.: 95-0023

Pharmacia Biotech:  
Ficoll-Paque® Plus and Ficoll-Paque Research Grade, Cat.Nr.: 71-7167-00

### Spektrum

0,2 µm MediaKap filter

### **3.2 Verwendete Antikörper**

#### Immunotech (Coulter):

Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L),  
Cat.Nr.: 0819

Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L),  
Cat.Nr.: 0833

Isotypkontrolle IgG1-FITC; Monoklonaler Mausantikörper; Cat.Nr.: IM0639

Isotypkontrolle IgG1-PE; Monoklonaler Mausantikörper; Cat.Nr.: IM0670

Isotypkontrolle IgG1-PC5; Monoklonaler Mausantikörper; Cat.Nr.: IM2663

Isotypkontrolle IgG1-ECD; Monoklonaler Mausantikörper; Cat.Nr.: IM2714

Antikörper CD14-PE; Monoklonaler Mausantikörper; Cat.Nr.: IM0650

Antikörper CD16-PCy5; Monoklonaler Mausantikörper; Cat.Nr.: IM2642

Antikörper CD45-ECD; Monoklonaler Mausantikörper; Cat.Nr.: IM2710

Antikörper HLA-DR-PCy5; Monoklonaler Mausantikörper; Cat.Nr.: IM2659

#### American Diagnostica Inc., Greenwich; LOXO, Dossenheim

Fluorescein(FITC)-konjugierter monoklonaler AK gegen humanen TF;

Monoklonaler Maus-Antikörper, molares Verhältnis von Fluorescein zu Protein: 5,6:1;

Cat.Nr.: 4508CJ

#### MACS, Magnetic Cell Sorting

FcR Blocking Reagent, Cat.Nr.: 599-01

### **3.3 Geräte**

#### Ultrazentrifuge:

- Kühlzentrifuge mit Rotor JA 10 (bis 20000 g)

Beckmann

- Ultrazentrifuge mit Kühlung: DuPont Sorvall RC-5 Superspeed Refrigerated Centrifuge  
DuPont

#### Laminar-Air-Flow:

CEAG Verfahrenstechnik, Selm-Bork

#### Zählautomat:

Coulter Counter: Modell „Sampling Stand II“ (Serial-No. 110289)

Coulter Multisizer (Serial-No. 020289)

Coulter-Immunotech Diagnostics, Hamburg

#### Magnetrührer mit Heizplatte

Heidolph, Germany

#### Wasserbad mit Wärmeverrichtung

Köttermann

Waage:

Präzisionswaage Typ K7T (Nr. 76970)

E. Mettler, Zürich

Vortex:

Vortex, Typ Vortex-Genie (Modell K-550-GE)

Scientific Industries Inc., Springfield, Massachusetts

Optik:

- Lichtmikroskop, Will, Wezlar
- Diaphot TMD–Inverses Mikroskop mit Phasenkontrast und Fluoreszenzeinrichtung, Nikon

PH- Meter:

pH Digi 510

Wiss.-Techn.-Werkstätten, Weilheim

Durchflußzytometer:

Coulter Epics XL

Technische Daten:

488 nm Argonlaser mit separatem Power Supply mit Multi-Carousel-Loader

XL-Terminal: IBM-kompatibler PC mit 166 Mhz Pentium Prozessor

Software: System II-Software

Coulter-Immunotech Diagnostics, Hamburg

Lysegerät zur automatischen Probenvorbereitung:

Coulter TQ-Prep TM

Coulter-Immunotech Diagnostics, Hamburg

Für die Messungen am Durchflußzytometer:

- Falcon- Tubes (Becton-Dickinson); Cat.Nr.: 2052
- Sarstedt 5 ml Röhrchen (Sarstedt); Cat.Nr.: 55.476
- Flow-Check (Coulter-Immunotech Diagnostics, Hamburg), 3 x 10 ml; Cat.Nr.: 6605359
- Isoton II für die Durchflußzytometrie (Coulter- Immunotech Diagnostics, Hamburg), 20 L; Cat.Nr.: 8448011
- Coulter-Clenz (Coulter-Immunotech Diagnostics, Hamburg), 1 L; Cat.Nr.:8448188

Für die TNF $\alpha$ - Bestimmung:

- Beschichtungsantikörper: Anti-hu-TNF $\alpha$ ; ENDOGEN M-303
- 2. Antikörper: Anti-hu- TNF $\alpha$ -Bi; ENDOGEN M-302-B
- Konjugat: SA-POD; ZYMED 43-4323
- Substrat: TMB; DAKO; S 1600
- MTP: NUNC Maxisorp; NUNC
- Standard: int. Hu-TNF $\alpha$ ; WHO

### 3.4 Durchflußzytometrie

#### Prinzip des Durchflußzytometers:

Proben, die durchflußzytometrisch analysiert werden sollen, müssen als Einzelzellsuspension vorliegen. Die Zellen werden aus dem Probenröhrchen in das Leitungssystem des Gerätes angesaugt und zu dem Kernstück des Durchflußzytometers, der Meßzelle, transportiert. Hier werden die Zellen von einem Laserstrahl erfaßt. Ein Hüllstrom isotoner Flüssigkeit sorgt dafür, daß die Zellen den Analysepunkt hintereinander passieren, sozusagen im Gänsemarsch (=hydrodynamische Fokussierung).

#### Streulicht:

Trifft ein Lichtstrahl des Lasers auf eine Zelle, so ändert er, abhängig von verschiedenen Parametern wie Querschnittsfläche, Refraktionsindex, Struktur der Membran und intrazellulären Bestandteilen (Kern, Granula, Vakuolen), seine Richtung.

Die Lichtstreuung ist am größten im Kleinwinkelbereich ( $0-10^\circ$ ) des einfallenden Lichtstrahls, d.h. der einfallende Lichtstrahl wird zum größten Teil in Vorwärtsrichtung abgelenkt. Dieses sogenannte Vorwärtstreulicht („Forward Angle Light Scatter“, FSC) ist sensitiv für die Querschnittsfläche der Zellen und gibt schließlich Information über die Zellgröße.

Ein geringer Teil des Lichtes streut seitwärts ( $90^\circ$ ). Die Intensität dieses sogenannten Seitwärtstreulichtes („Side Angle Light Scatter“, SSC) ist sensitiv für den Refraktionsindex der Zellen und gibt Information über Granularität, Membranfaltung und äußere Form.

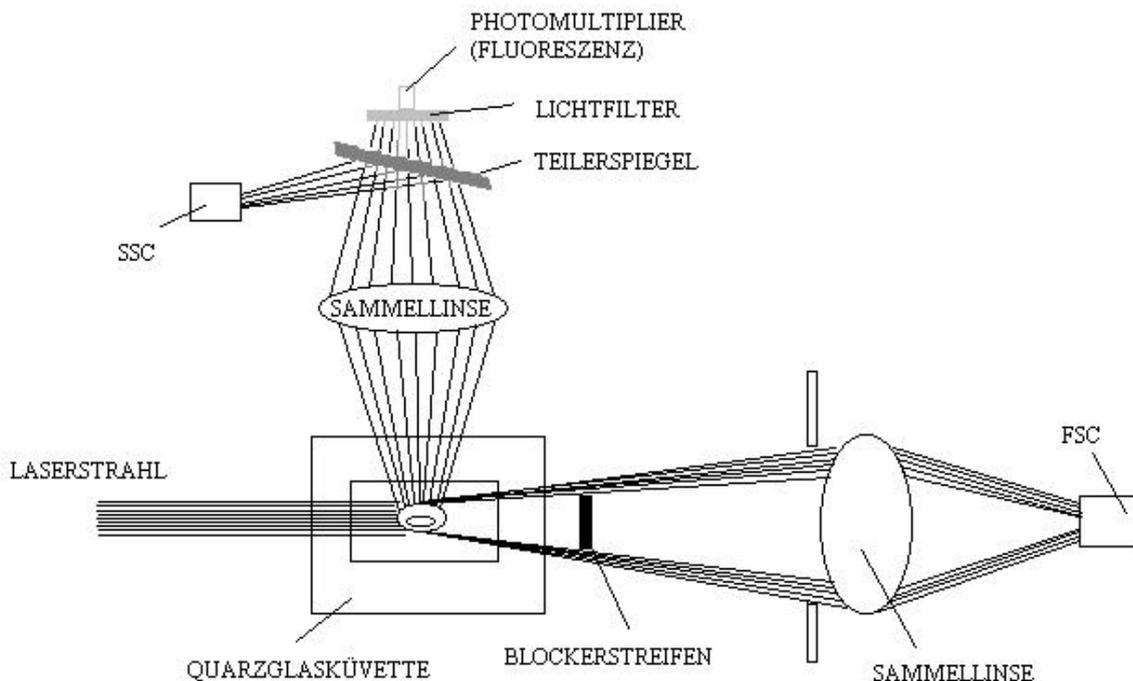


Abb.7 Strukturaufbau des Durchflußzytometers

#### Lichtquelle:

Als Lichtquelle wird ein Laser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) benutzt. Diese Lichtquelle emittiert Licht, das

- monochromatisch
- von hoher Energiedichte
- gerichtet (einfache Justierung) und
- kohärent (Lichtwellen sind gleichphasig und von einheitlicher Amplitude) ist.

Da dieser Laser nur einzelne Wellenlängen des Lichtspektrums emittiert, müssen die Fluorochrome, die benutzt werden, in diesem Emissionsspektrum des Lasers erregt werden können (Emissionslinien von Argon in nm: 351, 457, 488, 514, 528).

Bei Lasern mit geringer Leistungsaufnahme ist aber nur ein Teil der genannten Emissionswellenlängen nutzbar. Die kleine luftgekühlte Argonlaserversion, die bei den meisten analytischen Durchflußzytometern eingebaut ist, hat, wie auch in unserem Fall, nur die 488-nm- Bande mit einer Leistung von 15 mW zur Verfügung.

### *Fluoreszenz:*

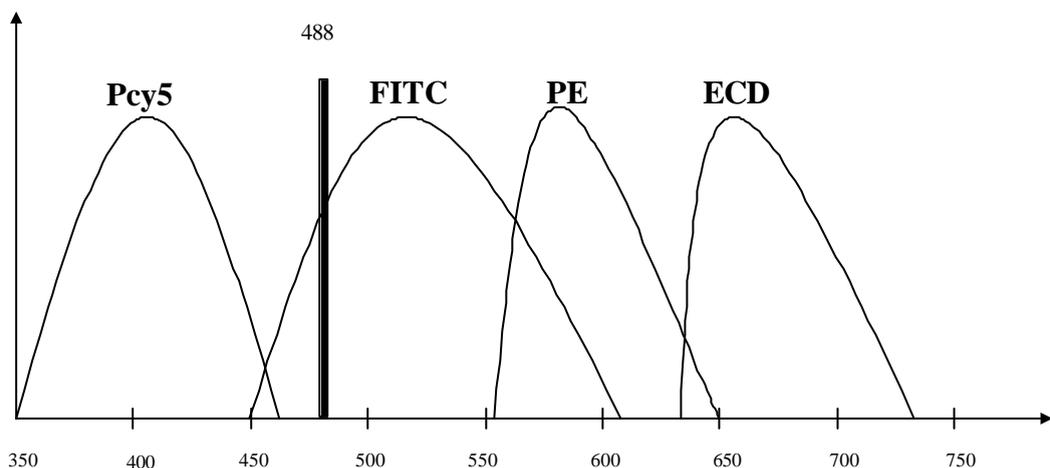
Sie ist definiert als die rasch abklingende Lichtemission von Molekülen nach Absorption energiereicher Strahlung (nach Energieabsorption werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau versetzt, beim Rücksprung zum Grundniveau entsteht die Photon-Emission).

Jedes Fluorochrom hat einen bestimmten Frequenzbereich, in dem es angeregt wird (=Anregungs- bzw. Exzitationsspektrum). Dieser stimmt weitgehend mit dem Absorptionsspektrum überein. Bei der Rückkehr zum Grundniveau geht ein Teil der Energie als Wärme verloren. Deswegen ist das gebildete Licht (=Emissionsspektrum) energieärmer und damit langwelliger als das Anregungslicht.

Für die durchflußzytometrische Analyse sind Fluorochrome geeignet, die einen Exzitationsspektrum um 488 nm besitzen. Die Absorptionsmaxima der Farbstoffe sollten, müssen aber nicht exakt bei diesem Wert liegen; wenn ein Fluorochrom außerhalb des Absorptionsmaximums aber noch innerhalb des Absorptionsspektrums erregt wird, äußert sich das in einer Intensitätsminderung, nicht aber in einer Farbveränderung.

Bei unseren Messungen wurden für die Markierung von Oberflächenantigenen oder intrazellulären Bestandteilen folgende Farbstoffe eingesetzt:

- FITC (Flourescein- isothiocyanat),
- PE (R- Phycoerythrin),
- ECD (ein Molekül, das durch die kovalente Bindung von R- Phycoerythrin und Texas Rot entsteht) und
- PCy5 (ein Molekül, das durch die kovalente Bindung von R- Phycoerythrin und Cyanin gebildet wird).



## Abb.8 Schematische Darstellung der Emissionsspektren der Fluorochrome

Diese Fluorochrome kann man alle mit 488 nm erregen und anhand ihrer unterschiedlichen Emissionsspektren unterscheiden (Mehrfarbenfluoreszenzanalyse).

Diese verschiedenen Lichtspektren werden in einzelnen Meßkanälen des Durchflußzytometers detektiert. So erfaßt der

Kanal 1 Emissionen um 520 nm (grüne Fluoreszenz) und somit Antikörper, die mit FITC markiert wurden,

Kanal 2 Emissionswellenlängen von ca. 580 nm (orange-rote Fluoreszenz) und somit Antikörper, die mit PE markiert wurden,

Kanal 3 Emissionen um 650 nm (rote Fluoreszenz) und somit Antikörper, die mit ECD markiert wurden und

Kanal 4 Emissionen um 400 nm (violette Fluoreszenz) und somit Antikörper, die mit PCy5 markiert wurden.

### *Kompensation:*

Wie in Abb.8 ersichtlich ergibt sich nun das Problem, daß sich die Spektren des emittierten Lichtes zweier benachbarter Kanäle teilweise überschneiden, so daß z. B. eigentlich FITC-leuchtende Partikel fälschlicherweise im zweiten Kanal (PE) erfaßt werden (und umgekehrt). Um dem vorzubeugen, bedient man sich der Kompensation: Man setzt eine elektronische Korrektur, um nebeneinander liegende Fluoreszenzen besser voneinander trennen zu können.

### *Meßvorgang:*

Der Meßvorgang kann wie folgt zusammenfassend beschrieben werden: Passiert eine Zelle den Laserstrahl (also den Analysepunkt) werden neben dem FSC und dem SSC gleichzeitig je nach Versuchsansatz 1-4 Fluoreszenzen detektiert, in ein elektronisches Signal umgewandelt und auf dem Bildschirm angezeigt und gespeichert.

## **3.5 Zelllinien**

### **3.5.1 Mono Mac 6-Zellen**

#### **3.5.1.1 Kulturmedium**

Die MM6-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. A.W. Löms Ziegler-Heitbrock aus dem Institut für Immunologie in München bereitgestellt. Entsprechend den Arbeitsvorschriften seines Labors wurden die Zellen in RPMI 1640 mit folgenden Zusätzen kultiviert:

- L-Glutamin (2 mM)
- Penicillin (200 U/ml) und Streptomycin (200µg/ml)
- Non-essential amino acids (NEAA) (2x)
- OPI-supplement Sigma (enthält Oxalsäure, Pyruvat und Insulin)
- FKS (10%)

Nach Vorwärmung des RPMI-Mediums im Wasserbad auf 37°C wurde es mit allen Zusätzen außer FKS versetzt und anschließend durch einen Sterilisationsfilter ultrafiltriert (0,2 µm MediaKap filter). Das FKS wurde, nachdem eine Hitzeinaktivierung bei 60°C über 30 Minuten erfolgte, auch durch einen Sterilisationsfilter ultrafiltriert, portioniert und bei -20°C eingefroren. Erst unmittelbar vor dem Gebrauch wurde es dem Medium in entsprechendem Volumen zugesetzt.

Um eine eventuelle Besetzung des Östrogenrezeptors durch den Farbstoff Phenolrot zu vermeiden, wurde für die entsprechenden Versuche RPMI 1640 ohne Phenolrot eingesetzt.

### **3.5.1.2 Splitting der MM6-Zellen**

Die MM6-Zellen wurden in dem oben genannten Kulturmedium auf 24 well plates kultiviert. Nach Optimierung der für die Anzucht in well plates pro well benötigten Zellzahl (siehe 4.1) wurden die MM6-Zellen bei einer Konzentration von 400.000 Zellen pro well plate (2 ml) in Kultur angesetzt und 3- 4 Tage lang bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Beim Splittvorgang wurde wie folgt vorgegangen:

Von der in einem well plate vorhandenen Flüssigkeit (2 ml) wurde 1 ml von oben her abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden sorgfältig in der verbliebenen Restflüssigkeit (1 ml) resuspendiert; anschließend wurde die Flüssigkeit aus allen well plates in ein 50 ml-Zentrifugiergefäß überführt und bei 20°C mit 1200 Upm 5 Min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen und die verbliebenen Zellen wurden in 5 ml frischem Medium resuspendiert. Danach wurde eine Vitalitätsprüfung (siehe 3.5.4) und eine Zellzählung mit dem Coulter-Counter (siehe 3.5.3) durchgeführt. Die Einstellungen des Gerätes waren dabei:

- Full: 6,82 - 28,5 µm
- Narrow: 8,18 - 20,73 µm

Nach Entnahme der entsprechenden Zellmengen für die Versuchsansätze und für eventuelle Kryokonservierungen, wurden die restlichen Zellen erneut wie beschrieben in Kultur gesetzt.

### **3.5.2 THP-1-Zellen**

#### **3.5.2.1 Kulturmedium**

Die THP-1-Zellen wurden in RPMI 1640 ohne Phenolrot mit folgenden Zusätzen kultiviert:

- L-Glutamin (2 mM)
- FKS (10%)

Nach Vorwärmung des RPMI-Mediums im Wasserbad auf 37°C wurde es mit allen Zusätzen außer FKS versetzt und anschließend durch einen Sterilisationsfilter ultrafiltriert (0,2 µm MediaKap filter). Das FKS wurde, nachdem eine Hitzeinaktivierung bei 60°C über 30 Minuten erfolgte, auch durch einen Sterilisationsfilter ultrafiltriert, portioniert und bei -20°C eingefroren. Erst unmittelbar vor dem Gebrauch wurde es dem Medium in entsprechendem Volumen zugesetzt.

#### **3.5.2.2 Splitting der THP-1-Zellen**

Die THP-1-Zellen wurden in dem oben genannten Kulturmedium auf 20ml Kulturplatten (NUNC) kultiviert. Dabei wurden 200.000 Zellen pro ml Medium angesetzt und 3-4 Tage lang bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Beim Splittvorgang wurde wie folgt vorgegangen:

Die Zellen wurden im Medium resuspendiert und die gesamten 20 ml der Kulturflasche wurden in ein 50 ml-Zentrifugiergefäß gegeben und bei 20°C mit 1200 Upm 5 Min lang zentrifugiert. Das weitere Vorgehen war analog wie bei den MM6-Zellen beschrieben (siehe 3.5.1.2).

Für die Versuche wurden die THP-1-Zellen auch in 24 well plates kultiviert und entsprechend den MM6-Zellen behandelt.

### **3.5.3 Zellzählung mit dem Coulter-Counter**

#### *Prinzip:*

Bei der Zellzählung mit dem adaptierten Coulter-Counter werden jeweils 500 µl der zu analysierenden Zellsuspension über eine Kapillaröffnung in eine Glaselektrode gesaugt, die gemeinsam mit einer Metallelektrode in die Probenlösung eintaucht und mit dieser Metallelektrode verbunden ist. Partikel werden ab einer festzulegenden Mindestgröße beim Passieren der Kapillaröffnung in Form von Schwankungen des Widerstandes zwischen den beiden Elektroden registriert.

#### *Praktische Durchführung:*

Da monozytische Zellen als Einzelzellen in Suspension wachsen, hat man nach Resuspension 2x 100 µl der Zellsuspension entnommen und sie in je 10 ml Isoton (1:101) gegeben. Mit dieser Mischung hat man 2x eine Zählung mit dem Coulter-Counter durchgeführt (Errechnung des MW).

Die Gesamtzahl der Zellen berechnet sich nach folgender Formel:

$(\text{MW der Zählrate} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{ursprüngliches Volumen} \times \text{MW \% lebende Zellen}) / 500 \mu\text{l}$

Um den Anteil der lebenden Zellen abzuschätzen, wurde die unter Punkt 3.5.4 beschriebene Vitalitätsprüfung durchgeführt.

### **3.5.4 Vitalitätsprüfung mit Acridinorange / Ethidiumbromid**

Zur Testung der Vitalität der Zellen verwendeten wir Acridinorange und Ethidiumbromid. Dabei wird die unterschiedliche Fluoreszenz lebender und toter Zellen ausgenutzt. Bei diesem Test fluoreszieren lebende Zellen, die Acridinorange aufnehmen, grün, und die toten Zellen zeigen durch das Eindringen von Ethidiumbromid Rotfluoreszenz.

Für diesen Test wurden 50 µl Acridinorange (1 mg Acridinorange in 100 ml PBS) und 50 µl Ethidiumbromid (20 mg Ethidiumbromid in 100 ml PBS) mit 900 µl Medium vermischt. 50 µl dieser Lösung wurden mit 50 µl der Zellsuspension vermischt, auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde nun der Prozentsatz der lebenden Zellen anhand ihrer Fluoreszenz abgeschätzt.

### **3.5.5 Kryokonservierung der Zellen**

#### *Einfriervorgang:*

Für die Aufbewahrung eines Teils der MM6- und THP-1-Zellen in flüssigem Stickstoff wurde ein spezielles Einfrierverfahren mit Dimethylsulfoxid(DMSO)-haltigem Medium eingesetzt. DMSO ist ein für hydrophile und lipophile Substanzen gleichermaßen geeignetes Lösungsmittel, das bei Temperaturen von über 20°C toxisch wirkt und deswegen vor Kontakt mit den Zellen stets gekühlt werden muß.

Das DMSO-haltige Medium für die Kryokonservierung der Zellen enthielt folgende Bestandteile:

- RPMI 1640
- FKS 30%
- DMSO 20%

Nach Festlegung der einzufrierenden Zellzahl (ca. 5 Mio Zellen) wurde das zelluläre Pellet in 1ml des Kulturmediums suspendiert und in ein Kryotube gegeben. Dieses wurde auf Eis gelagert (0°C) und es wurde dann tröpfchenweise 1 ml des vorgekühlten Mediums mit DMSO zugegeben (s.o.), so daß die Lösung nun insgesamt 15% FKS und 10% DMSO enthielt .

Die Zellen wurden dann schonend für mindestens 24 h bei -80°C eingefroren. Man verwendete dafür eine dickwandige Styroporbox, um die Zellen nicht zu schlagartig auf -80°C abzukühlen (optimale Gefriereschwindigkeit ca. 1 °C/Min). Anschließend wurden die so präparierten Kryotubes möglichst rasch unter Verwendung eines Ampullenhalters in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Lagerbehälter dauerhaft gelagert.

*Auftauvorgang:*

Zum Auftauen wurde das Kryotube aus dem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Lagerbehälter entnommen, in ein 37°C warmes Wasserbad getaucht, bereits in angetautem Zustand unter tropfenweiser Zugabe von 5 ml eiskaltem FKS in ein 10 ml-Zentrifugierröhrchen überführt und 10 Min bei 1200 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde dann abgenommen und das zelluläre Pellet in frischem Kulturmedium resuspendiert.

### **3.5.6 Erfassung und Quantifizierung von Oberflächenantigenen bei den Zelllinien**

#### **3.5.6.1 Überprüfung des Gerätes**

Vor Beginn eines jeden Versuches wurde zur Überprüfung von Zustand und Funktion des Gerätes ein sogenannter Flow-Check durchgeführt. Eine Suspension aus bezüglich Größe und Fluoreszenz genau definierten Latexpartikeln wurde in einem eigens vom Hersteller empfohlenen Protokoll gemessen und die Ergebnisse beurteilt. Zeigte die Messung, daß der HPCV (ein Maß für die Streuung der Latexpartikel) über 1,0 war, oder daß noch im Gerät vorhandener Zelldetritus die Messung störte, so wurde das Gerät gespült, nochmals überprüft und erst dann in Betrieb genommen.

#### **3.5.6.2 Vorbereitung der Zellen für die FACS-Analyse**

Exponentiell wachsende MM6- und THP-1-Zellen wurden nach Beendigung des Versuches in den wells resuspendiert, und die Zellen von jeweils einem well wurden auf 2 Falcon-Röhrchen verteilt. Das eine diente als zu untersuchende Probe und das zweite als jeweilige Isotypkontrolle dazu.

- *Bestimmung von CD14 an lebenden Zellen*

Die Zellen (ca. 500.000) wurden abzentrifugiert, in 100 µl PBS resuspendiert und mit 20 µl CD14 oder Isotypkontrolle 10 Min lang bei RT inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde 1 ml PBS dazugegeben und die Zellen wurden abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet wurde in 800 µl PBS resuspendiert und die Proben wurden dann gleich am FACS analysiert.

- *Bestimmung von TF an lebenden Zellen ohne Blockierung von Fc-Rezeptoren*

Die Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen und das Pellet wurde in 80 µl PBS resuspendiert und dann mit den entsprechenden Antikörpern (Isotypkontrolle 20 µl; TF 10 µl) für 10 Min bei RT inkubiert. Die Antikörperbindung wurde dann mit 1 ml PBS unterbrochen, die Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen und in 800 µl PBS für die FACS-Analyse resuspendiert.

- *Bestimmung von TF an lebenden Zellen mit Blockierung von Fc-Rezeptoren*

Die Zellen wurden nach dem Waschschrift mit PBS (s.o.) in 60 µl PBS resuspendiert, mit 20 µl FcR-blocking reagent für 5 Min bei RT und erst danach mit den entsprechenden Antikörpern (Isotypkontrolle 20 µl; TF 10 µl) inkubiert.

- *Bestimmung von TF an fixierten Zellen*

Die Zellen wurden abzentrifugiert, 1x mit PBS gewaschen und das Pellet wurde in 1 ml 1%-igem Formaldehyd-PBS-Puffer resuspendiert und für 30 Min bei 4°C fixiert. Die Zellen wurden dann abzentrifugiert und 1x mit PBS gewaschen. Danach wurden sie in 60 µl PBS resuspendiert und 5 Min lang mit 20µl FcR blocking reagent bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen mit TF-AK (10µl) oder Isotypkontrolle (20µl) 30 Min lang bei 4°C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde 1 ml PBS dazugegeben, die Zellen wurden abzentrifugiert und das Pellet wurde in 800 µl PBS resuspendiert und am FACS analysiert (mit Ausnahme der FcR-Blockierung alles auf Eis oder bei 4°C).

- *Gleichzeitige 2-parametrische TF- und CD14-Bestimmung*

Die Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen und das Pellet wurde in 60µl PBS resuspendiert. Danach erfolgte eine Inkubation mit 20µl FcR-blocking reagent über 5 Min bei RT und dann mit den entsprechenden Antikörpern (Isotypkontrollen 20µl; CD14-AK 20µl; TF-AK 10µl) über 10 Min bei RT. Die Antikörperbindung wurde dann mit 1ml PBS unterbrochen, die Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen und in 800µl PBS für die FACS-Analyse resuspendiert.

Probe 1: IgG-FITC + IgG-PE  
 Probe 2: IgG-FITC + CD14-PE  
 Probe 3: TF-FITC + IgG-PE  
 Probe 4: TF-FITC + CD14-PE

### **3.5.6.3 FACS-Analyse**

- *Einzelparametrische CD14- und TF-Bestimmung*

Der Diskriminator wurde auf den Parameter FSC eingestellt, d.h. es wurden nur diejenigen Zellen/events erfaßt und dargestellt, die eine bestimmte Größe besaßen. Auf diese Weise wurden Zellfragmente und andere störende Bestandteile vom Gerät nicht registriert und es wurde dadurch von unnötiger Informationsaufnahme entlastet.

Als erstes wurden die Zellen im FSC/SSC-Histogramm anhand ihrer Größe und Granularität dargestellt. Beide Zelllinien erschienen dabei als relativ homogene Zellpopulationen und wurden als solche in einem gate (A) eingegrenzt. Bei der weiteren Datenverarbeitung wurden nur diese eingegrenzten Zellpopulationen analysiert.

Der mit FITC markierte TF-AK wurde in Kanal 1, der PE-markierte CD14-AK in Kanal 2 detektiert.

Vor jeder Messung fand eine FITC- oder PE-markierte Isotypkontrolle statt. Dieses Signal wurde dazu benutzt, die unspezifische AK-Bindung zu quantifizieren und zu speichern und sie danach vom spezifischen Signal abzuziehen, und um die Signalstärke des Geräts für die jeweilige Fluoreszenz einzustellen. Da die Datendarstellung auf einer logarithmischen Skalierung erfolgte, wurde das unspezifische Signal der Isotypkontrolle innerhalb der 1. Dekade eingestellt und mit einem gate eingegrenzt. Bei der Messung der eigentlichen Probe wurden dann 2 Parameter untersucht. Anhand der Anzahl der Zellen, die für das jeweilige AG stärker als die Isotypkontrolle fluoresziert haben (d.h. diejenigen, die außerhalb des gates des unspezifischen Signals lagen), wurde der Parameter „%-positive Zellen“ errechnet. Dieser Parameter gibt bei der untersuchenden Probe Auskunft darüber, wie viele Zellen von der gesamten Zellpopulation das untersuchende AG exprimieren. Der 2. Parameter, der untersucht wurde, war die „mean channel fluorescence intensity“ (MCFI), d.h. die gesamte Intensitätsstärke, mit der die zu untersuchende Probe das jeweilige AG exprimierte.

- *Dualparametrische CD14- und TF- Bestimmung*

Bei dieser Messung wurden die Zellen ebenfalls anhand ihrer Größe und Granularität erkannt und dargestellt.

Probe 1: IgG-FITC + IgG-PE

Probe 2: IgG-FITC + CD14-PE

Probe 3: TF-FITC + IgG-PE

Probe 4: TF-FITC + CD14-PE

Bei Probe 1 (Isotypkontrollen für beide Fluoreszenzen) wurden Signalstärken und gates eingesetzt, bei Proben 2 und 3 wurden die spektralen Fluoreszenzüberlappungen kompensiert (Abb. 9) und bei den endgültigen Geräteeinstellungen wurde die 4. Probe mit beiden spezifischen AK für TF und CD14 gemessen.

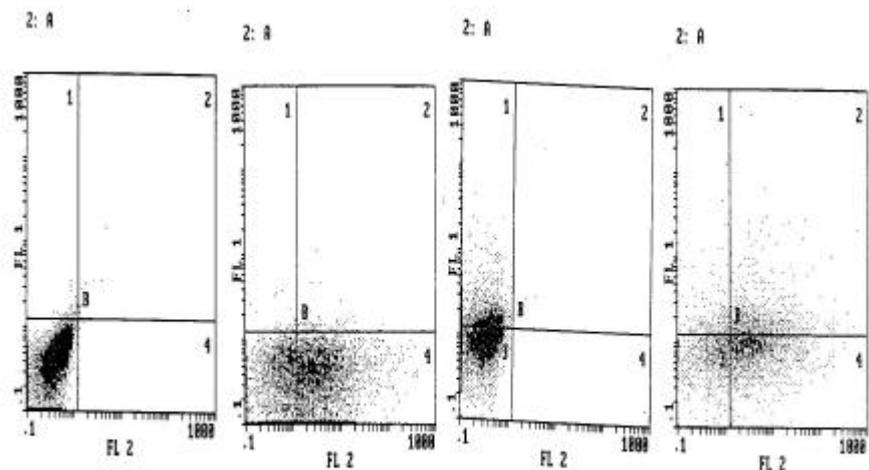


Abb. 9 Kompensation der spektralen Fluoreszenzüberlappungen

### 3.6 Periphere Blutmonozyten

#### 3.6.1 Isolierung der Zellen

10ml Heparin(Heparin-Natrium Braun 25000 I.E. / 5ml)-antikoaguliertes venöses Blut (0,5 ml Heparin / 10ml Blut) wurde unter sterilen Bedingungen von gesunden männlichen Probanden abgenommen.

Es wurde mit dem gleichen Volumen an PBS verdünnt (1:1), und jeweils 10 ml von dieser Blut-PBS-Mischung wurden vorsichtig auf 20ml Ficoll pipettiert (Beibehaltung der 2

Phasen). Das Röhrchen wurde dann 20 Min lang bei 2400 Upm und 4 °C abzentrifugiert. Die Interphase wurde abgenommen, in PBS verdünnt und nochmals bei 2400 Upm bei 4°C 6 Min lang abzentrifugiert, um die Zellsuspension von Thrombozyten zu befreien. Das zelluläre Pellet wurde dann 1x mit PBS und 1x mit Kulturmedium (s.u.) gewaschen (1500 Upm; 4°C; 5 Min). Danach wurde es in 24ml warmem Medium resuspendiert und in Kultur gesetzt.

### **3.6.2 Kultur**

#### *Kulturmedium:*

RPMI 1640 ohne Phenolrot mit folgenden Zusätzen: 10% FKS, 2mM L-Glu, 100U/ml Pen-Strep.

Nach Vorwärmung des RPMI-Mediums im Wasserbad auf 37°C wurde es mit allen Zusätzen außer FKS versetzt und anschließend durch einen Sterilisationsfilter ultrafiltriert (0,2µm MediaKap filter). Das FKS wurde, nachdem eine Hitzeinaktivierung bei 60°C über 30 Minuten erfolgte, auch durch einen Sterilisationsfilter ultrafiltriert, portioniert und bei -20°C eingefroren. Erst unmittelbar vor dem Gebrauch wurde es dem Medium in entsprechendem Volumen zugesetzt.

#### *Kultur A:*

Kultivierung von peripheren mononukleären Zellen (= *PMN-Zellen*)

Die isolierten PMN-Zellen wurden nach der Dichtezentrifugation à 6ml auf 2 hydrophobe Kulturplatten (Petriperm) verteilt und über 3 Tage im Brutschrank kultiviert.

#### *Kultur B:*

Kultivierung von einer Monozyten-angereicherten Population (= *MBP-Zellen*)

Die PMN-Zellen wurden in 12ml Medium in einer Plastikkulturflasche über 60 Min bei 37°C kultiviert. Der Überstand wurde abgenommen (nicht adhärente Zellen = größtenteils Lymphozyten) und die adhären Zellen (größtenteils Monozyten) wurden mit kaltem PBS kräftig gespült, von der Oberfläche der Flasche abgelöst und in ein Röhrchen überführt. Die Zellen wurden dann abzentrifugiert, in 12ml Medium aufgenommen und à 6ml auf 2 hydrophoben Kulturplatten in Kultur gesetzt (3 Tage).

### **3.6.3 Erfassung und Quantifizierung von Oberflächenantigenen bei den Blutmonozyten**

#### **3.6.3.1 Überprüfung des Gerätes (siehe 3.5.6.1)**

#### **3.6.3.2 Vorbereitung der Zellen für die FACS-Analyse**

##### *Protokoll 1:*

Die Zellen wurden von jeder Kulturplatte abgenommen und in je 1 Röhrchen überführt. Sie wurden dann abzentrifugiert (1500Upm, RT, 5 Min), der Überstand wurde abgenommen, und die Zellen wurden in 2ml PBS resuspendiert und auf je 4 Falcon-Röhrchen à 0,5ml verteilt. Diese wurden nochmals abzentrifugiert (1500U/min, RT, 5 Min), der Überstand wurde abgenommen, und die Zellen wurden in 80µl PBS resuspendiert.

Danach erfolgte eine Inkubation mit Antikörpern über 10 Min bei RT (alle 20µl außer TF-FITC 10µl, auf 80µl Lösung). Die Antikörperbindung wurde dann durch Zugabe von 1ml PBS unterbrochen und die Zellen wurden abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das zelluläre Pellet in 800µl PBS resuspendiert und anschließend am FACS analysiert.

*Protokoll 2: (mit Fc-Rezeptor-Block)*

Die Zellen wurden von jeder Kulturplatte abgenommen und in je 1 Röhrchen überführt. Sie wurden dann abzentrifugiert (1500Upm, RT, 5 Min), der Überstand wurde abgenommen, und die Zellen wurden in 2ml PBS resuspendiert und auf je 4 Falcon-Röhrchen à 0,5ml verteilt. Diese wurden nochmals abzentrifugiert (1500Upm, RT, 5 Min), der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wurden in 60µl PBS resuspendiert.

Danach erfolgte eine Inkubation mit Fc-Rezeptor-gerichteten Antikörpern (FcR blocking reagent vom MACS Magnetic cell sorting; unkonjugiert; 20µl; 5 Min; RT), anschließend eine Inkubation mit Antikörpern für 10 Min bei RT (alle 20µl außer TF-FITC 10µl; auf 80µl Lösung). Die Antikörperbindung wurde dann durch Zugabe von 1ml PBS unterbrochen und die Zellen wurden abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das zelluläre Pellet in 800µl PBS resuspendiert und anschließend am FACS analysiert.

*Protokoll 3: (mit Fc-Rezeptor-Blockierung und Fixierung)*

Die Zellen wurden von jeder Kulturplatte abgenommen und auf je 1 Röhrchen überführt. Sie wurden dann bei 1500Upm über 5 Min bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wurden in je 2ml PBS resuspendiert und auf je 4 Falcon-Röhrchen à 0,5ml verteilt. Sie wurden dann nochmals bei 1500Upm über 5 Min bei 4°C abzentrifugiert und anschließend mit je 2ml kaltem 1%-igen Formaldehyd-Puffer (PBS) 30 Min lang bei 4°C fixiert. Danach wurden sie bei 1500Upm 5 Min lang bei 4°C abzentrifugiert und nochmals mit kaltem PBS gewaschen. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in 60µl PBS resuspendiert, mit 20µl FcR blocking reagent 5 Min lang bei RT und dann mit den Antikörpern 30Min lang bei 4°C (alle 20µl außer TF-FITC 15µl, auf 80µl Lösung) inkubiert. Die fixierten Zellen wurden dann 2x mit kaltem PBS gewaschen, nach Abnahme des Überstandes in 800µl PBS resuspendiert und bis zur FACS-Analyse bei 4°C aufbewahrt.

### **3.6.3.3 FACS-Analyse**

- *Dualparametrische CD14- und TF-Bestimmung* (wie unter 3.5.6.3 beschrieben)

Auf diese Weise wurden speziell die CD14- positiven Zellen, d.h. die Monozyten, auf ihre TF-Expression untersucht.

### 3.7 Trypsin-Methode für die durchflußzytometrische DNS-Phasen-Analyse

#### 3.7.1 Prinzip der DNS-Phasen-Analyse

Unter normalen Bedingungen sollten alle diploiden Zellen des gleichen eukariotischen Organismus, die sich in den  $G_0$ - und  $G_1$ -Phasen des Zellzyklus befinden, den gleichen DNS-Gehalt besitzen; diese DNS-Menge wird als  $2C$  bezeichnet. Die DNS-Synthese während der S-Phase des Zellzyklus führt zu einer Erhöhung des DNS-Gehaltes, welcher am Ende der S-Phase  $4C$  erreicht wird und während der folgenden  $G_2$ -Phase und Mitose diesen Wert behält. Nach Beendigung der Mitose wurde die ursprüngliche Zelle durch zwei Tochterzellen ersetzt, die jeweils einen DNS-Gehalt von  $2C$  besitzen (Abb.10a). In Abb.10b ist schematisch das durchflußzytometrische Bild einer solchen Verteilung dargestellt.

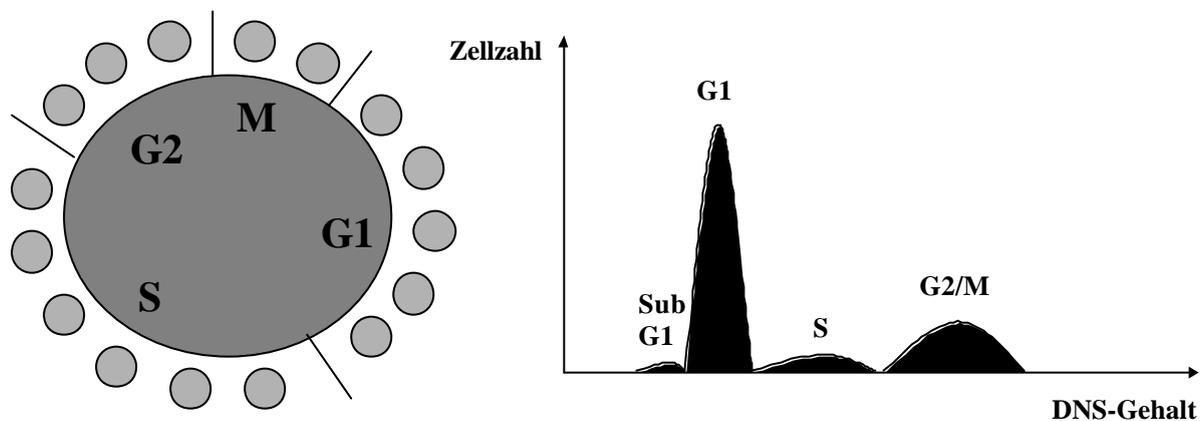


Abb. 10 DNS-Synthese-Zyklus (*links*); schematische Darstellung am Durchflußzytometer (*rechts*)

Zur Anfärbung der DNS wurde in unserem Fall Propidiumiodid mit einem Emissionsmaximum bei 488 nm eingesetzt und im Kanal 3 detektiert und gemessen. Da Propidiumiodid sowohl dsDNS als auch dsRNS interkalierend bindet und anfärbt, wurden die Proben mit RNase vorbehandelt, um die RNS zu verdauen und dadurch schärfere DNS-Verteilungskurven zu bekommen.

Es ist ein häufiges Phänomen, daß mehrere fixierte Zellen/Nuklei, die für DNS-Analyse angefärbt sind, sich miteinander verklumpen und dadurch vom Instrument als ein einziges event registriert werden, das aber doppelten oder dreifachen DNS-Gehalt besitzt. Es ist deswegen von großer Wichtigkeit, zwischen Einzelnuklei (singlets) und verklumpte Nuklei (duplets, triplets u.s.w.) bei der Aquisition der Daten zu diskriminieren (Abb.11 und 12).

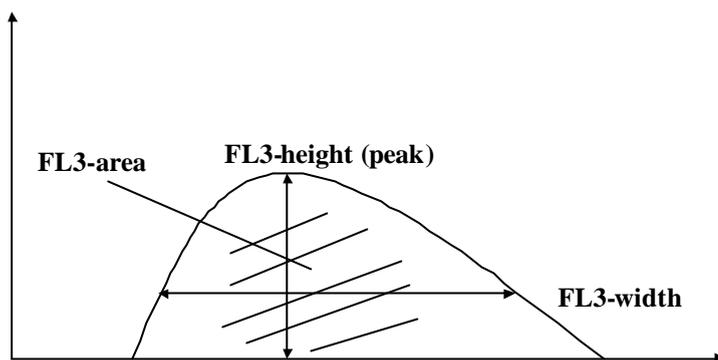


Abb. 11 Singlets werden von Duplets, Triplets usw. abgegrenzt. Dieser Vorgang wurde durch die Möglichkeit des EPICS XL erzielt, FL3-detektierte Events sowohl für „area“ (FL3) als auch mit der AUX-Funktion für „height“ (AUX FL3-peak) zu analysieren.

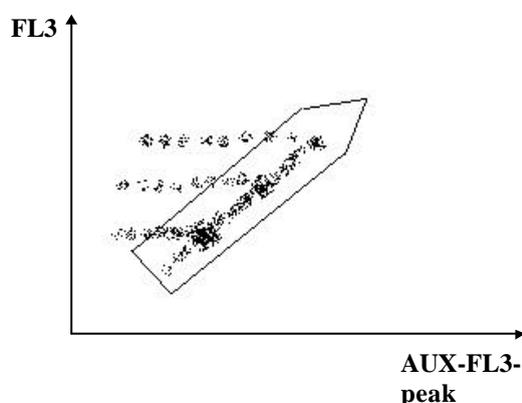


Abb. 12 Bei der Darstellung des FL3/AUX FL3-peak-Histogramms erscheinen alle Singlets auf einer diagonalen Linie. Events, die über dieser Diagonalen liegen, sind Duplets oder Triplets und wurden auf diese Weise ausgegrenzt.

Die eingegrenzten Singlets wurden dann zur Visualisierung bei den restlichen Histogrammen eingesetzt und weiter ausgewertet.

### 3.7.2 Einstellung des Gerätes

Das EPICS XL wurde mit Hilfe des Becton Dickinson DNA Quality Control Particles eingestellt. Gemäß dem Kit-Protokoll wurde ein Tropfen der Hühnererythrozytenkerne (CEN)-Lösung in ein Röhrchen, das 1ml Propidiumiodidlösung enthielt, gegeben und der ganze Ansatz wurde im Dunkeln über 10 Min bei RT inkubiert.

Die Aquisition dieser Partikel am EPICS XL untersuchte die Linearität und Auflösung des Gerätes und wurde dazu benutzt, die Diskriminationsgrenzen, die Signalstärke (photomultiplier tube voltages, amplifier gains) und die Flußrate einzustellen. Diese Einstellungen wurden dann mit leichten Modifizierungen für die humanen nukleären Proben benutzt.

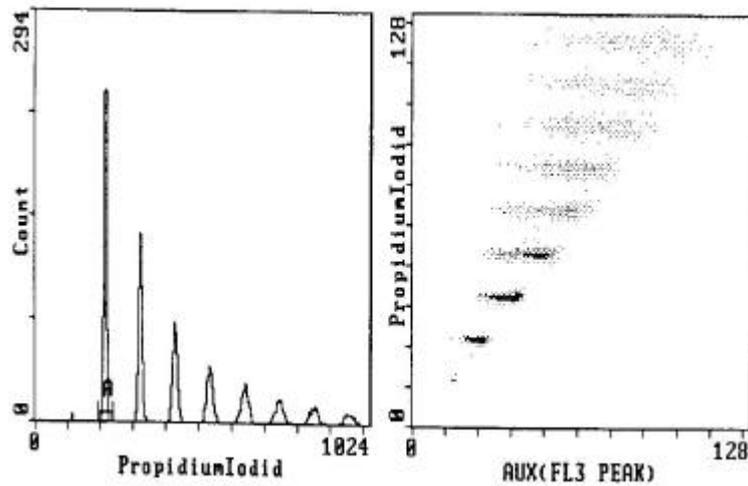


Abb. 13 Es werden 8 Referenz-peaks im FL3-Histogramm gezeigt. Die ersten 4 peaks repräsentieren die Singlets, Duplets, Triplets und Quadruplets. Die Meanwerte im Kanal waren ungefähr 2, 3 und 4 mal höher im Vergleich zum Singlet-Peak, d.h. die Reaktion des Instruments war linear und die Kerne wurden korrekt angefärbt.

*Reagentien Cycletest PLUS DNA reagent kit (Becton Dickinson):*

Lösung A:

Trypsin in Sperminettrahydrochlorid-Detergenzpuffer (zur enzymatischen Auflösung von Zellmembranen und Freisetzung von Kernen aus Gewebefragmenten).

Lösung B:

RNAse A und Trypsininhibitor in Sperminpuffer (zur RNA- Verdauung und Inaktivierung des Trypsins)

Lösung C:

Propidiumiodid in Sperminpuffer (zur Stabilisierung und Färbung des Chromatins)

Pufferlösung:

Dimethylsulfoxid (DMSO) in Saccharose-Natriumcitratpuffer (zur Zellpräparation und Lagerung oder in vitro für Feinnadelaspirate an frischem Gewebe)

### 3.7.3 Vorbereitung der MM6-Zellen für die durchflußzytometrische DNS-Analyse

Die Zellzahl wurde bestimmt und es wurden Proben mit je 1-1,5 Mio Zellen in Kulturmedium angefertigt. Die Zellen wurden dann bei 200g 5 Min lang zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit PBS (3ml) resuspendiert, in Falcon 2052 Tubes überführt und bei 200g 5 Min lang gewaschen. Die Zellen wurden in 3 ml Pufferlösung resuspendiert und bei 300g 5 Min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden wieder in 1,5ml Pufferlösung resuspendiert und bei 300g 5 Min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde dann vorsichtig abgenommen und verworfen. Eventuelle Überstandsreste wurden vorsichtig getrocknet. Die Zellen wurden 10 Min lang mit 250µl Lösung A behandelt. Danach wurde 200µl Lösung B über 10 Min hinzugegeben. Anschließend wurde 200µl kalte Lösung C zu den Kernen gegeben und im Dunklen auf Eis über weitere 10 Min inkubiert. Um eine längere Lagerung der Proben zu vermeiden, wurde die durchflußzytometrische Analyse der Proben direkt nach Beendigung der Inkubationszeit durchgeführt.

### 3.8 Bestimmung von Tumor Necrosis Factor a

*Vorbereitung der Zellen:*

Die MM6-Zellen und die isolierten peripheren Blutmonozyten wurden je nach Versuchsansatz mit oder ohne Calcitriol (40 ng/ml; 48 h) oder/ und E<sub>2</sub> (0 bis 1000 pg/ml; 24h) in Kultur gesetzt. Stimulationen wurden mit 1µg/ml LPS (5h) durchgeführt. Für die TNFα-Bestimmungen wurde aus dem jeweiligen well 1,2ml des Überstandes bei 2000g über 10 Min abzentrifugiert und 1ml des erneuten Überstandes bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt.

*Vorbereitung der verwendeten Substanzen:*

Beschichtungspuffer:

50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH=9,6 mit 5M NaOH (35,5g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 5L)

Assaypuffer (LKC):

0,15M NaCl (45,0g)

50mM Tris-Base (30,0g); auf 3 l mit bidest. H<sub>2</sub>O aufgefüllt; pH=7,75 mit HCL eingestellt

0,005 % Thimerosal (0,25g)

0,01% Tween 40 (0,5g)

0,5% RSA (25g)

0,05% R-γ-Globulin (2,5g)

20µM Diethylentriaminpentaessigr. (39.35mg) wurde auf 5 l aufgefüllt, über 8µm filtriert und bei 4°C gelagert

Waschpuffer:

50mM Tris pH=7,2

0,2% Tween 20

0,005% Thimerosal

Beschichtungslösung:

Anti-hu-TNFα c=1µg/ml (200 ng/w) in Beschichtungspuffer verdünnt (20ml/Platte)

Standardreihe:

Internat. NISC-Std.-hu-TNFα wurde nach Herstellervorschriften gelöst und in LKC verdünnt (je 1:2 Schritte).

Std.-7=2000 pg/ml bis Std.-1=31,25 pg/ml Std.-0=LKCpg/ml

250µl-Portionen bei -20°C gelagert

Proben:

in LKC auf ca. 40-1500 pg/ml verdünnt

2. Antikörperlösung:

Anti-TNF-Bi c=25 ng/ml (5 ng/w) in LKC verdünnt (20ml)

SA-POD-Konjugat:

SA-POD 1:8000 in LKC verdünnt (20ml/Platte)

TMB-Substrat (gebrauchsfertig)

1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:

56 ml SO<sub>4</sub> 96% ad 1 l H<sub>2</sub>O (evtl. auf Eis)

*Durchführung:*

• Beschichtung:

Die Mikrotiterplatte wurde mit 200µl/w Beschichtungslösung gefüllt, 48h bei 4°C inkubiert und 2x mit 300µl/w Waschpuffer gespült.

• Nachbeschichtung:

Es wurden 300µl/w LKC-Puffer 1h bei RT inkubiert, danach mit 300µl/w Waschpuffer gespült, 1h lang bei RT getrocknet und bei -20°C gelagert (bei sofortigem Gebrauch wurde 3x gewaschen).

• Proben, Std., Kontrollen:

Die gelagerten Platten wurden 3x gewaschen (je 300ml/w Waschpuffer) 100µl/w LKC-Puffer und 100µl/w Std., K1+2, die Proben wurden 2h lang bei RT geschüttelt (je 300µl/w Waschpuffer).

- Antikörperlösung:

Es wurden 200µl/w Anti-TNF-Bi-Lösung gegeben, 2h lang bei RT geschüttelt und 3x gewaschen (je 300µl/w Waschpuffer).

- SA-POD-Konjugat:

200µl/w Konjugatlösung wurde ½h lang bei RT geschüttelt und anschließend 3x gewaschen (je 300µl/w Waschpuffer).

- TMB-Substrat:

200µl/w Substratlösung wurde ca. 15 Min lang bei RT geschüttelt (sehr temperaturabhängig, darum Färbung beobachten).

- Stop:

Um die Reaktion zu beenden, wurden 50µl/w 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> unter leichtem Schwenken hinzugefügt.

- Messung:

Die Messung wurde bei 450/690nm durchgeführt.

### **3.9 Datenverarbeitung/ statistische Auswertung**

Die Daten, die wir im Laufe unserer Versuche erhielten, wurden auf einem PC (Pentium 133 MHz, Betriebssystem: Windows NT 4.0, Office: Windows 98) mit den Programmen SPSS für Windows und Microsoft Excel analysiert. Die Texte wurden mit Microsoft Word erstellt. Die Gestaltung bzw. Bearbeitung der Histogramme oder anderer Abbildungen erfolgte mit Paint, Power Point und Adobe Photoshop.

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde im SPSS-Programm der Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben verwendet (Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ).

## IV. Methodische Vorversuche

### 4.1 Optimierung der für die Anzucht in well plates pro well benötigten Zellzahl

#### *Versuchsziel*

Die bei der Anzucht in well plates verwendete Zellzahl hat Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten und die Vitalität der MM6-Zellen. Ziel des Versuches war, die optimale Zellzahl pro well zu ermitteln.

#### *Versuch 1 – Kultivierung über 3 Tage*

##### Aufbau :

In je 4 wells wurden folgende Mengen an MM6-Zellen kultiviert:

- 800.000 Zellen
- 400.000 Zellen
- 200.000 Zellen
- 100.000 Zellen
- 50.000 Zellen

#### *Versuch 2 – Kultivierung über 4 Tage*

##### Aufbau:

In je 4 wells wurden folgende Mengen an MM6-Zellen kultiviert:

- 400.000
- 200.000
- 100.000
- 50.000

#### *Ergebnisse*

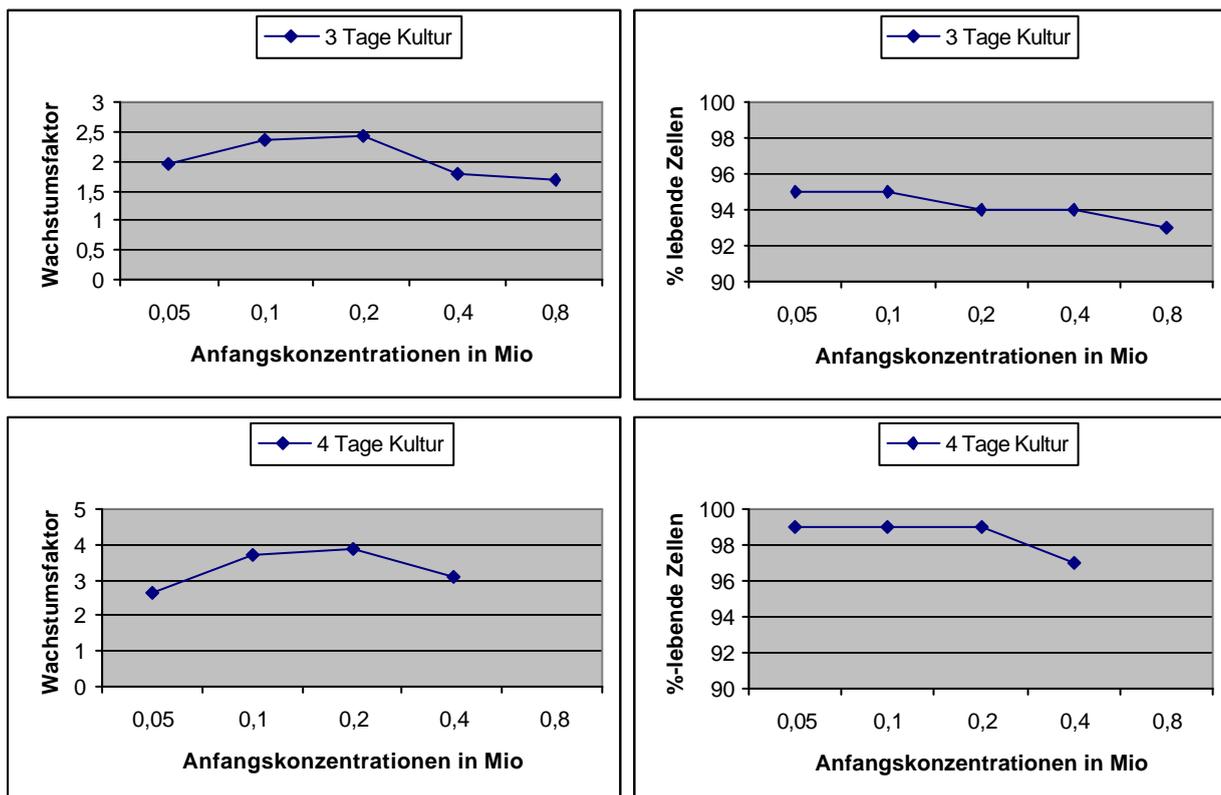


Abb. 14 WF und Vitalität der MM-6-Zellen im Verlauf einer 3- bis 4-tägigen Kultur bei verschiedenen Anfangskonzentrationen.

Bei der Vitalitätsprüfung war festzustellen, daß eine hohe Anfangskonzentration der Zellen in den well plates (400.000- 800.000) mit einer hohen Rate an abgestorbenen Zellen nach einer 3- bis 4-tägigen Kultur korrelierte. Zudem war bei diesen Zellen, auch wenn sie als „lebend“ einzustufen waren, zu beobachten, daß etliche einen rötlichen Randsaum aufwiesen. Diese Zellen dürften als „sterbend“ einzustufen sein. In den übrigen wells war der Anteil lebender Zellen um so größer, je weniger Zellen ausgesät wurden.

Der Faktor, um den sich die Zellen in den wells vermehrt hatten, war in den wells mit 200.000 und 100.000 Zellen am größten und in den wells mit 800.000 Zellen am kleinsten.

#### 4.2 Untersuchung des Einflusses des Farbstoffes Phenolrot im Kulturmedium auf die Proliferation der Zellen

##### *Fragestellung*

Es wurde untersucht, ob das Vorhandensein des Farbstoffes Phenolrot im RPMI-Medium einen Einfluß auf die Proliferation der MM6-Zellen hat.

##### *Vorgehen*

Es wurden je 12 x 200.000 MM6-Zellen im üblichen Kulturmedium mit und ohne Phenolrot unter sonst gleichen Bedingungen kultiviert. Nach 4 Tagen wurde eine Zellzählung durchgeführt und der Wachstumsfaktor (Quotient Zellzahl nach Kultur / angesetzte Zellzahl) der Zellen ermittelt.

##### *Ergebnisse*

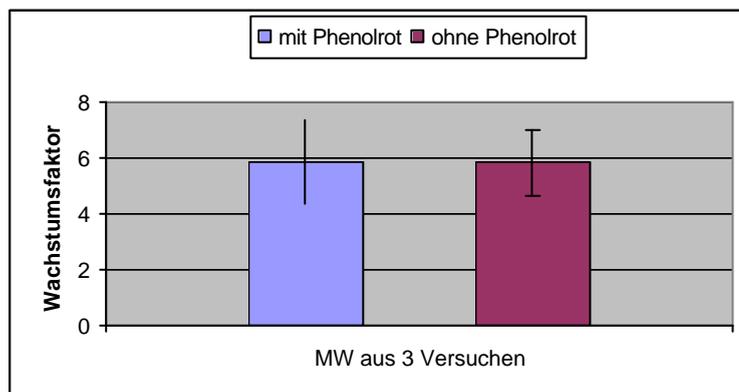


Abb.15 Einfluß von Phenolrot im Kulturmedium der MM6-Zellen auf deren Proliferationsverhalten

Der MW des Wachstumsfaktors bei diesen 3 Versuchen war also Phenolrot-unabhängig.

#### 4.3 Untersuchung des Einflusses der Lage der Zellen in der Kulturplatte auf ihre Proliferation

##### *Fragestellung*

Alle Proliferationsversuche der MM6-Zellen wurden im „24 well cell culture cluster“ der Firma Costar durchgeführt.

Diese Platte besteht aus 24 „wells“ und ist folgendermaßen aufgebaut:

Reihe 1	Reihe 2	Reihe 3	Reihe 4	Reihe 5	Reihe 6
Well 1	Well 5	Well 9	Well 13	Well 17	Well 21
Well 2	Well 6	Well 10	Well 14	Well 18	Well 22
Well 3	Well 7	Well 11	Well 15	Well 19	Well 23
Well 4	Well 8	Well 12	Well 16	Well 20	Well 24

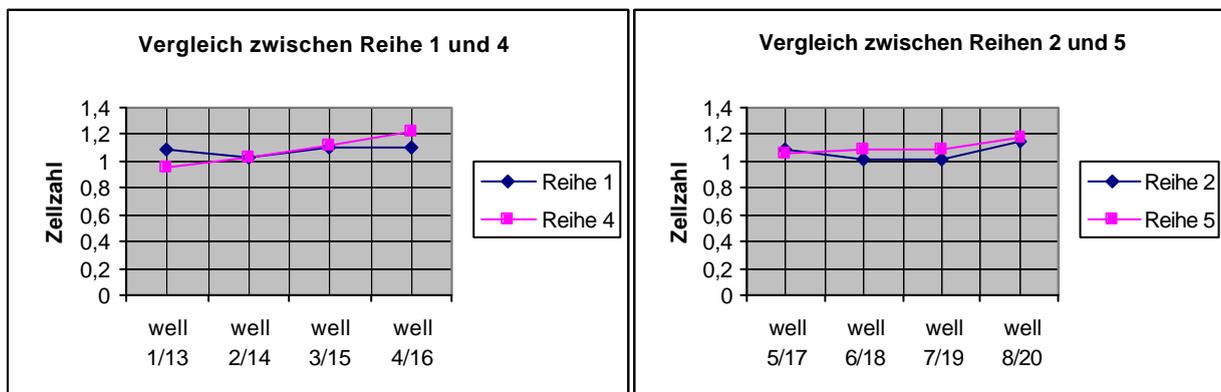
Mit Hilfe dieses Versuchs wollten wir untersuchen, ob die Lage der Zellen in den wells, z.B. Reihe 1 am Rande der Kulturplatte, Reihe 3 in der Mitte, aus atmosphärischen oder stereodynamischen Gründen deren Proliferationsverhalten beeinflusst.

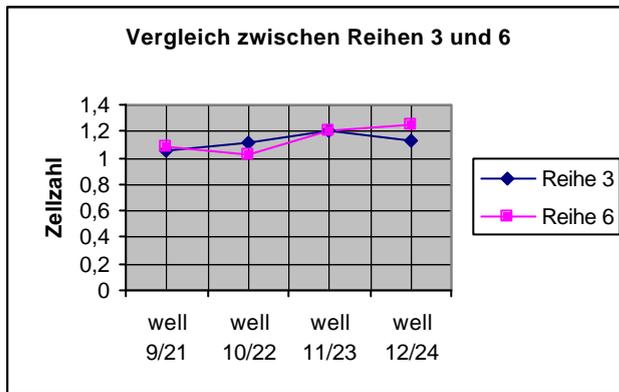
### Ergebnisse

Zellzahl pro well nach 3 Tagen Kultur:

Reihe 1	Reihe 2	Reihe 3	Reihe 4	Reihe 5	Reihe 6
Well 1 1,094 Mio	Well 5 1,08 Mio	Well 9 1,05 Mio	Well 13 0,948 Mio	Well 17 1,06 Mio	Well 21 1,09 Mio
Well 2 1,025 Mio	Well 6 1,01 Mio	Well 10 1,11 Mio	Well 14 1,03 Mio	Well 18 1,08 Mio	Well 22 1,02 Mio
Well 3 1,097 Mio	Well 7 1,01 Mio	Well 11 1,21 Mio	Well 15 1,124 Mio	Well 19 1,08 Mio	Well 23 1,21 Mio
Well 24 1,108 Mio	Well 8 1,15 Mio	Well 12 1,13 Mio	Well 16 1,216 Mio	Well 20 1,18 Mio	Well 24 1,25 Mio

Tab. 4 Zellzahl pro Well nach 3 Tagen Kultur der MM6-Zellen





Die Mittelwerte von Reihe 1 und 4 waren identisch; der Mittelwert von Reihe 6 war um 1,8% höher als der von Reihe 3, und der Mittelwert von Reihe 5 war um 3,8% höher als der von Reihe 2.

Der Verdacht, daß die Zellen, die in den wells am Rande der Platte angezüchtet werden, schlechter wachsen, bestätigte sich nicht.

Die wells der Reihe 1 befinden sich alle am linken Rand der Kulturplatte, die Reihe 4 dagegen in der rechten Mitte, der durchschnittliche Wachstumsfaktor der Zellen war jedoch bei beiden Reihen identisch. Die Unterschiede bei den anderen beiden Vergleichspartnern waren auch minimal.

Daraus läßt sich schließen, daß die Ergebnisse der Experimente unabhängig von der Lage der Zellen auf der Kulturplatte sind.

#### 4.4 Beurteilung der Isolationsmethode der peripheren Blutmonozyten

##### Fragestellung

Es sollte untersucht werden, ob der kurze Adhärierungsprozeß der PMN-Zellen (3.6.2, Kultur B) tatsächlich zu einer Monozytenbereicherung führt.

##### Ergebnisse

##### 1. Durchflußzytometrische Quantifizierung der CD14-Expression

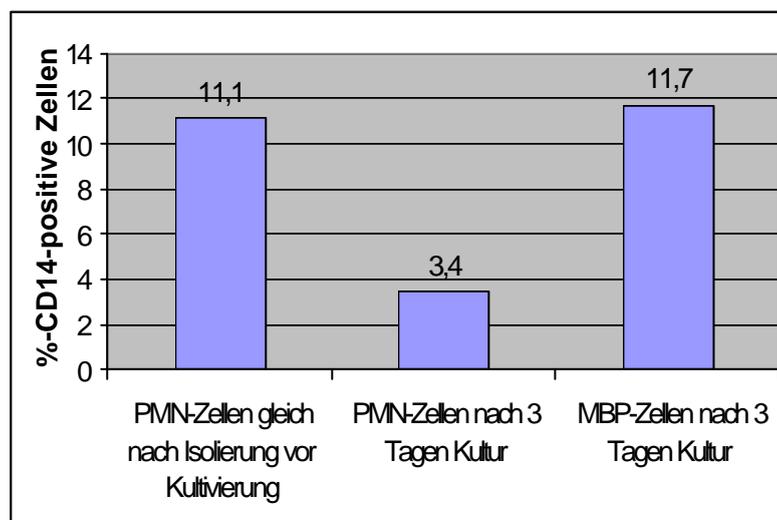


Abb.17: CD14-Expression: Vergleich zwischen PMN- und MBP-Zellen

Je nach Proband waren nach Ficoll-dichte-zentrifugation unterschiedliche Mengen an Monozyten vorhanden, nämlich zwischen 7 und 15%. Bei diesem Versuch waren 11,1% der isolierten Zellen CD14-positiv.

Nach einer 3-tägigen *in vitro* Kultivierung der PMN-Zellen waren nur noch 3,4% der Zellen CD14-positiv. Der Anteil der CD14-positiven Zellen direkt nach Entfernung der nicht adhären Zellen wurde nicht bestimmt, deren Anteil nach einer 3-tägigen Kultur von MBP-Zellen betrug jedoch 11,7%, d.h. durch diese Methode kam es zu einer Monozytenanreicherung mit einem Faktor von 3,5.

## 2. Lichtmikroskopische Analyse (siehe Anhang, Photo 1 - 4)

Bei den PMN-Zell-Kulturplatten waren deutlich mehr Zellen vorhanden. Bei der niedrigeren Auflösung (Photo 1) schienen die Zellen relativ homogen untereinander zu sein und waren relativ gleichmäßig verteilt. Bei der höheren Auflösung (Photo 2) waren sporadisch Zellen zu sehen, die eine unregelmäßigere Form und eine „Verklumpungstendenz“ besaßen.

Bei den MBP-Zell-Kulturplatten waren erheblich weniger Zellen vorhanden. Schon bei der niedrigeren Auflösung (Photo 3) konnte man erkennen, daß diese nicht gleichmäßig verteilt waren, sondern eine Aggregationstendenz und eine unregelmäßigere Form hatten.

Obwohl nach 3 Tagen *in vitro* Kultur der prozentuale Anteil an CD14-positiven Zellen abgenommen hatte, waren bei den MBP-Zellen tatsächlich mehr CD14-exprimierende Monozyten vorhanden.

## 4.5 Methodik zur Bestimmung der Oberflächenexpression vom TF bei den peripheren Blutmonozyten

### 4.5.1 Basaler und LPS-induzierter TF ohne Fc-Rezeptor-Block

#### Isolierung / Kultur

PMN- und MBP-Zellen wurden wie oben beschrieben isoliert (siehe 3.6.1) und entsprechend in Kultur A und B (siehe 3.6.2) angesetzt.

#### Vorbereitung für die FACS-Analyse

Vorbereitung nach Protokoll 1 (siehe 3.6.3.2)

#### Stimulation

Jeweils die Zellen der einen Platte von Kultur A (PMN-Zellen) und B (MBP-Zellen) wurden 4 h lang mit 1 µg/ml LPS stimuliert.

FACS-Analyse (wie unter 3.6.3.3 beschrieben)

#### Ergebnisse

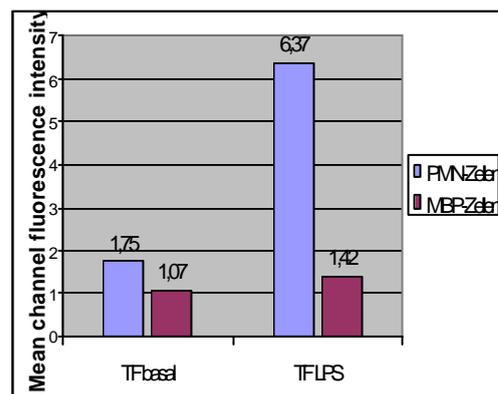
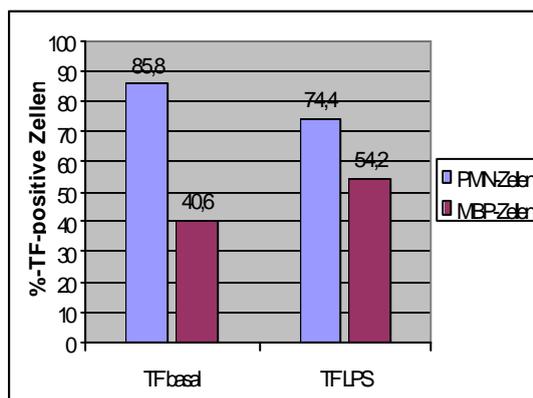


Abb.18 Basaler und LPS-induzierter TF ohne Fc-Rezeptor-Block

PMN-Zellen:

Nach 3-tägiger Kultur waren die CD14-positiven Zellen basal zu 85,8% TF-positiv, nach 4-stündiger LPS-Stimulation waren sogar weniger Monozyten TF-positiv (74,4%).

Dagegen nahm die MCFI für TF bei den CD14-positiven Zellen um einen Faktor von 3,7 zu.

MBP-Zellen:

Diese hatten eine relativ niedrigere basale TF-Expression (40,6%), diese nahm nach LPS-Stimulation um 13,6% (54,2%) zu. Die MCFI stieg um einen Faktor von 1,3 an.

#### 4.5.2 Basaler und LPS-induzierter TF mit Fc-Rezeptor-Block

##### Isolierung / Kultur

MBP-Zellen wurden wie beschrieben isoliert (siehe 3.6.1) und entsprechend 2 Tage lang in Kultur B (siehe 3.6.2) kultiviert.

##### Stimulation

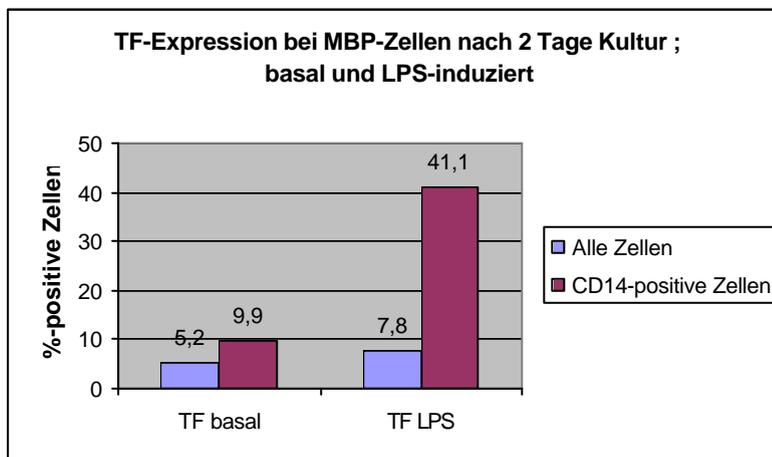
Die Zellen einer Platte wurden jeweils 4 h lang mit 1 µg/ml LPS stimuliert.

##### Vorbereitung für die FACS-Analyse

Vorbereitung nach Protokoll 2 (siehe 3.6.3.2)

FACS-Analyse (wie unter 3.6.3.3 beschrieben)

##### Ergebnisse



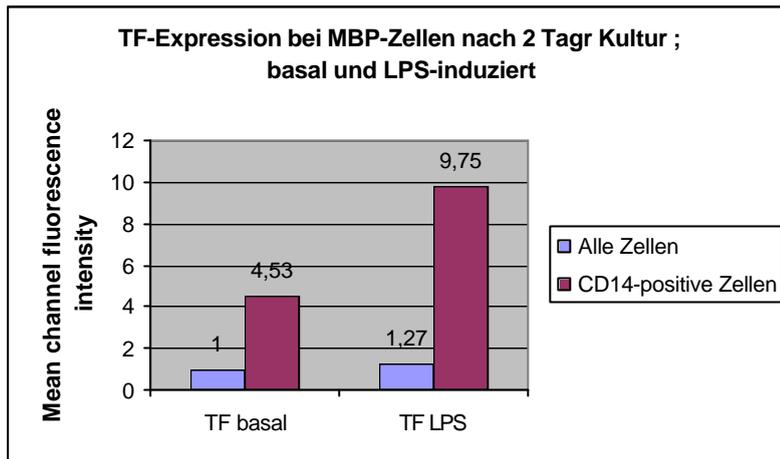


Abb. 19 Basale und LPS-induzierte TF-Expression mit Fc-Rezeptor-Block bei MBP-Zellen nach 2 Tagen Kultur

Die basale TF-Expression bei den CD14-positiven Zellen betrug 10%. Nach einer 4-stündigen LPS-Stimulation stieg sie um 31,1% an (41,1%), die MCFI stieg um einen Faktor von 2,1 an.

#### 4.5.3 Vitalität der Zellen und basaler TF im Verlauf der in vitro-Kultur

##### *Isolierung / Kultur*

MBP-Zellen wurden wie beschrieben isoliert (siehe 3.6.1) und entsprechend 3 Tage lang in Kultur B (siehe 3.6.2) gesetzt.

*Vitalitätsprüfung* (wie unter 3.5.4 beschrieben)

##### *Vorbereitung für die FACS-Analyse*

Nach Protokoll 2 (wie unter 3.6.3.2 beschrieben)

*FACS-Analyse* (wie unter 3.6.3.3 beschrieben)

## Ergebnisse

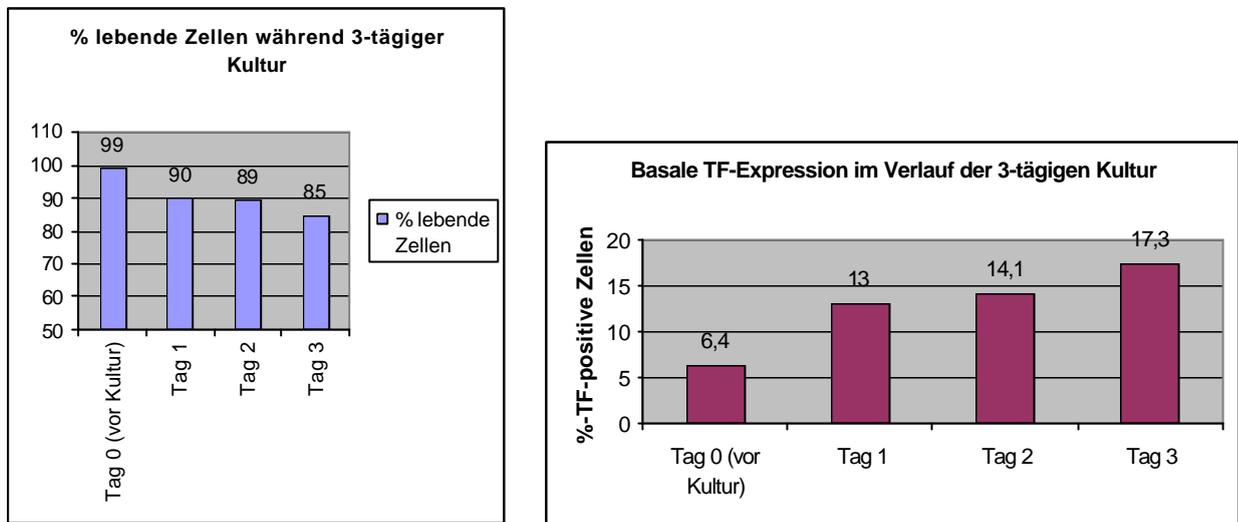


Abb. 20 Vitalität und basale TF-Expression im Verlauf der *In vitro*-Kultur

Gleich nach der Ficoll-Dichtezentrifugation und einigen Waschschritten waren 16,4% der Zellen CD14-positiv. Fast alle lebten und waren mit dieser Bestimmungsmethode zu ca. 6% TF-positiv.

Bei diesem Versuch wurden diese Parameter im Verlauf einer 3-tägigen *in vitro*-Kultivierung dieser Zellen verfolgt, um den günstigsten Moment für die Stimulationen herauszufinden.

Der Unterschied zwischen 24 h und 48 h Kultur bezüglich der Lebendigkeit der Zellen und basaler TF-Expression war minimal (LF:90-89 %; TF:13-14 %). Nach 72 h war der Anteil der toten Zellen etwas höher (15 %) und die basale TF-Expression etwas stärker (17 %).

### 4.5.4 LPS-Empfindlichkeit der Zellen im Verlauf der Kultur

#### *Isolierung / Kultur*

PMN-Zellen wurden wie beschrieben isoliert und MBP-Zellen wurden in Kultur gesetzt (Anm.: Für den ersten Teil des Versuches wurden PMN-Zellen gleich nach Isolierung für die Dauer der Stimulation mit LPS in hydrophoben Platten in Kultur gesetzt; MBP-Zellen wurden wie in 3.6.2 beschrieben kultiviert und erst nach 2 Tagen stimuliert).

#### *Vorbereitung für die FACS-Analyse*

Nach Protokoll 3 (wie unter 3.6.3.2 beschrieben)

#### *Ergebnisse*

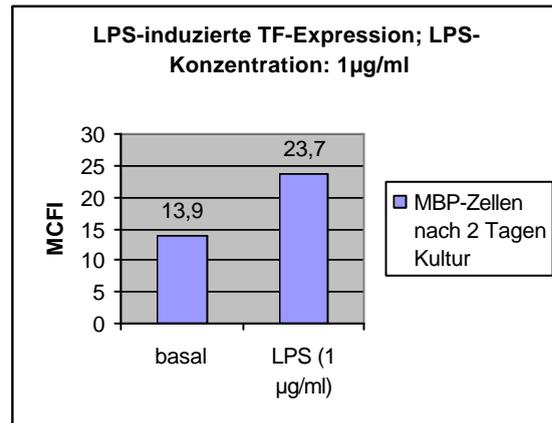
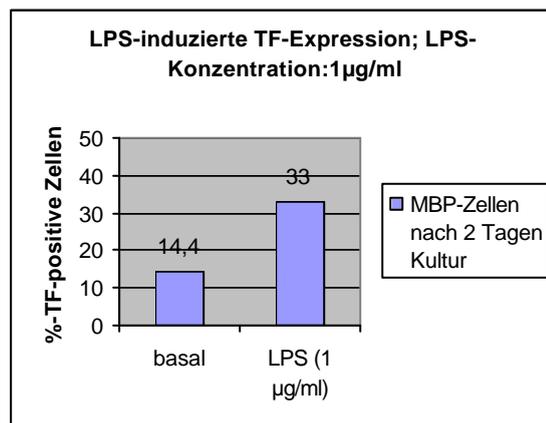
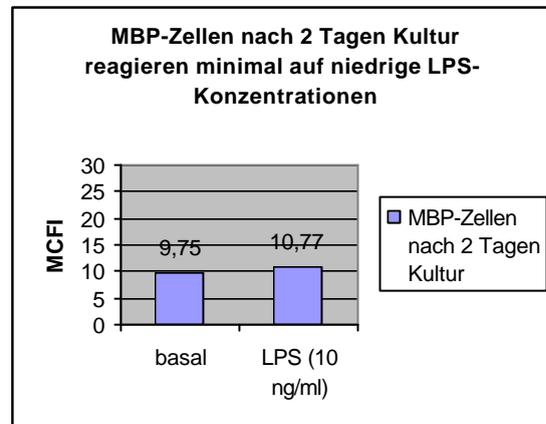
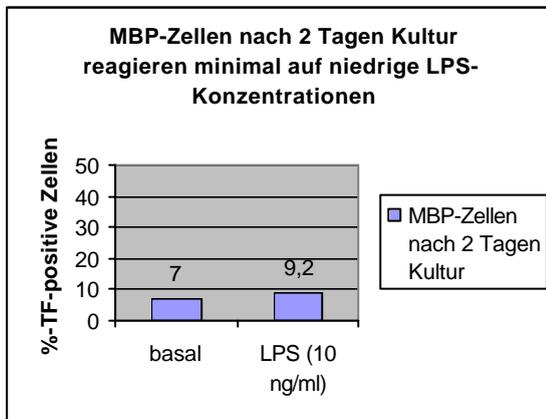
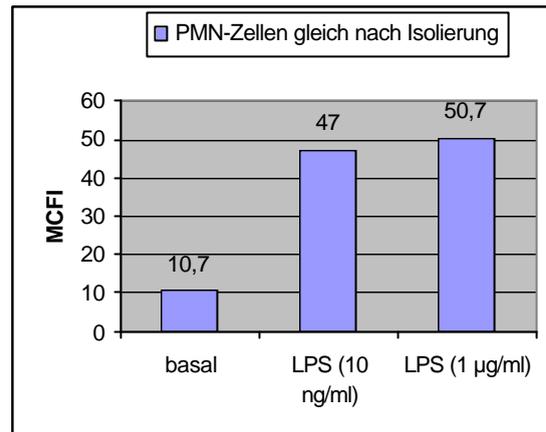
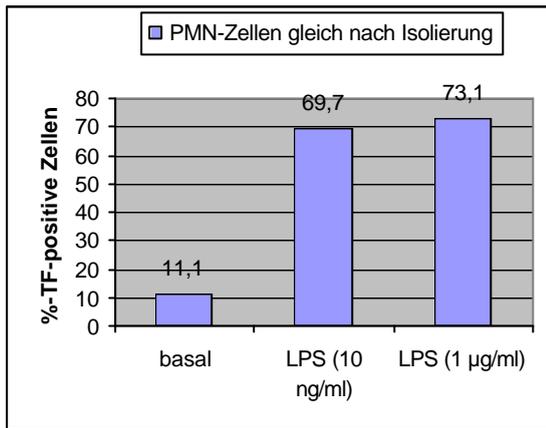


Abb. 21 LPS-Empfindlichkeit der PMN- und MBP-Zellen im Verlauf der *in vitro*-Kultur

Die PMN-Zellen, die sofort nach Isolierung stimuliert wurden, waren sehr LPS-empfindlich. Nach einer 5-stündigen Inkubation mit 10 ng/ml LPS waren 58,6% mehr Monozyten TF-positiv (Anstieg von basal 11,1% auf 69,7%), die mittlere Kanalfluoreszenz nahm um einen Faktor von 4,4 zu.

Nach einer 5-stündigen Inkubation mit 1 µg/ml LPS waren 62% mehr Monozyten TF-positiv (Anstieg von basal 11,1% auf 73,1%), die mittlere Kanalfluoreszenz nahm um einen Faktor von 4,7 zu.

Die MBP-Zellen, die 2 Tage lang kultiviert wurden und erst dann mit LPS stimuliert wurden reagierten deutlich schwächer auf LPS.

Nach einer 5-stündigen Inkubation mit 10ng/ml LPS waren nur 2,2% mehr Monozyten TF-positiv (Anstieg von basal 7% auf 9,2%), die mittlere Kanalfluoreszenz nahm um einen Faktor von 1,1 zu.

Eine Erhöhung der LPS-Konzentration auf 1µg/ml führte aber auch bei diesen Zellen zu einer deutlichen Zunahme der TF-Expression. Es waren nach Stimulation 18,6% mehr Monozyten TF-positiv (Anstieg von basal 14,4% auf 33%), die mittlere Kanalfluoreszenz nahm um einen Faktor von 1,7 zu.

#### 4.6 Methodik zur Bestimmung der Oberflächenexpression vom TF bei MM6-Zellen

##### 4.6.1 Basale TF-Expression; Bedeutung der Blockierung von Fc-Rezeptoren

###### *Zellen*

Exponentiell wachsende MM6-Zellen wurden am 3. Tag ihrer Kultur gesplittet.

*Methodik* (siehe 3.5.6.2, Bestimmung von TF an lebenden Zellen mit oder ohne Blockierung von Fc-Rezeptoren)

###### *Ergebnisse*

Durchschnittlich 74% aller registrierten Ereignisse wurden bei der FSC/SSC-Darstellung im gate A eingegrenzt.

Mit Fc-Rezeptor-Block :

Probe 1 : IgG-FITC

Probe 2 : TF-FITC

Ohne Fc-Rezeptor-Block :

Probe 3 : IgG-FITC

Probe 4 : TF-FITC

Signalstärken und gates wurden bei Probe 1 eingestellt und dann nicht mehr verändert.

	<i>%-positive Zellen</i>	<i>MCFI</i>
Probe 1	0,8	0,371
Probe 2	22,4	1,56
Probe 3	6,8	0,674
Probe 4	64,6	2,18

Tab. 6: TF-Expression mit und ohne Fc-Rezeptor-Blockierung

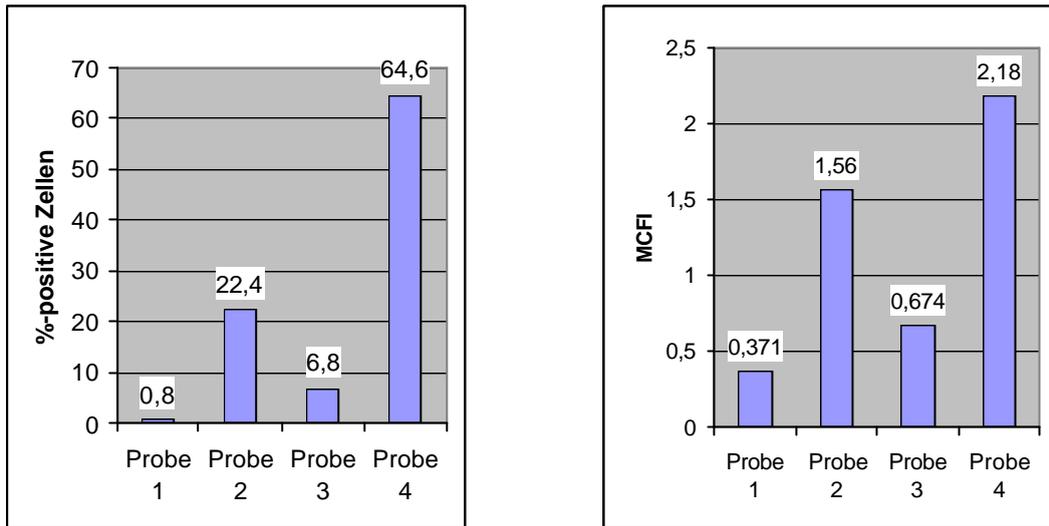


Abb. 26 Bedeutung der Fc-Rezeptor-Blockierung für die unspezifische Bindung und für das spezifische Signal; „% TF- positiv“ (*links*), MCFI (*rechts*)

Anhand des Parameters „%-positive Zellen“ nahm die unspezifische Bindung der Isotypkontrolle ohne Fc-Rezeptor-Blockierung um 6% zu. Die spezifische Bindung des Antikörpers für TF nahm um 42,2% zu.

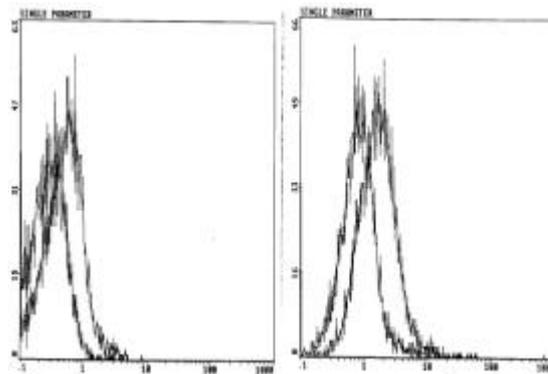


Abb. 27 zeigt anhand des Multigraph Overlay Reports die graphische Überlagerung der 2 Isotypkontrollen (*links*) und die graphische Überlagerung der spezifischen AK-Bindungen (*rechts*); linke Kurve jeweils mit Fc-Block und rechte Kurve ohne Fc-Block.

Es wird deutlich, daß die MM6-Zellen schon im unstimulierten Zustand signifikante Mengen an Fc-Rezeptoren produzieren, die sowohl die unspezifische als auch die spezifische Bindung für TF beeinflussen. Da sich die Expression dieser Rezeptoren besonders im Rahmen von Stimulierungen der Zellen stark erhöht, ist es sinnvoll, diese vor Zugabe der spezifischen Antikörper zu blockieren und damit die unspezifische Bindung zu reduzieren.

#### 4.6.2 Vergleich von Gesamtpopulation und CD14-positiven Zellen im Hinblick auf die basale TF-Expression

##### Zellen

Exponentiell wachsende MM6-Zellen wurden am 3. Tag ihrer Kultur gesplittet.

*Methodik* (siehe 3.5.6.2, Bestimmung von TF an lebenden Zellen mit Blockierung von Fc-Rezeptoren, gleichzeitige 2-parametrische TF- und CD14-Bestimmung)

##### Ergebnisse

Bei der FSC/SSC-Darstellung wurden die MM6-Zellen wie gewöhnlich in gate A eingegrenzt (75% aller registrierten Ereignisse), diese Zellen wurden im Hinblick auf ihre CD14-Expression untersucht (Abb. 28). 70,1% der Zellen in gate A waren CD14-positiv (= gate G = CD14+).

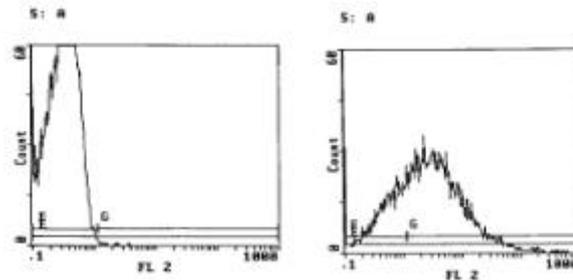


Abb. 28 Isotypkontrolle (*links*); spezifische Bindung für CD14 (*rechts*)

Die TF-Expression der Gesamtpopulation (gate A, siehe Abb. 29) und der CD14-positiven Zellen (gate G siehe Abb. 29) wurde untersucht.

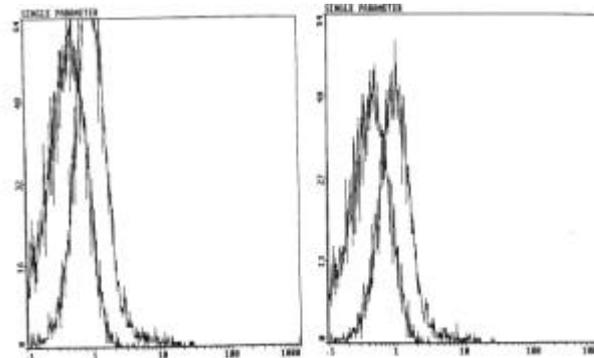


Abb. 29 TF-Expression der Gesamtpopulation (*links*) im Vergleich zu den CD14-positiven MM6-Zellen (*rechts*).

Der Parameter „% positive Zellen“ war bei beiden Gruppen identisch und betrug für TF 11,6%. Die „mean channel fluorescence intensity“ für den 1. Kanal (TF) war für die CD14-positiven Zellen um einen Faktor von 1,072 höher (1,94 vs. 1,81). Abb. 30 zeigt die graphische Überlagerung des Signals für TF bei den beiden Gruppen.

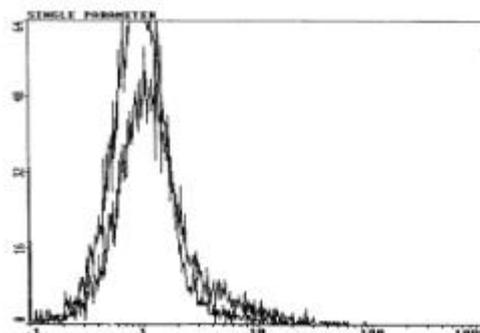


Abb. 30 Multigraph Overlay Report, spezifisches Signal für TF bei der Gesamtpopulation und bei den CD14-positiven MM6-Zellen

## V Ergebnisse Calcitriol

### 5.1 MM6-Zellen

#### 5.1.1 Einfluß von Calcitriol auf die CD14-Expression

##### Zellen

Exponentiell wachsende MM6-Zellen wurden am 3. Tag ihrer Kultur gesplittet. Sie wurden dann 48 h mit oder ohne Calcitriol (40 ng/ml) in 24 well plates wie in 3.5.1 beschrieben kultiviert.

*Methodik* (siehe 3.5.6; Bestimmung von CD14 an lebenden Zellen)

##### Ergebnisse

In der FSC/SSC-Darstellung wurden die MM6-Zellen als relativ homogene Population erkannt und eingegrenzt (gate A), wobei sich in diesem gate zwischen 70 und 80 % aller registrierten Ereignisse befanden (Abb. 22).

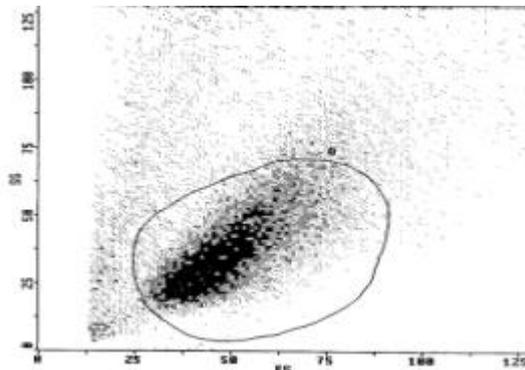


Abb. 22 Erscheinungsform der MM6-Zellen in der FSC/SSC-Darstellung

<i>%CD14-positive Zellen</i>	<i>Basal</i>	<i>Calcitriol</i>	<i>MCFI</i>	<i>basal</i>	<i>Calcitriol</i>
Versuch 1	89,5	97,6	11,24	75,13	
Versuch 2	88,6	97,5	10	70,93	
Versuch 3	85,4	94,8	10,48	77,06	
Versuch 4	85,3	97,4	10,04	75,11	
Versuch 5	88,5	98,5	7,93	68,1	
Versuch 6	89,3	98,1	8,94	73,4	
MW	87,8	97,3	9,8	73,3	
SD	1,9	1,3	1,2	3,3	

Tab. 5 CD14-Expression der MM6-Zellen ohne und mit Calcitriol

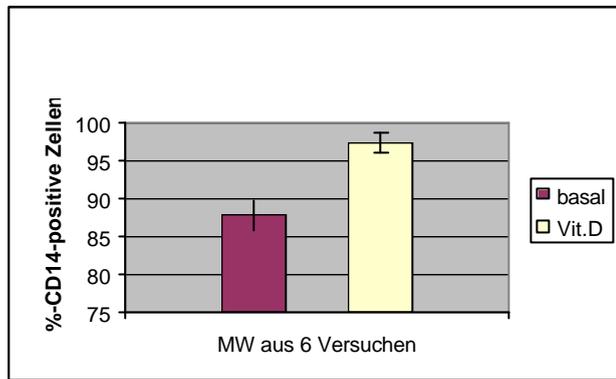


Abb. 23 Einfluß von Calcitriol auf die CD14-Expression der MM6-Zellen (%)

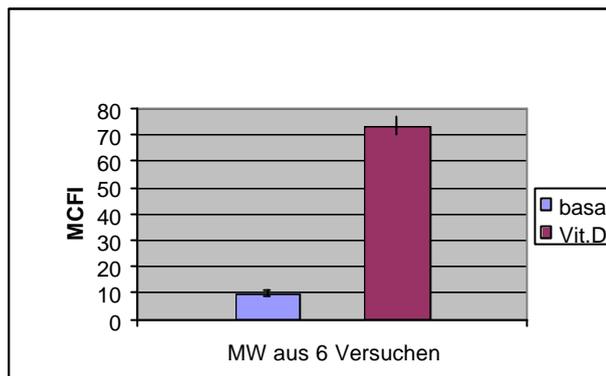


Abb. 24 Einfluß von Calcitriol auf die CD14-Expression der MM6-Zellen (MCFI)

Die MM6-Zellen waren basal durchschnittlich zu 87,8 % CD14-positiv. Nach 48 h Calcitriol-Behandlung waren sie zu 97,3 % CD14-positiv, d.h. 9,5 % mehr der registrierten Ereignisse waren positiv für CD14 (Abb. 23). Der Vit.D<sub>3</sub>-Effekt scheint anhand dieses Parameters relativ moderat zu sein, es liegt aber daran, daß schon konstitutiv die Zellen zu einem hohen Prozentzahl CD14 exprimieren. Anhand des Parameters „mean channel fluorescence intensity“ (MCFI) für CD14 (Abb. 24), der zusätzlich Auskunft über die Menge von CD14 pro registriertes Ereignis gibt, wird der Calcitriol-Effekt deutlicher (Zunahme um einen Faktor von 7,5,  $p < 0,03$ ).

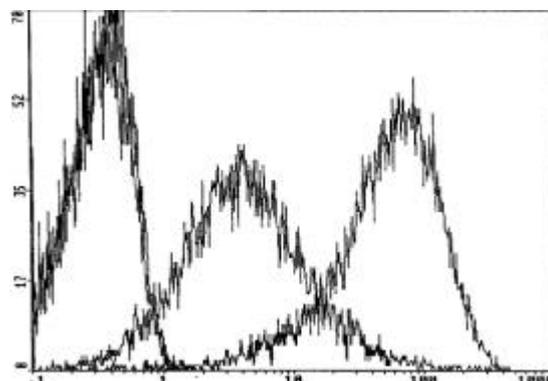


Abb. 25 zeigt anhand des Multigraph Overlay Reports die graphische Überlagerung von den 4 Proben eines repräsentativen Versuches. Die unspezifische Bindung, demonstriert anhand der Isotypkontrollen, ist für beide Zellgruppen fast identisch (2 überlagerte Kurven links). Die mittlere Kurve zeigt die konstitutive CD14- Expression der MM6- Zellen und die rechte Kurve die Calcitriol- induzierte CD14- Expression.

## 5.1.2 Einfluß von Calcitriol auf die basale und LPS-induzierte TF-Expression

### Zellen

Exponentiell wachsende MM6-Zellen wurden am 3. Tag ihrer Kultur gesplittet. Sie wurden dann mit und ohne 40 ng/ml  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  für 48 h in Kultur gesetzt. Die stimulierten Proben wurden mit 1 µg/ml LPS 5 h lang inkubiert.

*Methodik* (siehe 3.5.6.2, Bestimmung von TF an lebenden Zellen mit Blockierung von Fc-Rezeptoren, einzelparametrische TF- und CD14-Bestimmung)

### Ergebnisse

%TF-positive Zellen	Basal		LPS	
	Ohne Vit.D <sub>3</sub>	Mit Vit. D <sub>3</sub>	Ohne Vit. D <sub>3</sub>	Mit Vit. D <sub>3</sub>
Versuch 1	26,3	13,8	42,5	19,6
Versuch 2	29,2	11,6	40	19,9
Versuch 3	29,5	14,3	38,8	19
Versuch 4	28,6	12,3	38,3	19,4
Versuch 5	28,2	13,5	38,8	18
Versuch 6	29,3	14,4	37	19,2
Versuch 7	17,3	12,4	25,7	22,9
Versuch 8	16,2	11,7	27	17,8
Versuch 9	16,8	8,9	26,4	16,4
MW	24,6	12,5	34,9	19,1
SD	5,95	1,73	6,6	1,8

Tab. 7 Einfluß von Vit. D<sub>3</sub> auf die TF-Expression der MM6-Zellen

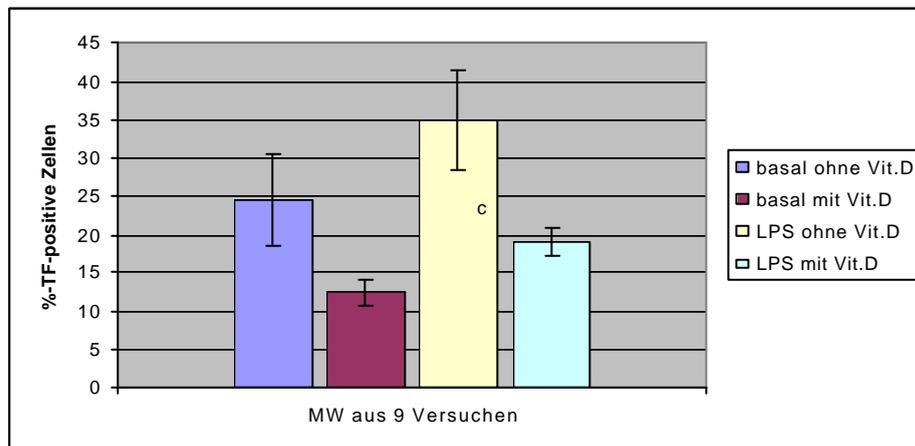


Abb. 31 Vit. D<sub>3</sub>-Einfluß auf die basale und LPS-induzierte TF-Expression der MM6-Zellen

Die MM6-Zellen waren im basalen Zustand durchschnittlich zu 24,6 % TF-positiv. Eine 48-stündige Inkubation mit 40 ng/ml Calcitriol senkte die basale TF-Expression um über 50 % (durchschnittlich zu 12,5 % TF-positiv;  $p=0,008$ ).

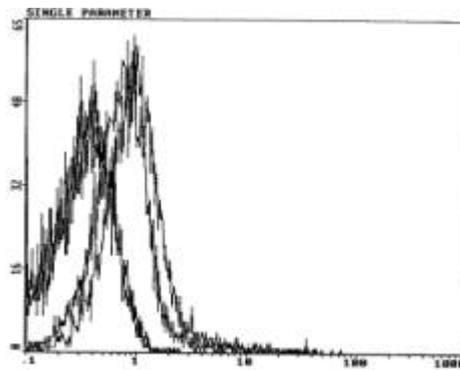


Abb. 32 zeigt anhand des Multigraph Overlay Reports die graphische Überlagerung der 2 Isotypkontrollen (links), die basale TF-Expression der Vit. D<sub>3</sub>-behandelten (mittlere Kurve) und der nicht behandelten MM6-Zellen (rechte Kurve).

Eine 5-stündige Stimulation mit 1 µg/ml LPS förderte die TF-Expression, bei den nicht mit Calcitriol behandelten Zellen von basal 24,6% auf 34,9% (ein Anstieg bezogen auf den Basalwert von 41,9% ; p=0,008) und bei den Zellen, die mit Calcitriol behandelt wurden, von basal 12,5% auf 19,1% (ein Anstieg von 52,8%; p=0,008).

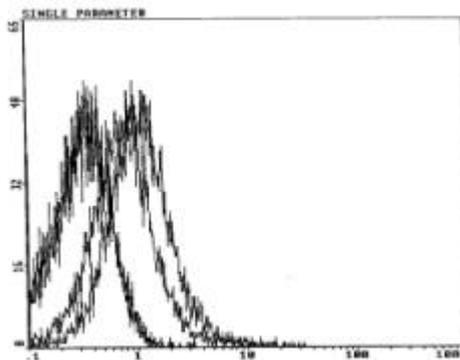


Abb. 33 zeigt die graphische Überlagerung der 2 Isotypkontrollen (links), die LPS-induzierte TF-Expression der Vit.D<sub>3</sub>-behandelten (mittlere Kurve) und der nicht behandelten MM6-Zellen (rechte Kurve).

### 5.1.3 LPS-Empfindlichkeit der Zellen unter Calcitriol bezüglich TNF $\alpha$ -Produktion

#### Zellen

Exponentiell wachsende MM6-Zellen wurden am 3. Tag ihrer Kultur gesplittet. Sie wurden dann mit und ohne 40 ng/ml 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> für 48 h in Kultur gesetzt. Die stimulierten Proben wurden mit 1 µg/ml LPS 5 h lang inkubiert.

*Methodik* (siehe 3.8)

#### Ergebnisse

	V1	V2	V3	MW	SD
Basal	0	0	11	0	1,8
LPS ohne Vit.D	100	95	89	97	103
LPS mit Vit.D	138	144	121	147	128

Tab.8 Einfluß von Calcitriol auf die TNF $\alpha$ -Produktion der MM6-Zellen

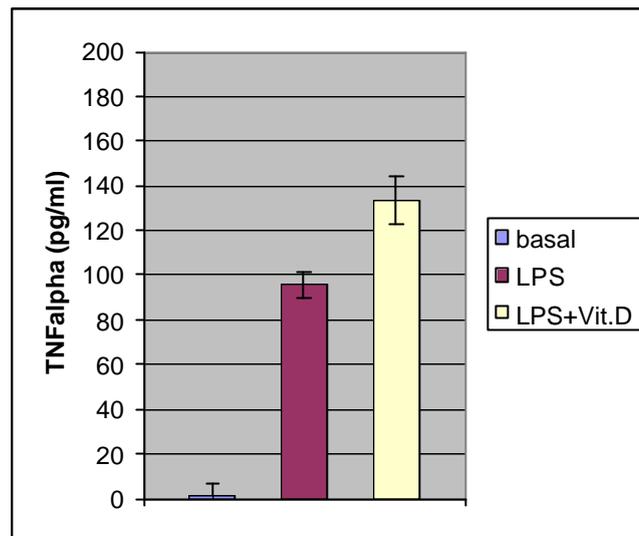


Abb. 34 Basale und LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Produktion bei den MM6-Zellen. Einfluß von Calcitriol.

Die MM6-Zellen produzierten im basalen Zustand minimale Mengen an TNF $\alpha$  (1,8 +/-4 pg/ml). Unter Calcitriol war die spontane TNF $\alpha$ -Freisetzung etwas höher (12,3 +/-13 pg/ml). LPS führte sowohl bei den mit Vit.D<sub>3</sub> als auch bei den nicht mit Vit.D<sub>3</sub>-behandelten MM6-Zellen zu einem Anstieg der TNF $\alpha$ -Produktion, wobei unter Vit.D<sub>3</sub> der TNF $\alpha$ -Spiegel signifikant höher war (133,7 +/-10,9 pg/ml vs. 95,7 +/- 5 pg/ml, p<0,03).

## 5.2 THP-1-Zellen

### 5.2.1 Einfluß von Calcitriol auf die CD14-Expression

#### Zellen

Exponentiell wachsende THP-1-Zellen wurden am 3. Tag ihrer Kultur gesplittet. Sie wurden dann 48 h mit oder ohne Calcitriol (40 ng/ml) in 24 well plates wie beschrieben kultiviert.

*Methodik* (siehe 3.5.6.2)

#### Ergebnisse

In der FSC/SSC-Darstellung wurden die THP-1-Zellen als relativ homogene Population erkannt und eingegrenzt (gate A), wobei sich in diesem gate zwischen 60 und 70 % aller registrierten Ereignisse befanden (Abb. 35).

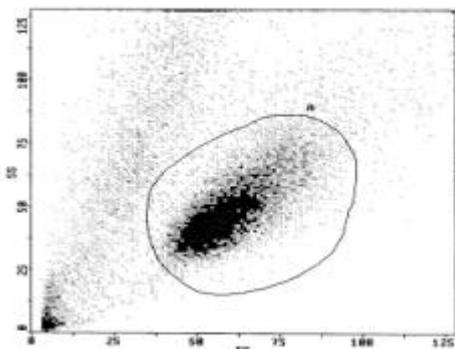


Abb. 35 Erscheinungsform der THP-1-Zellen in der FSC/SSC-Darstellung

%CD14-positive Zellen	basal	Calcitriol	MCFI	basal	Calcitriol
Versuch 1	35	93,9	1,245	31,7	
Versuch 2	33,3	94,3	1,339	31,5	
Versuch 3	31,7	95,1	1,263	30,67	
Versuch 4	32,9	94,8	1,158	32	
MW	33,23	94,53	1,251	31,47	
SD	1,4	0,5	0,07	0,57	

Tab. 9 Einfluß von Calcitriol auf die CD14-Expression der THP-1-Zellen

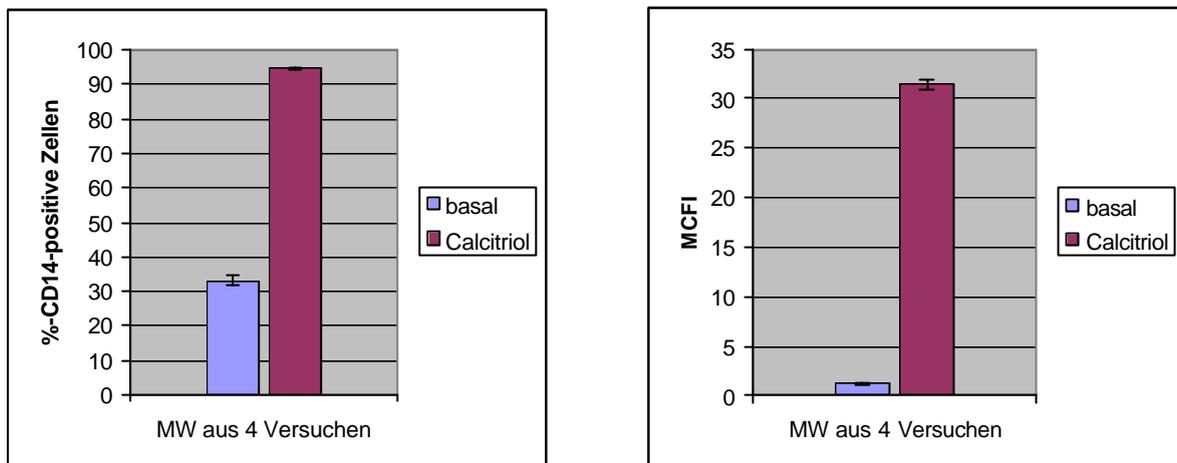


Abb. 36 Calcitriol-Einfluß auf die CD14-Expression der THP-1-Zellen

Die THP-1-Zellen waren basal durchschnittlich zu 33,2 % positiv für CD14. Eine 48-stündige Calcitriolbehandlung erhöhte die CD14-Expression stark. Durchschnittlich 94,5 % der Zellen waren CD14-positiv und die „mean channel fluorescence intensity“ nahm um einen Faktor von 25,2 zu.

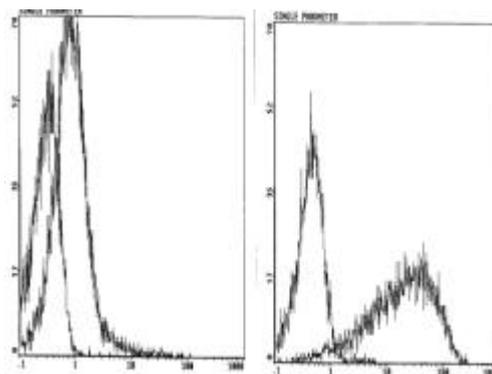


Abb. 37 Links: basale CD14-Expression; Rechts: Calcitriol-induzierte CD14-Expression (die linke Kurve entspricht jeweils der unspezifischen Bindung und die rechte Kurve dem spezifischen Signal für CD14)

## 5.2.2 Einfluß von Calcitriol auf die basale und LPS-induzierte TF-Expression

### Zellen

Exponentiell wachsende THP-1-Zellen wurden am 3. Tag ihrer Kultur gesplittet. Sie wurden dann mit und ohne 40 ng/ml  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  48 h lang in Kultur gesetzt. Die stimulierten Proben wurden mit 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS über 5 h inkubiert.

*Methodik* (siehe 3.5.6.2, Bestimmung von TF an lebenden Zellen mit Blockierung von Fc-Rezeptoren, einzelparametrische TF- und CD14-Bestimmung)

### Ergebnisse

	basal		LPS	
Ohne Vit.D <sub>3</sub>	%-TF-positiv	MCFI X	%-TF-positiv	MCFI X
Versuch 1	11,7	0,503	18	0,554
Versuch 2	13,5	0,569	17,1	0,599
Versuch 3	12,2	0,531	17	0,577
Versuch 4	12,3	0,585	17,7	0,798
Versuch 5	9,9	0,665	16,8	0,726
Versuch 6	13,4	0,642	18,7	0,801
Versuch 7	7	0,488	9,3	0,682
MW	11,43	0,57	16,37	0,67
SD	2,3	0,07	3,19	0,1
Mit Vit. D <sub>3</sub>	%-TF-positiv	MCFI X	%-TF-positiv	MCFI X
Versuch 1	6,6	0,484	8,4	0,652
Versuch 2	5,3	0,313	8,7	0,566
Versuch 3	5,4	0,399	7,8	0,516
Versuch 4	5,3	0,449	8,7	0,596
Versuch 5	5,5	0,644	5,7	0,65
Versuch 6	6,6	0,576	7,6	0,681
Versuch 7	4,1	0,626	5,3	0,585
MW	5,54	0,5	7,46	0,59
SD	0,86	0,12	1,41	0,06

Tab. 10 Einfluß von Calcitriol auf die TF-Expression der THP-1-Zellen

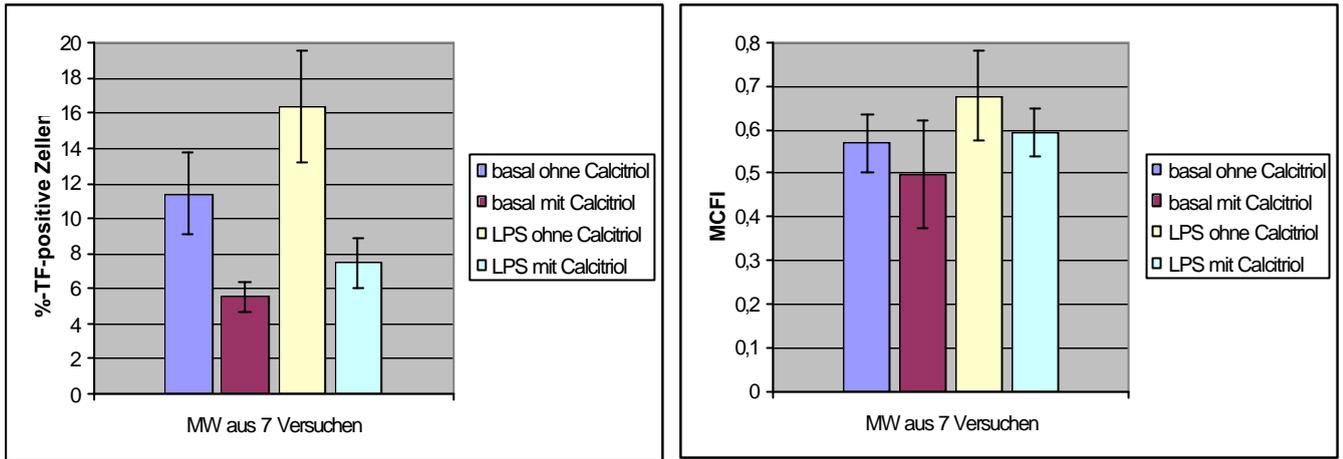


Abb. 38 Vit.D<sub>3</sub>-Einfluß auf die basale und LPS-induzierte TF-Expression der THP-1-Zellen

Die THP-1-Zellen waren basal durchschnittlich zu 11,43 % TF-positiv (MCFI X: 0,569). Eine 48 h-ige Inkubation mit 40 ng/ml Calcitriol senkte die basale TF-Expression anhand des Parameters „%-TF- positiv“ um 51,5 % (p=0,018) und anhand des Parameters MCFI um 12,3 % (nicht signifikant).

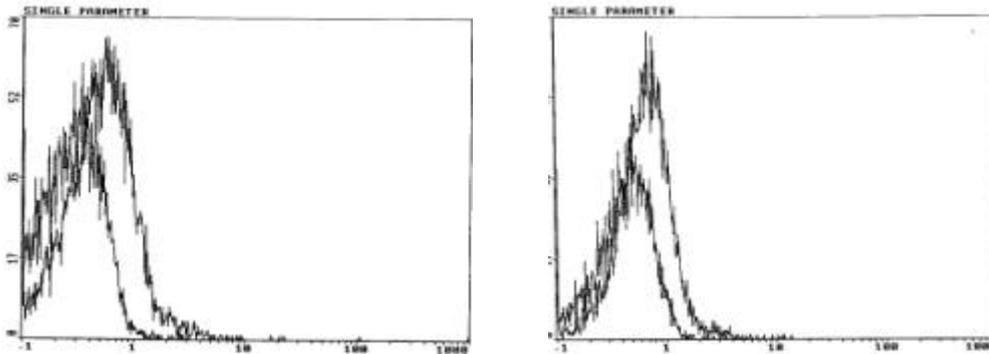


Abb. 39 zeigt die basale TF-Expression der THP-1-Zellen (*links*) und die basale TF-Expression der gleichen Zellen unter Calcitriol-Behandlung (*rechts*) (die linke Kurve entspricht jeweils der unspezifischen Bindung und die rechte dem spezifischen Signal für TF)

In der FSC/SSC-Darstellung hatten die Vit.D<sub>3</sub>-behandelten Zellen auch eine unterschiedliche Erscheinungsform.

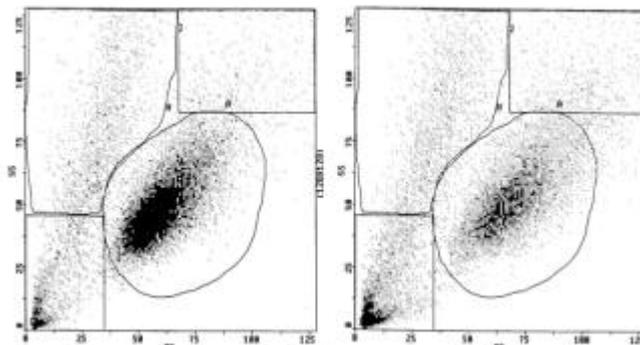


Abb. 40 zeigt die entsprechende Verteilung der THP-1-Zellen ohne und mit Calcitriol. Die Einstellungen am Durchflußzytometer und die gate-Setzung bei der Software sind identisch

<i>Prozentuelle Verteilung der THP-1-Zellen in den oben gezeigten gates</i>	<i>Ohne Calcitriol</i>	<i>Mit Calcitriol</i>
Gate A	74,3 %	55 %
Gate J	12,3 %	14,6 %
Gate H	4,2 %	7,2 %
Gate I	8,5 %	21,3 %

Tab. 11 Einfluß von Vit.D<sub>3</sub> auf die Erscheinungsform der THP-1-Zellen in der FSC/SSC-Darstellung

Calcitriol führt also zu einer Abnahme der Zellen, die sich in gate A befinden, wo sie als relativ homogene Population zu erkennen sind. Es gibt mehr Zellen bzw. Ereignisse, die größer, kleiner, mehr oder weniger granuliert sind. Auch die Lage der Zellen in gate A hat sich verändert.

<i>Gate A</i>	<i>Ohne Calcitriol</i>	<i>Mit Calcitriol</i>
MCFI X	60,9	69,5
MCFI Y	49,7	53,4

Tab. 12 Durchschnittliche MCFI der THP-1-Zellen in beiden Achsen; Einfluß von Vit.D<sub>3</sub>

Die THP-1-Zellen, die mit Vit.D<sub>3</sub> behandelt wurden, sind im Durchschnitt größer und granulierter. Dies könnte die erhöhte unspezifische Bindung dieser Zellen erklären.

Nach einer 5-stündigen Stimulation mit 1 µg/ml LPS waren die Zellen zu 16,37 % TF-positiv (MCFI: 0,677), d.h. LPS erhöhte die TF-Expression anhand des ersten Parameters um 43,22 % (p=0,018) und anhand des zweiten Parameters um 19 % (p=0,018).

Die Zellen, die mit Calcitriol behandelt wurden, waren zu 7,46 % TF-positiv (MCFI: 0,594), d.h. LPS erhöhte die TF-Expression anhand des ersten Parameters um 34,66 % (p=0,018) und anhand des zweiten Parameters um 19,1 % (p=0,043).

### 5.3 Periphere Blutmonozyten

MBP-Zellen wurden wie beschrieben isoliert (3.6.1) und in Kultur B (3.6.2) gesetzt. Danach erfolgte eine Vit.D<sub>3</sub>-Gabe (40 ng/ml) über 48 h und eine LPS-Stimulation mit 1 µg/ml LPS über 5 h. Die Zellen wurden nach Protokoll 3 (3.6.3.2) vorbereitet und anschließend am FACS analysiert. Die TNFα-Bestimmung wurde wie unter 3.8 beschrieben durchgeführt.

#### 5.3.1 Einfluß von Calcitriol auf die CD14-Expression

*Ergebnisse*

<i>MCFI</i>	<i>Ohne Vit.D<sub>3</sub></i>	<i>Mit Vit.D<sub>3</sub></i>
Versuch 1	246,8	450,3
Versuch 2	127,9	311,7
MW	187,4	381
SD	84,1	98

Tab. 13 Einfluß von Calcitriol auf die CD14-Expression der MBP-Zellen

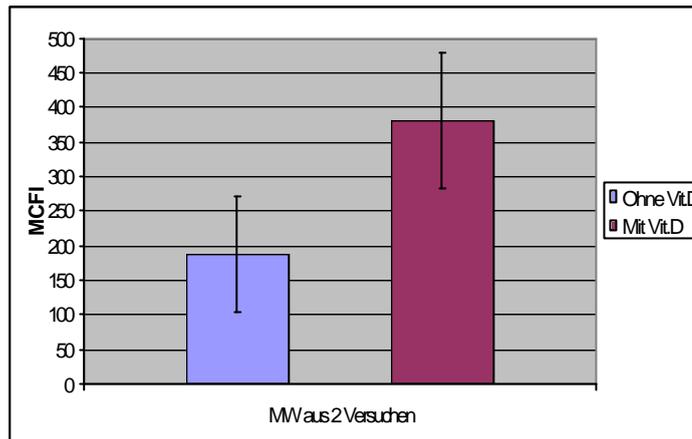


Abb. 41 Einfluß von Vit.D<sub>3</sub> auf die CD14-Expression der MBP-Zellen

Die peripheren Blutmonozyten wurden am Durchflußzytometer anhand ihres Oberflächenmerkmals CD14 als solche erkannt und weiter untersucht. Bei diesem Versuch wurde die Intensität (MCFI) gemessen, mit der die Monozyten mit oder ohne Calcitriol Vorbehandlung CD14 exprimierten. Diese betrug im Durchschnitt 187,4 und verdoppelte sich, ähnlich wie bei den Zelllinien, unter Vit.D<sub>3</sub>.

### 5.3.2 Einfluß von Calcitriol auf die basale und LPS-induzierte TF-Expression

#### Ergebnisse

%TF-positiv	Ohne Vit.D <sub>3</sub>		Mit Vit.D <sub>3</sub>		MCFI X	Ohne Vit.D <sub>3</sub>		Mit Vit.D <sub>3</sub>	
	basal	LPS	Basal	LPS		basal	LPS	basal	LPS
Versuch 1	14,4	27,9	8,4	4,8		13,9	23,7	11,4	16,8
Versuch 2	13,2	25,4	7,8	9,1		10,5	16,1	4,6	8,6
Versuch 3	4,1	30,6	8,1	6,2		3,9	8,5	4,6	3,8
Versuch 4	8,2	36,6				8,8	13,9		
Versuch 5	17,3	29,6				11,4	12,9		
Versuch 6	16,5	24				11,9	14,9		
MW	12,3	29	8,1	6,7		10,1	15	6,9	9,7
SD	5,1	4,5	0,3	2,2		3,4	5	3,9	6,6

Tab. 14 Einfluß von Calcitriol auf die basale und LPS-induzierte TF-Expression

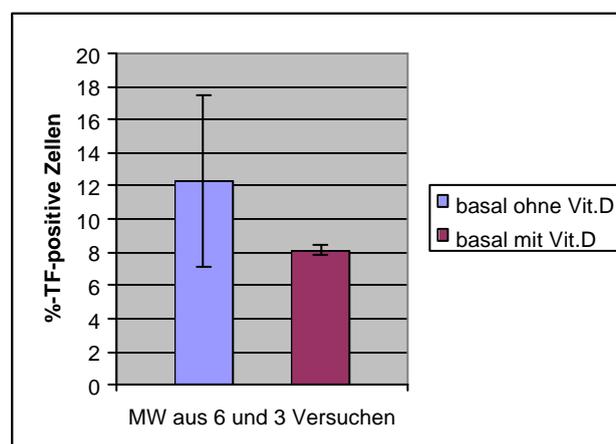


Abb. 42 Calcitriol erniedrigt die basale TF-Expression der PBM

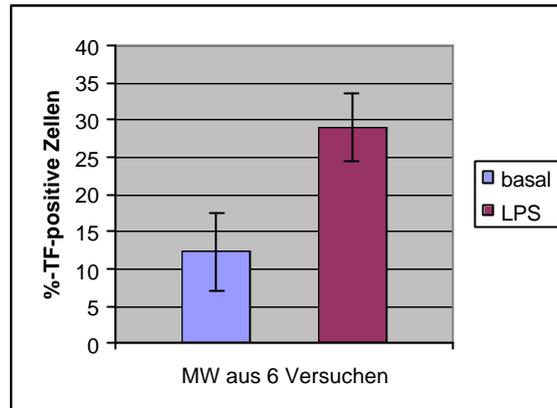


Abb. 43 LPS induziert die TF-Expression der PBM

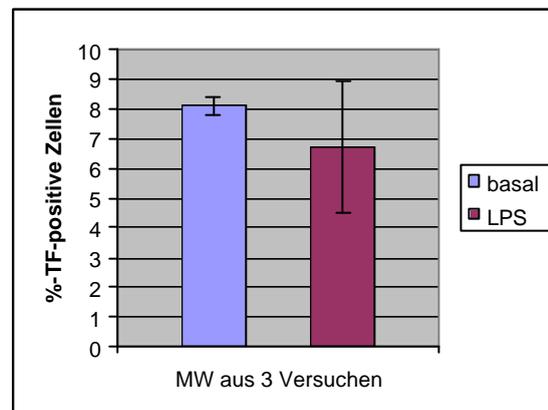


Abb. 44 Mit Vit.D<sub>3</sub> vorbehandelte PBM reagieren nicht auf LPS bezüglich der TF-Expression

Die MBP-Zellen waren basal zu 12,3 +/- 5 % TF-positiv und eine Stimulation mit LPS hat dessen Expression signifikant erhöht (29 +/- 5 %,  $p < 0,03$ ) (Abb. 42).

Eine Behandlung der Zellen mit Calcitriol hat die basale TF-Expression um 34 % (von 12,3 +/- 5 auf 8,1 +/- 0,3,  $n=3$ ) reduziert (Abb. 43).

Im Gegensatz dazu konnten die mit Calcitriol-behandelten MBP-Zellen nicht mehr auf LPS mit einer Erhöhung der TF-Expression reagieren (Abb. 44).

### 5.3.3 LPS-Empfindlichkeit der Zellen unter Calcitriol bezüglich der Produktion von TNF $\alpha$

#### Ergebnisse

	Basal mit Vit.D <sub>3</sub>	LPS mit Vit.D <sub>3</sub>	LPS ohne Vit.D <sub>3</sub>
Versuch 1	0	40	*
Versuch 2	8	19	377
Versuch 3	11	91	631
MW	6,3	50	504
SD	5,7	37	179,6

Tab. 15 Einfluß von Calcitriol auf die TNF $\alpha$ -Produktion der MBP-Zellen

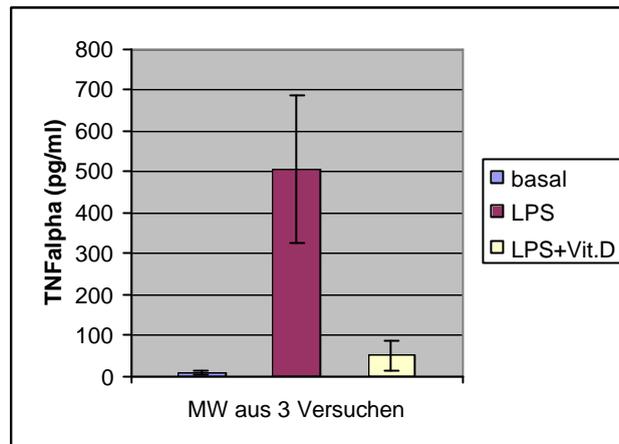


Abb. 45 Einfluß von Vit.D<sub>3</sub> auf die basale und LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Produktion der MBP-Zellen

Im Überstand von nicht stimulierten MBP-Zellen war bei allen 5 Versuchen TNF $\alpha$  nicht meßbar. Nach Stimulation mit LPS produzierten diese Zellen 485 +/- 300pg/ml ( $p < 0,03$ ) TNF $\alpha$ .

Bei den mit Vit.D<sub>3</sub>-behandelten MBP-Zellen waren niedrigere TNF $\alpha$ -Spiegel meßbar (6,3 +/- 5,7 pg/ml), und diese waren, ähnlich wie bei TF, mit LPS kaum zu erhöhen (50 +/- 37 pg/ml TNF $\alpha$ ).

## VI Ergebnisse 17 $\beta$ -Östradiol

### 6.1 MM6-Zellen

#### 6.1.1 Einfluß von E<sub>2</sub> auf die Proliferation

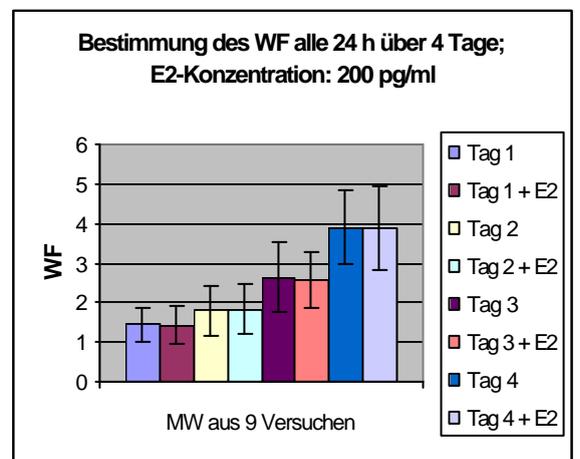
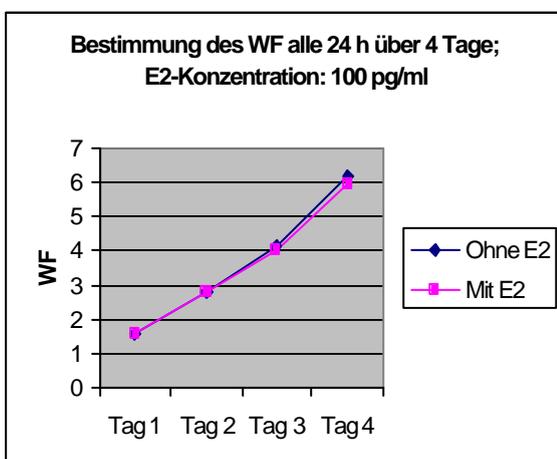
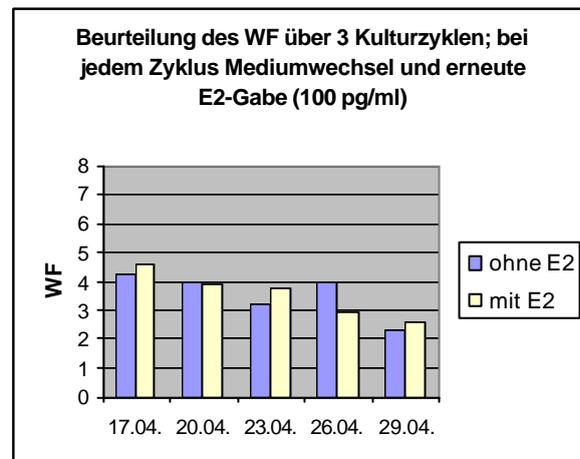
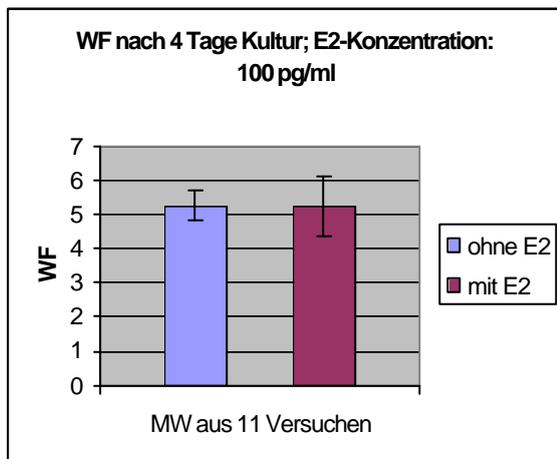
##### Zellen

Exponentiell wachsende MM6-Zellen wurden am 3. Tag ihrer Kultur gesplittet. Es wurde dann untersucht, ob das Vorhandensein von 17 $\beta$ -Östradiol in verschiedenen Konzentrationen im Kulturmedium der Zellen das Proliferationsverhalten der MM6-Zellen verändert. Dabei wurde je nach Versuchsansatz das Hormon einmalig beim Ansetzen der Kultur gegeben, oder das Medium wurde täglich erneuert, um einen konstanten Hormonspiegel aufrecht zu erhalten.

##### Methodik

Die Zellen wurden wie beschrieben kultiviert. Um das Proliferationsverhalten der Zellen zu beurteilen, wurde einerseits aus der Zellzahl der Zellen ihr Wachstumsfaktor errechnet (Zellzahl nach 3-4-tägiger Kultivierung / Zellzahl beim Kulturansatz), andererseits wurde mit und ohne E<sub>2</sub>-Zugabe eine DNS-Phasen-Analyse durchgeführt (3.7).

##### 6.1.1.1 Bestimmung des Wachstumsfaktors



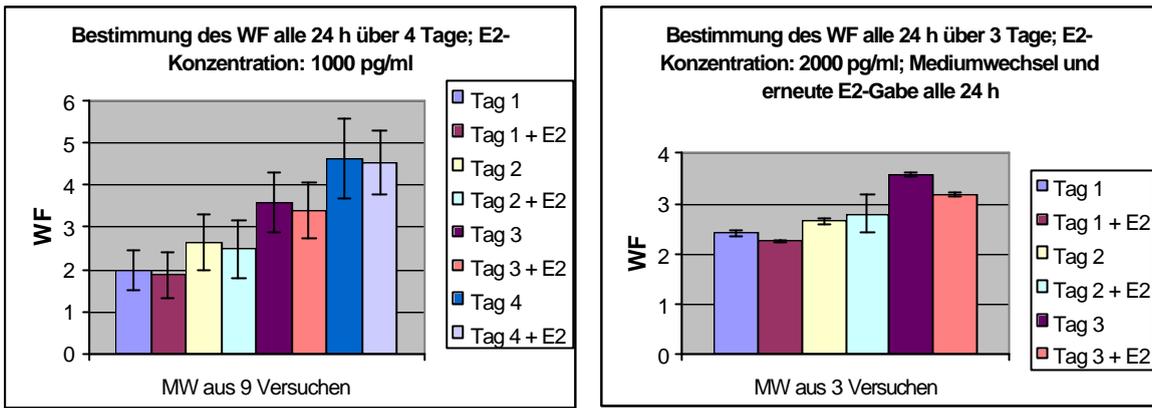


Abb. 46 Untersuchung des Einflusses von E<sub>2</sub> im Kulturmedium der MM6-Zellen auf ihr Proliferationsverhalten. Verschiedene Versuchsansätze.

Es erwies sich kein signifikanter Einfluß von E<sub>2</sub> auf den Wachstumsfaktor der MM6-Zellen.

### 6.1.1.2 DNS-Phasen-Analyse

Die Singlets wurden im FL3(Propidiumiodid)-AUX(FL3 PEAK)-Histogramm eingegrenzt und weiter analysiert.

24 h	G1-Phase	S-Phase	G <sub>2</sub> M-Phase	48 h	G1-Phase	S-Phase	G <sub>2</sub> M-Phase
∅ E <sub>2</sub>	32,9	9,5	31,7		33,7	10,9	31,5
⊕ E <sub>2</sub>	33,1	9,9	29,6		32,6	10,5	34,2

Tab. 16 Einfluß von E2 auf die DNS-Verteilung der MM6-Zellen

24h ohne und mit E<sub>2</sub>

48h ohne und mit E<sub>2</sub>

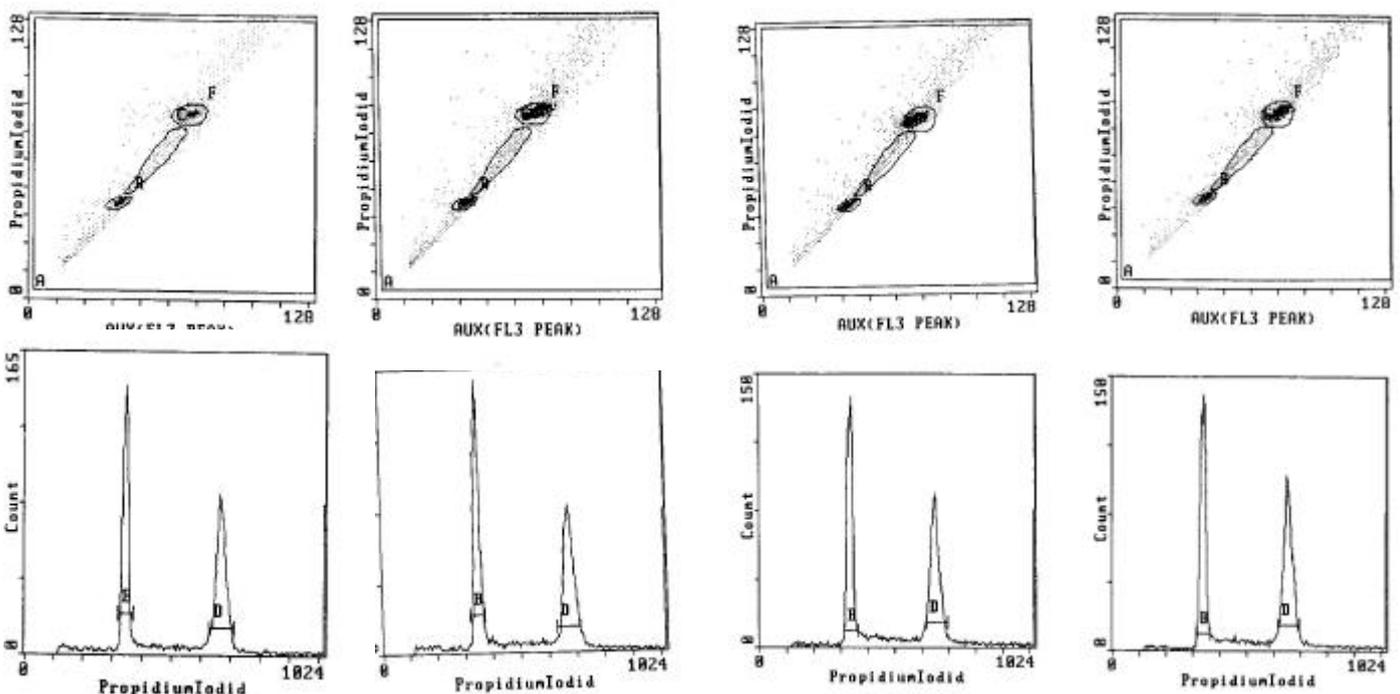


Abb. 47 DNS-Phasen- Analyse der MM6- Zellen nach 24 h und 48 h Kultur. Einfluß von E<sub>2</sub>

Das Vorhandensein von E<sub>2</sub> im Kulturmedium der Zellen beeinflusste deren DNS-Verteilungsmuster nicht.

### 6.1.2 Basale Oberflächenexpression von TF unter E<sub>2</sub>

#### Zellen

Exponentiell wachsende MM6-Zellen wurden am 3. Tag ihrer Kultur gesplittet. Sie wurden dann mit verschiedenen E<sub>2</sub>-Konzentrationen in Kultur gesetzt. Mit Calcitriol vorbehandelte Zellen wurden zusätzlich mit 40 ng/ml Calcitriol 48 h lang kultiviert.

*Methodik* (siehe 3.5.6, Bestimmung von TF an lebenden Zellen mit Blockierung von Fc-Rezeptoren, einzelparametrische TF-Bestimmung)

#### Ergebnisse:

Dargestellt sind die Ergebnisse bei Stimulation mit 1000 pg/ml E<sub>2</sub> über 24 h.

#### Ohne Calcitriol

%-TF-positive Zellen	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	MW	SD
Ohne E <sub>2</sub>	14,4	17,3	25,6	25,8	20,8	5,81
Mit E <sub>2</sub>	14,7	20,1	24,2	25,3	21,1	4,80
<b>MCFI</b>	<i>Versuch 1</i>	<i>Versuch 2</i>	<i>Versuch 3</i>	<i>Versuch 4</i>		
Ohne E <sub>2</sub>	0,665	1,197	1,32	1,34	1,1	0,32
Mit E <sub>2</sub>	0,76	1,086	1,37	0,87	1,0	0,27

#### Mit Calcitriol

%-TF-positive Zellen	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	MW	SD
Ohne E <sub>2</sub>	7,1	12,4	8,6	8,6	9,18	2,26
Mit E <sub>2</sub>	7,3	11,7	8,7	7,8	8,88	1,97
<b>MCFI</b>	<i>Versuch 1</i>	<i>Versuch 2</i>	<i>Versuch 3</i>	<i>Versuch 4</i>		
Ohne E <sub>2</sub>	0,558	0,935	1,02	0,94	0,86	0,21
Mit E <sub>2</sub>	0,443	0,891	0,87	1,02	0,81	0,25

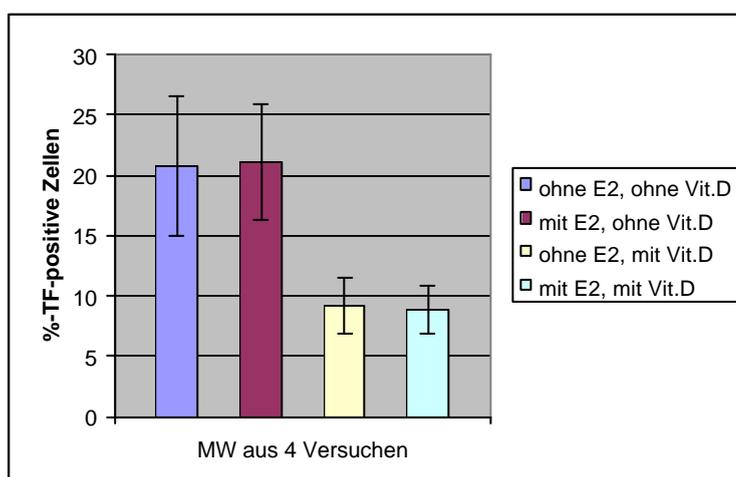


Abb. 48 E<sub>2</sub> hat keinen Einfluß auf die basale TF-Expression, unabhängig von Calcitriol

Die MM6-Zellen waren basal zu 20,8 % und diejenigen, die mit 1000 pg/ml E<sub>2</sub> vorinkubiert wurden, zu 21,1 % positiv für TF. Die Vit.D<sub>3</sub>-Vorbehandlung erniedrigte die basale TF-Expression um 50 %. Die Zellen waren zu 9,2 % TF-positiv, diejenigen, die mit E<sub>2</sub> präinkubiert wurden, zu 8,9 % TF-positiv.

Der Parameter „mean channel fluorescence intensity“ unterlag einer größeren Schwankung, zeigte aber auch keine signifikanten Unterschiede, d.h. die Präinkubation der Zellen mit 1000 pg/ml E<sub>2</sub> über 24 h beeinflusste die basale TF-Expression der Zellen nicht.

### 6.1.3 Einfluss von E<sub>2</sub> auf die LPS-induzierte TF-Expression

#### 6.1.3.1 Untersuchung der LPS-induzierten TF-Expression; Messung an lebenden Zellen; E<sub>2</sub>-Konzentrationen zwischen 500 und 1500 pg/ml

##### Zellen

Exponentiell wachsende MM6-Zellen wurden am 3. Tag ihrer Kultur gesplittet. Sie wurden dann 48 h lang mit oder ohne Calcitriol (40 ng/ml) und 24 h lang mit oder ohne 17β-Östradiol (500 bis 1500 pg/ml) wie beschrieben kultiviert. Die stimulierten Proben wurden über 5 h mit 1 µg/ml LPS inkubiert.

##### Methodik (s.o.)

##### Ergebnisse

%-TF-positive Zellen				
<i>Ohne Vit.D<sub>3</sub></i>	<i>Versuch 1</i>	<i>Versuch 2</i>	<i>MW</i>	<i>SD</i>
Basal	17,3	16,2	16,75	0,78
LPS	25,7	27	26,35	0,92
LPS+500 pg/ml E <sub>2</sub>	33,8	25,8	29,8	5,66
LPS+1000 pg/ml E <sub>2</sub>	37,7	24,7	31,2	9,19
LPS+1500 pg/ml E <sub>2</sub>	36,6	29,1	32,85	5,30

<u>MCFI</u>				
<i>Ohne Vit.D<sub>3</sub></i>	<i>Versuch 1</i>	<i>Versuch 2</i>	<i>MW</i>	<i>SD</i>
Basal	1,197	1,03	1,113	0,12
LPS	1,362	0,98	1,171	0,27
LPS+500 pg/ml E <sub>2</sub>	1,618	1,08	1,349	0,38
LPS+1000 pg/ml E <sub>2</sub>	1,723	0,9	1,312	0,58
LPS+1500 pg/ml E <sub>2</sub>	1,442	0,9	1,171	0,38

%-TF- positive Zellen					
<i>Mit Vit.D<sub>3</sub></i>	<i>Versuch 1</i>	<i>Versuch 2</i>	<i>Versuch 3</i>	<i>MW</i>	<i>SD</i>
Basal	12,4	11,7	8,9	11	1,85
LPS	22,9	17,8	16,4	19,03	3,42
LPS+500 pg/ml E <sub>2</sub>	25,4	24	17,7	22,37	4,10
LPS+1000 pg/ml E <sub>2</sub>	24,7	25,7	19,6	23,33	3,27
LPS+1500 pg/ml E <sub>2</sub>	23,1	24	15,2	20,78	4,84

<i>MCFI</i>					
<i>Mit Vit.D<sub>3</sub></i>	<i>Versuch 1</i>	<i>Versuch 2</i>	<i>Versuch 3</i>	<i>MW</i>	<i>SD</i>
Basal	0,935	1	0,762	0,899	0,12
LPS	1,177	1,09	0,806	1,024	0,19
LPS+500 pg/ml E <sub>2</sub>	1,306	1,11	0,941	1,119	0,18
LPS+1000 pg/ml E <sub>2</sub>	1,194	1,15	1,01	1,118	0,10
LPS+1500 pg/ml E <sub>2</sub>	1,211	0,98	0,904	1,032	0,16

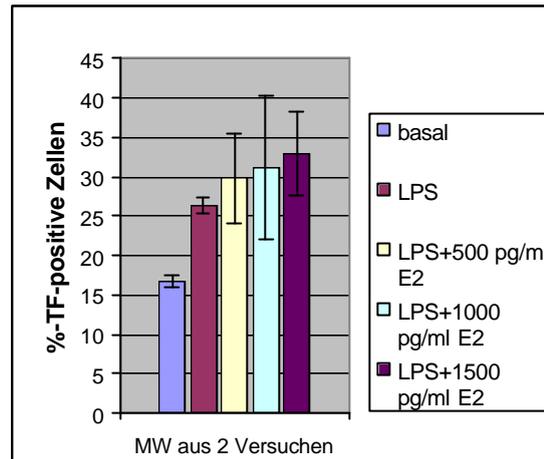


Abb. 49 E<sub>2</sub>-Effekt auf den durch LPS induzierten TF (ohne Calcitriol)

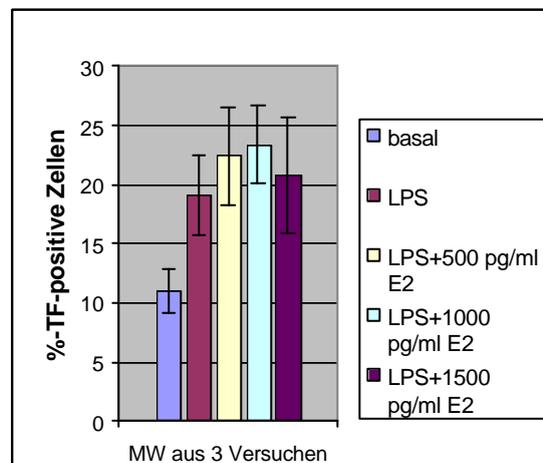


Abb. 50 E<sub>2</sub>-Effekt auf den durch LPS induzierten TF (mit Calcitriol)

Die MM6-Zellen waren bei diesen Versuchen basal zu 16,8 % positiv für TF (Abb. 51).

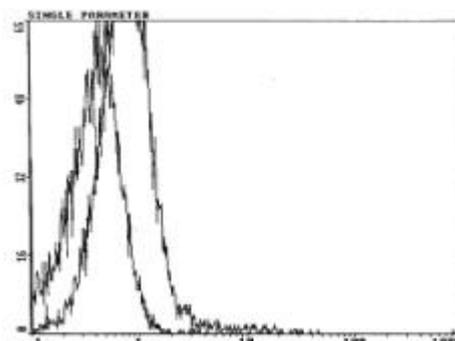


Abb. 51 Die linke Kurve entspricht der unspezifischen Bindung, die rechte dem spezifischen basalen Signal für TF

Eine 48-stündige Calcitriolbehandlung erniedrigte die TF-Expression bezogen auf den Basalwert um 34,5% (11%).

Eine 5-stündige Stimulation der MM6-Zellen mit 1 µg/ml LPS förderte die TF-Expression (Abb. 52).

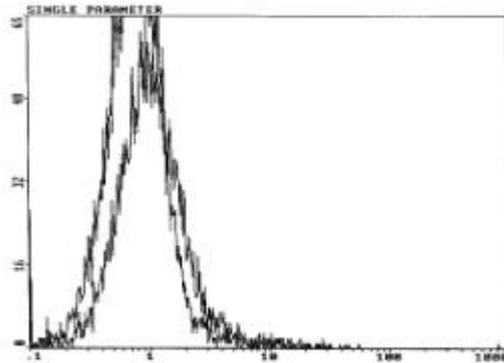


Abb. 52 Die linke Kurve entspricht dem basalen Wert für TF, die rechte dem Signal für TF nach Stimulation mit LPS (beides ohne Calcitriol und E<sub>2</sub>)

Bei den Zellen, die nicht mit Calcitriol behandelt und mit LPS stimuliert wurden, waren 26,4% der registrierten Ereignisse positiv für TF, d.h. die TF-Expression erhöhte sich im Vergleich zum Basalwert um 57,3%.

Eine Präinkubation der Zellen über 24 h mit E<sub>2</sub> erhöhte die LPS-induzierte TF-Expression in Abhängigkeit von der Konzentration. Bei 500 pg/ml E<sub>2</sub> kam es zu einem LPS-induzierten TF-Anstieg 77,9 % im Vergleich zum Basalwert, bei 1000 pg/ml E<sub>2</sub> zu einem Anstieg von 86,3% und bei 1500 pg/ml zu einem Anstieg von 96,1%.

Anhand des Parameters „mean channel fluorescence intensity“ war die Signalstärke für den LPS-induzierten TF im Vergleich zum Basalwert um 5,2 % höher, bei 500 pg/ml E<sub>2</sub> war sie um 21,2 %, bei 1000 pg/ml E<sub>2</sub> um 17,9 % und bei 1500 pg/ml E<sub>2</sub> um 5,2 % höher.

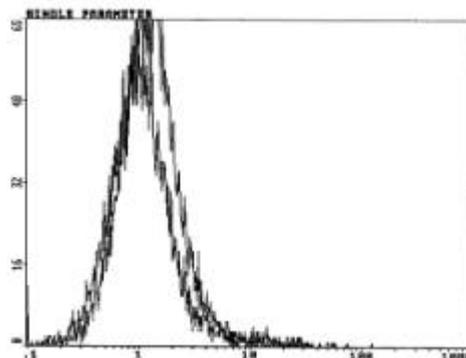


Abb. 53 zeigt die graphische Überlagerung der LPS-induzierten TF-Expression, links ohne und rechts mit E<sub>2</sub> (1000 pg/ml).

Anhand beider Parameter erhöhte E<sub>2</sub> die Bereitschaft der MM6-Zellen, auf LPS bezüglich der Expression von TF zu reagieren. Die Anzahl der Zellen, die TF exprimierten, war bei einer E<sub>2</sub>-Konzentration von 1500 pg/ml am höchsten, die Stärke aber, mit der die TF-positiven Zellen diesen exprimierten, war bei E<sub>2</sub>-Konzentrationen zwischen 500 und 1000 pg/ml am höchsten.

Bei den Zellen, die mit Calcitriol über 48 h vorbehandelt wurden und mit LPS stimuliert wurden, waren 19,03% der registrierten Ereignisse positiv für TF, d.h. die LPS-Expression erhöhte sich im Vergleich zum Basalwert um 73%.

Eine Präinkubation der Zellen über 24 h mit E<sub>2</sub> förderte auch bei diesen Zellen die LPS-induzierte TF-Expression. Bei 500 pg/ml E<sub>2</sub> kam es zu einem LPS-induzierten TF-Anstieg von 103,4% im Vergleich zum Basalwert, bei 1000 pg/ml E<sub>2</sub> zu einem Anstieg von 112,1% und bei 1500 pg/ml zu einem Anstieg von 88,9%.

Anhand des Parameters „mean channel fluorescence intensity“ war die Signalstärke für den LPS-induzierten TF im Vergleich zum Basalwert um 13,9% höher. Bei 500 pg/ml E<sub>2</sub> war sie um 24,5% höher, bei 1000 pg/ml E<sub>2</sub> um 24,4% höher und bei 1500 pg/ml E<sub>2</sub> um 14,8% höher.

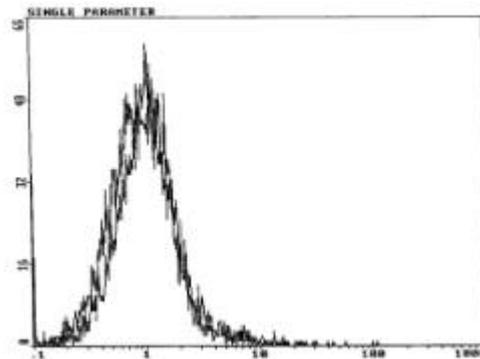


Abb. 54 zeigt die graphische Überlagerung der LPS-induzierten TF-Expression, links ohne und rechts mit E<sub>2</sub>, bei den mit Vit.D<sub>3</sub> vorbehandelten Zellen.

### 6.1.3.1 Untersuchung der LPS-induzierten TF-Expression; Messung an fixierten Zellen; E<sub>2</sub>-Konzentrationen zwischen 100 und 2000 pg/ml

Zellen

(s.o.)

Methodik (3.5.6; Bestimmung von TF an fixierten Zellen; einzelparametrische TF-Bestimmung)

Ergebnisse

Ohne Vit.D <sub>3</sub>	%-TF- positive Zellen	MCFI
Basal	7,2	*
LPS	12,2	0,467
LPS + 100 pg/ml E <sub>2</sub>	14	0,582
LPS + 500 pg/ml E <sub>2</sub>	14,9	0,562
LPS + 1000 pg/ml E <sub>2</sub>	12,7	0,41
LPS + 1500 pg/ml E <sub>2</sub>	14,8	0,486
LPS + 2000 pg/ml E <sub>2</sub>	16,9	0,598

Mit Vit.D <sub>3</sub>	%-TF- positive Zellen	MCFI
Basal	3,7	0,322
LPS	9,5	0,394
LPS + 100 pg/ml E <sub>2</sub>	10,2	0,57
LPS + 500 pg/ml E <sub>2</sub>	12	0,462
LPS + 1000 pg/ml E <sub>2</sub>	13,2	0,58
LPS + 1500 pg/ml E <sub>2</sub>	13,6	0,64
LPS + 2000 pg/ml E <sub>2</sub>	12,9	0,794

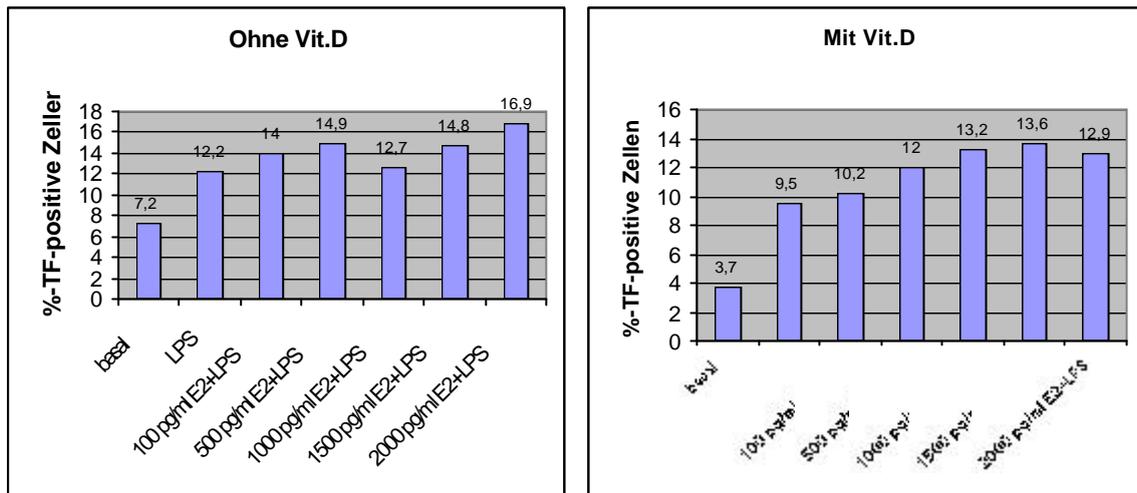


Abb. 55 Einfluß von E<sub>2</sub> auf die LPS-induzierte TF-Expression der MM6-Zellen; Messung an fixierten Zellen

Nach dieser Methode waren die MM6-Zellen basal zu 7,2% TF- positiv und eine 5-stündige LPS-Stimulation erhöhte die TF-Expression im Vergleich zum Basalwert um 69,4% (12,2 %). Eine Vorinkubation der Zellen mit E<sub>2</sub> erhöhte konzentrationsabhängig die LPS-induzierte TF-Expression. Es wurde eine Erhöhung im Vergleich zum Basalwert gesehen, bei 100 pg/ml E<sub>2</sub> um 94,4%, bei 500 pg/ml E<sub>2</sub> um 106,9%, bei 1000 pg/ml E<sub>2</sub> um 76,4%, bei 1500 pg/ml E<sub>2</sub> um 105,5% und bei 2000 pg/ml E<sub>2</sub> um 134,7%.

Eine 48-stündige Behandlung der Zellen mit Calcitriol erniedrigte die basale TF-Expression um 48,6% (basal zu 3,7 % TF-positiv). Eine 5-stündige LPS-Stimulation erhöhte die TF-Expression der mit Vit.D<sub>3</sub> behandelten Zellen im Vergleich zum Basalwert um 156,8% (9,5%). Auch bei diesen Zellen erhöhte eine Präinkubation mit E<sub>2</sub> die LPS-induzierte TF-Expression. Im Vergleich zum Basalwert lag die Erhöhung der TF-Expression bei 100pg/ml E<sub>2</sub> um 175,7%, bei 500 pg/ml E<sub>2</sub> um 224,3%, bei 1000 pg/ml E<sub>2</sub> um 256,8%, bei 1500 pg/ml E<sub>2</sub> um 267,6% und bei 2000 pg/ml E<sub>2</sub> um 248,6%.

### 6.1.3.2 Untersuchung des Einflusses einer Vorinkubation mit 1000 pg/ml E<sub>2</sub> auf die LPS-induzierte TF-Expression der MM6-Zellen, die mit oder ohne Calcitriol behandelt wurden; Messung an lebenden Zellen; statistische Auswertung

Zellen (s.o.)

Methodik (siehe 3.5.6, Bestimmung von TF an lebenden Zellen mit Blockierung von Fc-Rezeptoren, einzelparametrische TF-Bestimmung)

Ergebnisse

Ohne Vit.D3	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Versuch 6	Versuch 7	Versuch 8	MW	SD
%-TF-⊕										
Ohne E <sub>2</sub>	25,7	27	28,8	30,4	36,6	36,2	36,3	42,1	32,9	5,74
Mit E <sub>2</sub>	37,7	24,7	31,5	31,6	33,9	35,8	36,6	42,7	34,3	5,3
MCFI										
Ohne E <sub>2</sub>	1,36	0,98	0,97	1,05	1,17	1,16	1,02	1,68	1,17	0,24
Mit E <sub>2</sub>	1,72	0,9	0,97	0,94	1,04	1,05	1,03	1,68	1,17	0,33

Mit Vit.D3	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Versuch 6	Versuch 7	Versuch 8	MW	SD
%-TF-Ä										
Ohne E <sub>2</sub>	22,9	17,8	16,4	18	22,6	21,3	22,8	22,5	20,5	2,7
Mit E <sub>2</sub>	24,7	25,7	19,6	21,1	24,5	22,2	25,7	21,4	23,1	2,3
MCFI										
Ohne E <sub>2</sub>	1,177	1,09	0,806	0,73	0,74	0,76	0,75	0,74	0,9	0,2
Mit E <sub>2</sub>	1,194	1,15	1,01	0,88	0,92	0,75	0,93	0,71	0,9	0,2

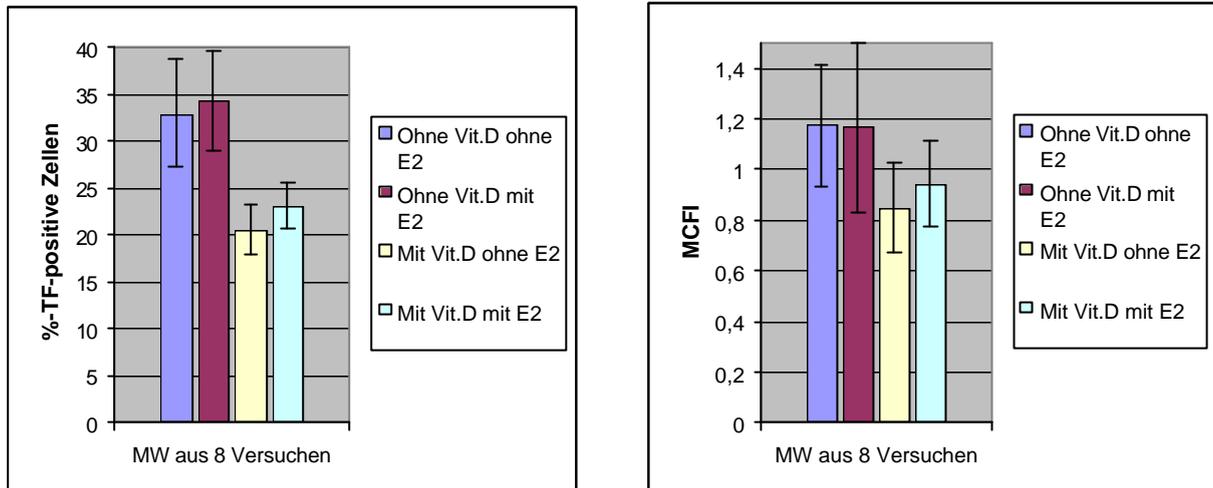


Abb. 56 Einfluß von E<sub>2</sub> (1000 pg/ml über 24 h) auf die LPS-induzierte TF-Expression der MM6-Zellen; Messung an lebenden Zellen

Die MM6-Zellen waren nach LPS-Stimulation durchschnittlich zu 32,9% TF-positiv (MCFI = 1,174). Die Präinkubation der Zellen mit 1000 pg/ml E<sub>2</sub> führte mit Ausnahme von ein paar Versuchen zu keiner großen Veränderung der LPS-induzierten TF-Expression. 34,3% der Zellen waren durchschnittlich TF-positiv (MCFI = 1,166). Diese 4,3%-ige Erhöhung der LPS-induzierten TF-Expression unter Östrogeneinfluß konnte nur anhand des ersten Parameters demonstriert werden, sie war statistisch nicht signifikant.

Die Zellen, die mit Calcitriol behandelt wurden, waren nach LPS-Stimulation zu 20,54% TF-positiv (MCFI = 0,849). Die Präinkubation dieser Zellen mit E<sub>2</sub> führte zu einer Erhöhung der LPS-induzierten TF-Expression. Durchschnittlich 23,11% der Zellen waren positiv für TF (MCFI = 0,943, d.h. anhand des Parameters „%-TF-positiv“ ergab sich eine Erhöhung um 12,5% (Statistische Auswertung mit dem Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben : p=0,025), anhand des Parameters „mean channel fluorescence intensity“ ergab sich eine Erhöhung um 11,1% (p=0,05) im Vergleich zum LPS-induzierten Wert ohne Präinkubation mit dem Hormon.

### 6.1.4 LPS-Empfindlichkeit der Zellen unter E<sub>2</sub> bezüglich der TNFa-Produktion

#### Zellen

s.o. Vit.D<sub>3</sub>-Gabe von 40 ng/ml über 48 h; E<sub>2</sub>-Gabe von 1000 pg/ml über 24 h; LPS-Stimulation 1µg/ml über 5 h.

Methodik (siehe 3.8)

Ergebnisse

Ohne Vit.D <sub>3</sub>	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		MW	SD
Basal	0	0	0	11	0	0	1,8	4,5
LPS	100	95	89	97	90	103	95,7	5,5
LPS+100 pg/ml E <sub>2</sub>	98	98	47,8	88			83	24
LPS+500 pg/ml E <sub>2</sub>	95	98	84	87	39	53	76	24,2
LPS+1000 pg/ml E <sub>2</sub>	98		79	79	61	65	76,4	14,6

Mit Vit.D <sub>3</sub>	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		MW	SD
Basal	20	1	0	15	34	4	12,3	13,3
LPS	138	144	121	147	124	128	133,7	10,9
LPS+100 pg/ml E <sub>2</sub>	119	127	133	105			121	12,1
LPS+500 pg/ml E <sub>2</sub>	118	131	115	109	88	127	114,7	15,3
LPS+1000 pg/ml E <sub>2</sub>		124	136	91	89	95	105,8	19,5

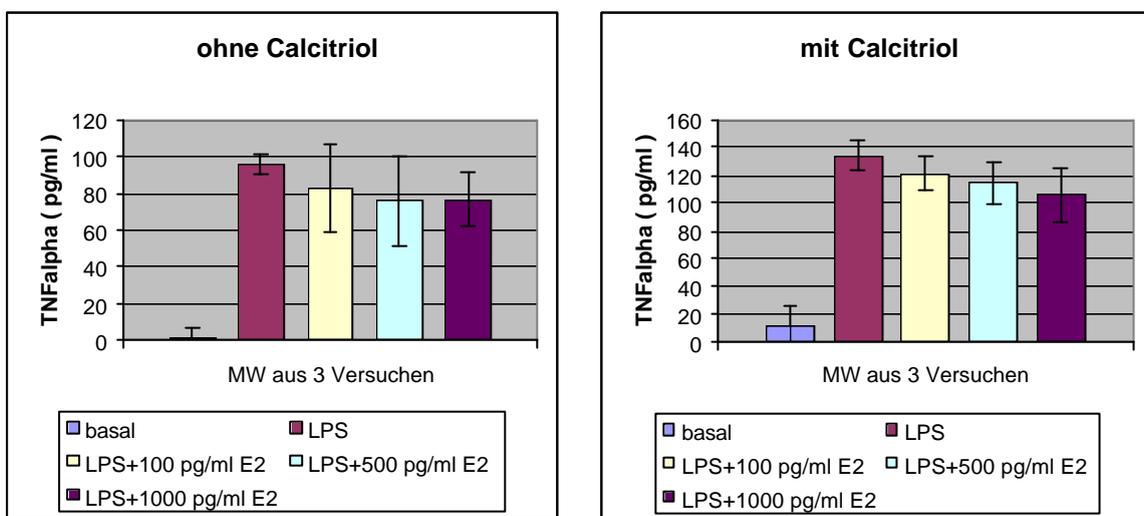


Abb. 57 E<sub>2</sub>-Einfluß auf die LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Expression der MM6-Zellen

Eine Vorinkubation der Zellen mit E<sub>2</sub> erniedrigte die LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Produktion. Eine Vorinkubation mit 100 pg/ml E<sub>2</sub> führte zu einer 13,4%-igen, eine Vorinkubation mit 500 pg/ml E<sub>2</sub> zu einer 20,6%-igen ( $p < 0,05$ ) und eine Vorinkubation mit 1000 pg/ml E<sub>2</sub> zu einer 20,2%-igen ( $p < 0,05$ ) Abnahme der Expression von TNF $\alpha$  im Vergleich zu den Kontrollen. Auch bei den mit Vit.D<sub>3</sub> vorbehandelten MM6-Zellen hatte E<sub>2</sub> dieselbe Wirkung. 100 pg/ml E<sub>2</sub> führten zu einer 9,2%-igen, 500 pg/ml E<sub>2</sub> zu einer 14%-igen ( $p < 0,03$ ) und 1000 pg/ml zu einer 20,6%-igen ( $p < 0,03$ ) Abnahme der Expression von TNF $\alpha$  im Vergleich zu den Kontrollen.

## 6.2 THP-1-Zellen

### 6.2.1 Einfluß von E<sub>2</sub> auf die LPS-induzierte TF-Expression

#### 6.2.1.1 Untersuchung der LPS-induzierten TF-Expression; E<sub>2</sub>-Konzentrationen zwischen 500 und 1500 pg/ml

Zellen

Exponentiell wachsende THP-1-Zellen wurden am 3. Tag ihrer Kultur gesplittet. Sie wurden dann 48h lang mit oder ohne Calcitriol (40 ng/ml) und 24 h lang mit oder ohne 17 $\beta$ -Östradiol (500 bis 1500 pg/ml) wie beschrieben kultiviert. Die Zellen wurden dann über 5 h mit LPS stimuliert.

*Methodik* (siehe 3.5.9, Bestimmung von TF an lebenden Zellen mit Blockierung von Fc-Rezeptoren, einzelparametrische TF-Bestimmung)

### Ergebnisse

<b>%-TF- positive Zellen</b>					
<i>Ohne Vit.D<sub>3</sub></i>	<i>Versuch 1</i>	<i>Versuch 2</i>	<i>Versuch 3</i>	<i>MW</i>	<i>SD</i>
Basal	9,9	13,4	7	10,1	3,20
LPS	16,8	18,7	9,3	14,9	4,97
LPS+500 pg/ml E <sub>2</sub>	22,5	24,7	16,1	21,1	4,47
LPS+1000 pg/ml E <sub>2</sub>	20,8	24,8	17,7	21,1	3,56
LPS+1500 pg/ml E <sub>2</sub>	21,8	25,3	17,6	21,6	3,86

<b>MCFI</b>					
<i>Ohne Vit.D<sub>3</sub></i>	<i>Versuch 1</i>	<i>Versuch 2</i>	<i>Versuch 3</i>	<i>MW</i>	<i>SD</i>
Basal	0,665	0,642	0,488	0,6	0,10
LPS	0,726	0,801	0,682	0,74	0,06
LPS+500 pg/ml E <sub>2</sub>	0,783	0,897	0,793	0,82	0,06
LPS+1000 pg/ml E <sub>2</sub>	0,684	0,815	0,712	0,74	0,07
LPS+1500 pg/ml E <sub>2</sub>	0,783	0,878	0,783	0,82	0,05

<b>%-TF- positive Zellen</b>					
<i>Mit Vit.D<sub>3</sub></i>	<i>Versuch 1</i>	<i>Versuch 2</i>	<i>Versuch 3</i>	<i>MW</i>	<i>SD</i>
Basal	5,5	6,6	4,1	5,4	1,25
LPS	5,7	7,6	5,3	6,2	1,23
LPS+500 pg/ml E <sub>2</sub>	6,3	7,7	5,3	6,43	1,21
LPS+1000 pg/ml E <sub>2</sub>	7,1	8,6	4,7	6,8	1,97
LPS+1500 pg/ml E <sub>2</sub>	6,4	9,5	4,6	6,83	2,48

<b>MCFI</b>					
<i>Mit Vit.D<sub>3</sub></i>	<i>Versuch 1</i>	<i>Versuch 2</i>	<i>Versuch 3</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>SD</i>
Basal	0,644	0,576	0,626	0,62	0,04
LPS	0,65	0,681	0,585	0,64	0,05
LPS+500 pg/ml E <sub>2</sub>	0,614	0,661	0,604	0,63	0,03
LPS+1000 pg/ml E <sub>2</sub>	0,592	0,698	0,463	0,58	0,12
LPS+1500 pg/ml E <sub>2</sub>	0,54	0,627	0,428	0,53	0,099

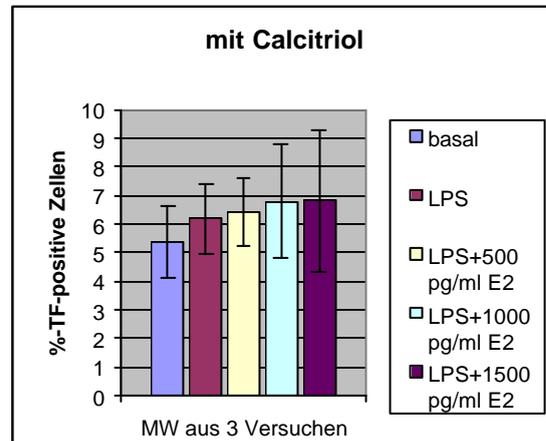
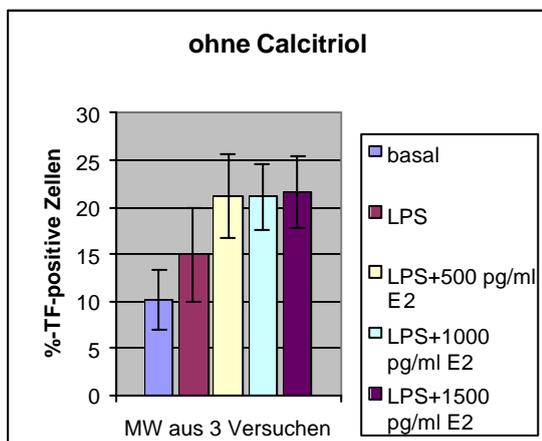


Abb. 58 Einfluß von E<sub>2</sub> auf die LPS-induzierte TF-Expression von THP-1-Zellen

THP-1-Zellen waren basal zu 10,1% positiv für TF. Eine 48-stündige Calcitriol-Behandlung erniedrigte die TF-Expression bezogen auf den Basalwert um 46,5% (5,4%).

Eine 5-stündige Stimulation der THP-1-Zellen mit 1µg/ml LPS förderte die TF-Expression.

Bei den Zellen, die ohne Vorbehandlung mit Calcitriol mit LPS stimuliert wurden, waren 14,9% der registrierten Ereignisse positiv für TF, d.h. die LPS-Expression hat sich im Vergleich zum Basalwert um 47,8% erhöht.

Eine Präinkubation der Zellen über 24 h mit E<sub>2</sub> erhöhte konzentrationsabhängig die LPS-induzierte TF-Expression. Bei einer Stimulation mit 500 und 1000 pg/ml E<sub>2</sub> kam es zu einem LPS-induzierten TF-Anstieg von 108,9% im Vergleich zum Basalwert, bei 1500 pg/ml zu einem Anstieg von 113,6%.

Anhand des Parameters „mean channel fluorescence intensity“ war die Signalstärke für den LPS-induzierten TF im Vergleich zum Basalwert um 14,8% höher. Bei 500 pg/ml E<sub>2</sub> war sie um 19,1%, bei 1000 pg/ml E<sub>2</sub> um 25,9% und bei 1500 pg/ml E<sub>2</sub> um 26,5% höher.

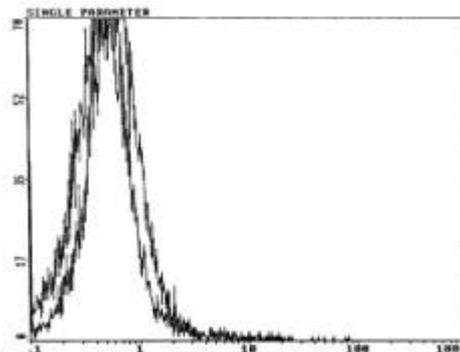


Abb. 59 Graphische Überlagerung der LPS-induzierten TF-Expression, linke Kurve ohne und rechte mit E<sub>2</sub> (1000 pg/ml).

Bei den Zellen, die mit Calcitriol 48 h lang vorbehandelt und mit LPS stimuliert wurden, waren 6,2% der registrierten Ereignisse positiv für TF, d.h. die LPS-Expression erhöhte sich im Vergleich zum Basalwert um 14,8 %.

Eine Präinkubation der Zellen über 24 h mit E<sub>2</sub> förderte auch bei diesen Zellen die LPS-induzierte TF-Expression. Bei einer Präinkubation mit 500 pg/ml E<sub>2</sub> kam es zu einem LPS-induzierten TF-Anstieg von 19,1% im Vergleich zum Basalwert, bei einer Präinkubation mit 1000 pg/ml E<sub>2</sub> zu einem Anstieg von 25,9% und bei einer Präinkubation mit 1500 pg/ml E<sub>2</sub> zu einem Anstieg von 26,5%.

Im Hinblick auf den Parameter „mean channel fluorescence intensity“ konnten diese Effekte nicht gezeigt werden.

### 6.2.1.2 Untersuchung des Einflusses einer Vorinkubation mit 1000 pg/ml E<sub>2</sub> auf die LPS-induzierte TF-Expression der THP-1-Zellen, die mit oder ohne Calcitriol behandelt wurden; Statistische Auswertung

*Zellen und Methodik (s.o.)*

*Ergebnisse*

Ohne Vit.D3	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Versuch 6	MW	SD
%-TF- positive								

Zellen								
LPS	16,8	18,7	9,3	10,6	13,8	11,8	13,5	3,65
LPS+E <sub>2</sub>	20,8	24,8	17,7	16,7	17,2	16,8	19	3,22
MCFI								
LPS	0,726	0,801	0,682	0,584	0,688	0,625	0,68	0,08
LPS+ E <sub>2</sub>	0,684	0,815	0,712	0,561	0,584	0,732	0,68	0,10

Mit Vit.D3	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Versuch 6	MW	SD
%-TF-positive Zellen								
LPS	5,7	7,6	5,3	4,6	4,7	5,7	5,6	1,09
LPS+ E <sub>2</sub>	7,1	8,6	4,7	5,3	4,8	5	5,91	1,58
MCFI								
LPS	0,65	0,681	0,585	0,663	0,506	0,672	0,63	0,07
LPS+ E <sub>2</sub>	0,592	0,698	0,463	0,602	0,529	0,562	0,57	0,08

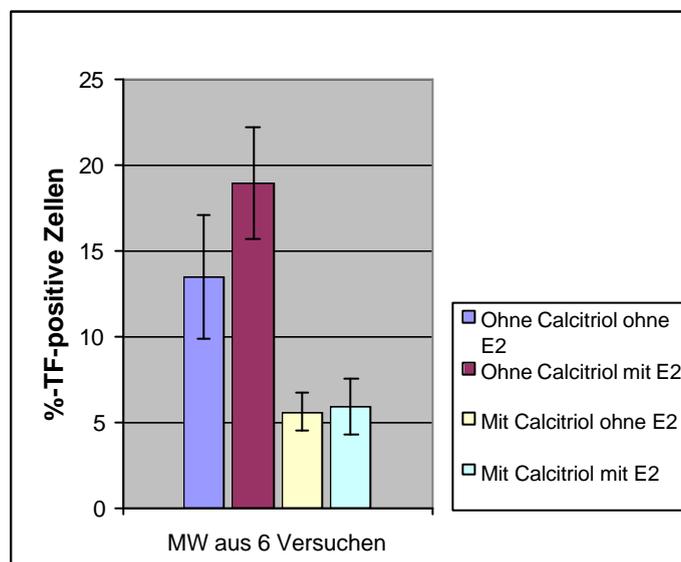


Abb. 60 Einfluß von E<sub>2</sub> (1000 pg/ml; 24 h) auf die LPS-induzierte TF-Expression der THP-1-Zellen

Die THP-1-Zellen waren nach LPS-Stimulation durchschnittlich zu 13,5% TF-positiv. Die Präinkubation der Zellen mit 1000 pg/ml E<sub>2</sub> erhöhte die LPS-induzierte TF-Expression. 19% der Zellen waren durchschnittlich TF-positiv, d.h. eine Präinkubation mit 1000 pg/ml E<sub>2</sub> erhöhte die LPS-induzierte TF-Expression um 40,7% (p=0,027). Im Hinblick auf den Parameter „MCFI“ wurde keine signifikante Veränderung gesehen.

Die Zellen, die mit Calcitriol behandelt wurden, waren nach Stimulation mit LPS zu 5,6% TF-positiv. Die Präinkubation dieser Zellen mit E<sub>2</sub> führte anhand des ersten Parameters zu einer leichten Erhöhung der LPS-induzierten TF-Expression (5,4 %), die aber nicht signifikant war.

### 6.3 Periphere Blutmonozyten

MBP-Zellen wurden wie beschrieben isoliert (3.6.1) und in Kultur B (3.6.2) gesetzt. Danach folgte eine E<sub>2</sub>-Gabe in Konzentrationen zwischen 100 und 1000 pg/ml über 24 h, eine Vit.D<sub>3</sub>-Gabe (40 ng/ml) über 48 h und eine LPS-Stimulation mit 1 µg/ml LPS über 5 h. Die Zellen wurden nach Protokoll 3 vorbereitet und anschließend am FACS analysiert. Die TNFα-Bestimmung wurde wie unter 3.8 beschrieben durchgeführt.

### 6.3.1 Einfluß von E<sub>2</sub> auf TF ohne Vit.D<sub>3</sub>

%-TF-positive Zellen	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Versuch 6	MW	SD
Basal	14,4	13,2	4,1	8,2	17,3	16,5	12,3	5,13
LPS	27,9	25,4	30,6	36,6	29,6	24	29,0	4,47
100 pg/ml E <sub>2</sub> ; LPS	33	31	52,2	34,4	28,5	27	34,4	9,16
500 pg/ml E <sub>2</sub> ; LPS	33,8	36,3	55,9	43,8	25,1	29,3	37,4	11,08
1000 pg/ml E <sub>2</sub> ; LPS	36,4	30,9	37,1	48,9	34,7	38,4	37,7	6,05

MCFI	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Versuch 6	MW	SD
Basal	13,9	10,5	3,9	8,9	11,4	11,9	10,1	3,4
LPS	23,7	16,1	8,5	13,9	12,9	14,9	15	5,0
100 pg/ml E <sub>2</sub> ; LPS	22,9	17,4	11,1	12,7	15,8	17,9	16,3	4,2
500 pg/ml E <sub>2</sub> ; LPS	31	16,8	11,1	14,3	15	21,7	18,3	7,1
1000 pg/ml E <sub>2</sub> ; LPS	21,5	14,9	8	14,9	15,5	24,7	16,6	5,8

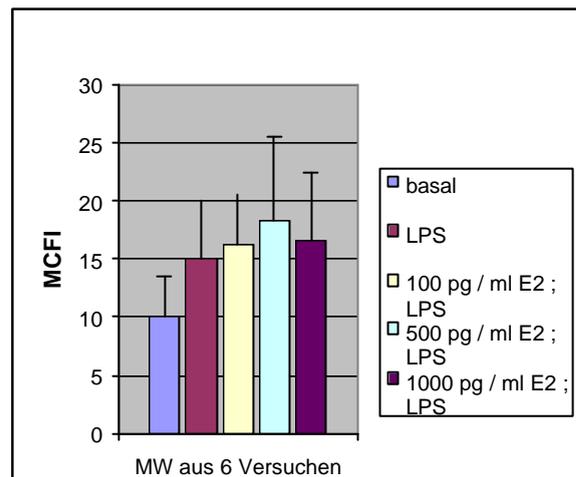
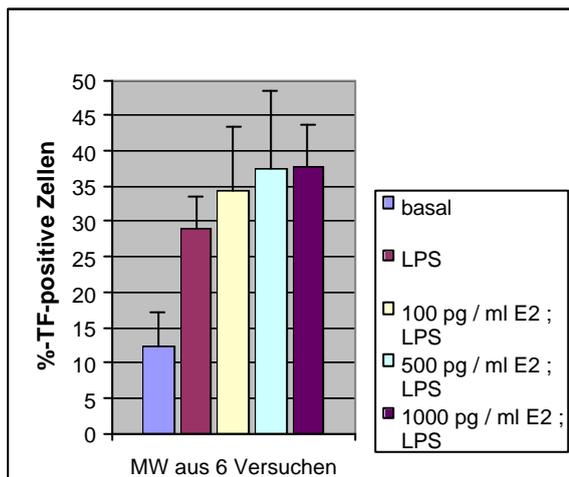


Abb. 61 Einfluß von E<sub>2</sub> auf den LPS-induzierten TF bei MBP-Zellen

Die CD14-positiven Zellen waren nach 48 h dauernder *In vitro*-Kultur basal im Durchschnitt zu 12,3 % positiv für TF. Eine 4-stündige Stimulation der Zellen mit 1 µg/ml LPS erhöhte die Oberflächenexpression von TF um 16,7% (von 12,3% auf 29%, p=0,028).

Eine 24-stündige Präinkubation der Zellen mit 17β-Östradiol förderte diese LPS-induzierte TF-Expression der Zellen. Bei 100 pg/ml E<sub>2</sub> waren 34,4% der stimulierten Zellen TF-positiv, bei 500 pg/ml E<sub>2</sub> 37,4% und bei 1000 pg/ml E<sub>2</sub> 37,7%, d.h. eine entsprechende Erhöhung im Vergleich zum Basalwert von 22,1 %, 25,1 % und 25,4 % konnte demonstriert werden.

Der gleiche Verlauf wurde auch für den Parameter „mean channel fluorescence intensity“ beobachtet. Dieser nahm nach LPS-Stimulation um einen Faktor von 1,26, nach LPS-Stimulation mit 100 pg/ml E<sub>2</sub> um einen Faktor von 1,51, nach LPS-Stimulation mit 500 pg/ml um einen Faktor von 1,83 und nach LPS-Stimulation mit 1000 pg/ml um einen Faktor von 2,08 zu.

Wenn man die Versuche einzeln betrachtet, offenbart sich die Tatsache, daß sowohl die Basalwerte als auch die stimulierten Werte großen individuellen Schwankungen unterliegen.

Bei manchen Probanden lag der Basalwert für TF nach der in vitro Kultivierung niedriger und konnte besser mit LPS induziert werden. Außerdem zeigte E<sub>2</sub> nicht immer bei der gleichen Konzentration den maximalen Effekt. Dieser lag teils bei 500 pg/ml, teils bei 1000 pg/ml E<sub>2</sub>. Trotzdem konnte deutlich gezeigt werden, daß das Vorhandensein von 17β-Östradiol bei Konzentrationen zwischen 500 und 1000 pg/ml im Kulturmedium der Zellen die LPS-induzierte TF-Expression der Monozyten fördert (statistisch signifikante Werte basal zu LPS: p=0,028; LPS zu LPS+500 E<sub>2</sub>: p=0,046 und LPS zu LPS+1000 E<sub>2</sub>: p= 0,028).

### 6.3.2 Einfluß von LPS und E<sub>2</sub> auf CD14-Expression ohne Vit.D<sub>3</sub>

%-CD14- positiv	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	MW	SD
Basal	13,6	11,7	17,2	11	13	13,3	2,4
LPS	10,5	9,4	13,8	10	10,1	10,8	1,7
100 pg/ml E <sub>2</sub> ;LPS	9	9,3	14,3	8,9	8,1	9,9	2,5
500 pg/ml E <sub>2</sub> ; LPS	11,4	7,3	14,2	10,4	6,9	10,0	3,0
1000 pg/ml E <sub>2</sub> ; LPS	11,3	10,2	16,1	8	6,5	10,4	3,7

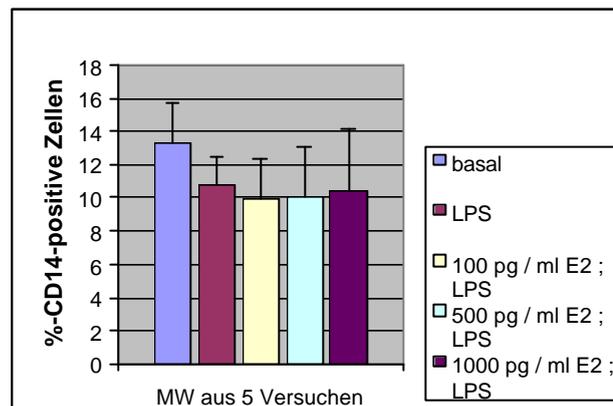


Abb. 62 Einfluß von LPS und E<sub>2</sub> auf die CD14-Expression der MBP-Zellen

Nach einer 5-stündigen LPS-Stimulation der Zellen nahm die CD14-Expression um 3 % ab (durchschnittlich von 16 auf 13%, p=0,043). Diese LPS-induzierte Abnahme der CD14-Expression konnte auch bei den mit Östrogen behandelten Zellen nachgewiesen werden (100 pg/ml 12 %, p=0,043, 500 pg/ml 13 %, p=0,043 und 1000 pg/ml 13 %, p=0,043 CD14-positiv), d.h. die erhöhte LPS-induzierte TF-Expression unter Östrogeneinfluß war nicht Folge einer CD14-vermittelten erhöhten LPS-Empfindlichkeit der Zellen.

### 6.3.3 Einfluß von E<sub>2</sub> auf TNFα ohne Vit.D<sub>3</sub>

TNFα (pg/ml)	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	MW	SD
Basal	0	0	0	0	0	0	0
LPS	939	466	370	258	390	484,6	299,5
LPS+100 pg/ml E <sub>2</sub>	538	459	646	286	556	497	151,6
LPS+500 pg/ml E <sub>2</sub>	280	300	180	168	306	246,8	67,7
LPS+1000 pg/ml E <sub>2</sub>	255	107	157	187	369	215	61,9

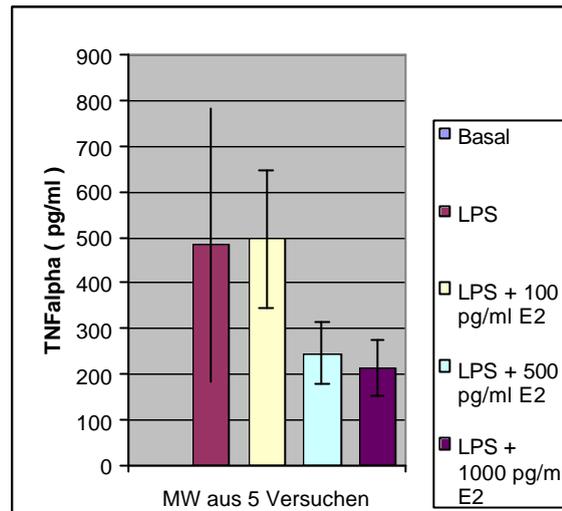


Abb. 63: E<sub>2</sub>-Einfluß auf die LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Produktion peripherer Blutmonozyten

Eine Präinkubation der Zellen mit 500 pg/ml E<sub>2</sub> reduzierte die LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Produktion um 50% (247 +/- 68, p<0,05), eine Präinkubation mit 1000 pg/ml E<sub>2</sub> reduzierte die TNF $\alpha$ -Produktion um 56% (215 +/- 62, p<0,05).

#### 6.3.4 Einfluß von E<sub>2</sub> auf TF mit Vit.D<sub>3</sub>

% TF- positiv	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	MW	SD
basal	8,4	7,8	8,1	8,1	0,3
LPS ohne Vit.D <sub>3</sub>	*	11,1	14,2	12,7	2,2
LPS	4,8	9,1	6,2	6,7	2,2
LPS+100 pg/ml E <sub>2</sub>	3,8	4,7	5,9	4,8	1,1
LPS+500 pg/ml E <sub>2</sub>	3,6	9,3	9,1	7,3	3,2
LPS+1000 pg/ml E <sub>2</sub>	4,7	4,7	6,7	5,4	1,2

MCFI	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	MW	SD
basal	11,4	4,6	4,6	6,9	3,9
LPS ohne Vit.D <sub>3</sub>	*	11,1	14,2	12,7	2,2
LPS	16,8	8,6	3,8	9,7	6,6
LPS+100 pg/ml E <sub>2</sub>	12,1	4,5	6,6	7,8	3,9
LPS+500 pg/ml E <sub>2</sub>	9,6	11,3	4,4	8,5	3,6
LPS+1000 pg/ml E <sub>2</sub>	9,4	4,7	7,5	7,2	2,4

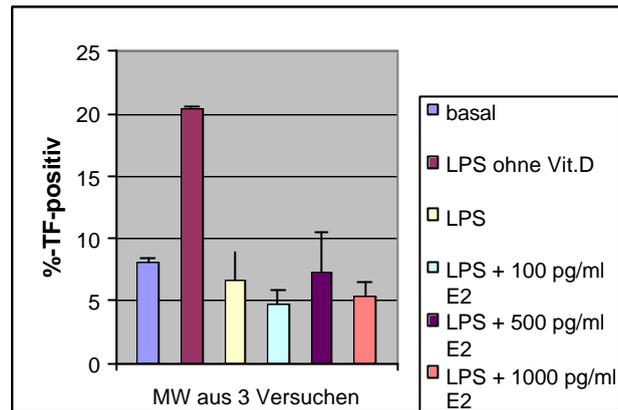


Abb. 64 Einfluß von Calcitriol und E2 auf die LPS-induzierte TF-Expression

Die mit Vit.D<sub>3</sub> behandelten MBP-Zellen reagieren mit keiner signifikanten Erhöhung der TF-Expression. Eine Behandlung der Zellen mit 100 – 1000 pg/ml E<sub>2</sub> war nicht in der Lage, diese Hemmung zu beheben.

### 6.3.5 Einfluß von LPS und E<sub>2</sub> auf die CD14-Expression mit Vit.D<sub>3</sub>

%-CD14- positiv	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	MW	SD
Basal	11,5	16,6	14,1	14,1	2,6
LPS	7	11,6	11,1	9,9	2,5
LPS+100 pg/ml E <sub>2</sub>	7,2	10	12,1	9,8	2,5
LPS+500 pg/ml E <sub>2</sub>	9,5	11,2	13,3	11,3	1,9
LPS+1000 pg/ml E <sub>2</sub>	8,9	14,4	10,2	11,2	2,9

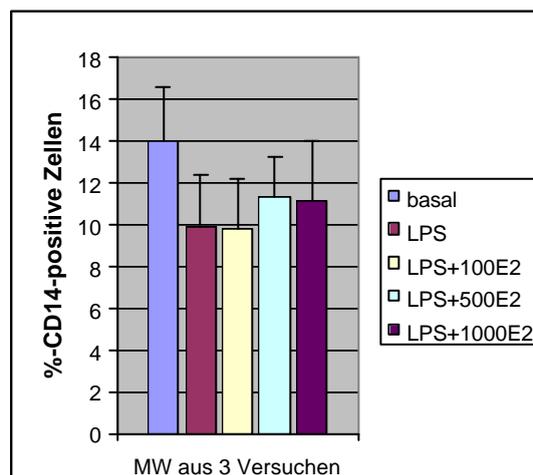


Abb. 65 Einfluß von LPS auf die CD14-Expression der MBP-Zellen

Auch bei den mit Calcitriol behandelten Zellen hat LPS zu einer Abnahme der CD14-Expression geführt (von 14% auf 10%). Unter dieser Konstellation beeinflusste E<sub>2</sub> die LPS-induzierte CD14-Abnahme ebenfalls nicht.

### 6.3.6 Einfluß von E<sub>2</sub> auf TNF $\alpha$ mit Vit.D<sub>3</sub>

TNF $\alpha$ (pg/ml)	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	MW	SD
Basal+Vit.D <sub>3</sub>	0	8	11	6,3	5,7
LPS ohne Vit.D <sub>3</sub>	*	377	631	504	179,6
LPS+ Vit.D <sub>3</sub>	40	19	91	50	37,0
LPS+Vit.D+100 pg/ml E <sub>2</sub>	34	53	57	48	12,3
LPS+Vit.D+500 pg/ml E <sub>2</sub>	48	88	30	55,3	29,7
LPS+Vit.D+1000 pg/ml E <sub>2</sub>	38	84	34	52	27,8

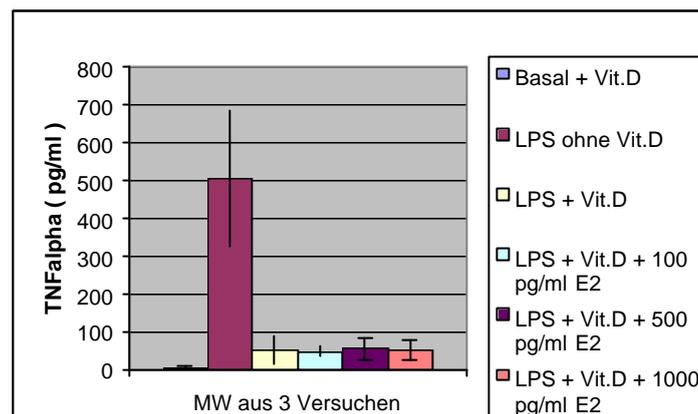


Abb. 66 Effekte von E<sub>2</sub> und Vit.D<sub>3</sub> auf die LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Produktion

Ähnlich wie bei der TF-Expression reduzierte Vit.D<sub>3</sub> die Fähigkeit der Zellen, nach Stimulation mit LPS mit einer Erhöhung der TNF $\alpha$ -Produktion zu reagieren, stark. Auch in diesem Fall beeinflussten E<sub>2</sub>-Konzentrationen von 100 bis 1000 pg/ml diese Suppression nicht.

## VII. Diskussion

### 7.1 Zusammenfassung

- Calcitriol führt zu einer Hochregulation der CD14-Expression und zu einer Herunterregulation der TF-Expression sowohl bei den Zelllinien als auch bei den Primärzellen.
- Die Stimulation aller Zellen mit LPS erhöht die Oberflächenexpression von TF und die Produktion von TNF $\alpha$ .
- Der Effekt von Calcitriol auf die LPS-Sensitivität der Zellen ist Zelltyp-abhängig. Die MM6-Zellen reagieren mit einer erhöhten, die THP-1-Zellen mit einer leicht reduzierten und die Primärzellen mit einer unveränderten TF-Expression nach Stimulation mit LPS im Vergleich zu den Basalwerten.
- Ähnlich dazu produzieren Calcitriol-behandelte MM6-Zellen signifikant höhere Mengen an TNF $\alpha$  nach Stimulation im Vergleich zu den Kontrollen, wobei die Primärzellen nach Calcitriol-Behandlung kaum noch in der Lage sind, auf LPS mit einer erhöhten TNF $\alpha$ -Produktion zu reagieren.
- Eine Behandlung der Zellen mit E<sub>2</sub> hat keinen signifikanten Einfluß auf ihre konstitutive CD14- und TF-Expression und führt zu keiner Veränderung der Proliferationsrate und der DNS- Phasen-Verteilung der MM6- Zellen.
- Eine Vorbehandlung aller Zellen mit E<sub>2</sub> führt konzentrationsabhängig zu einer Erhöhung der TF-Expression nach Stimulation mit LPS.
- Im Gegensatz dazu produzieren E<sub>2</sub>-behandelte MM6-Zellen und die Primärzellen niedrigere TNF $\alpha$ -Mengen nach Stimulation.

### 7.2 Methodische Vorversuche

Bevor mit den eigentlichen Experimenten begonnen wurde, führten wir eine Reihe von Vorversuchen durch, um eventuelle methodisch bedingte Fehler zu vermeiden und die Methoden zu standardisieren.

Da wir im späteren Verlauf den Einfluß von E<sub>2</sub> auf die Proliferation der MM6-Zellen untersuchen wollten, führten wir als erstes einen Versuch durch, um die optimale Anfangskonzentration der Zellen beim Ansetzen der Zellkultur zu ermitteln. Dabei wurden 50.000 bis 800.000 MM6-Zellen pro well (2ml Medium) angesetzt, 3 bis 4 Tage lang kultiviert, und es wurden 2 Parameter untersucht: der WF als Maß für die Proliferation der Zellen und der Anteil an lebenden Zellen am Ende des Kulturzyklus. Wie erwartet, gingen um so mehr Zellen am Ende des Kulturzyklus zu Grunde, je dichter die Zellkultur angesetzt wurde. Im Gegensatz dazu war der WF in den wells mit 200.000 Zellen am größten. Möglicherweise waren 400.000 Zellen pro well bereits eher hinderlich für das Wachstum, wobei in den wells mit 800.000 Zellen der WF am allerkleinsten war, möglicherweise auf Grund von Mangel an Substrat oder Selbstinhibition durch Stoffwechselendprodukte. Interessanterweise ergab aber eine ganz geringe Zellkulturdichte auch keine optimale Proliferation, obwohl dabei die wenigsten Zellen abstarben. Möglicherweise ist eine gewisse Zelldichte nötig, damit sich die Zellen zum Wachstum gegenseitig stimulieren. Aus diesen Gründen wurden für die weiteren Versuche die MM6-Zellen mit einer Anfangskonzentration von 200.000 Zellen pro well in Kultur gesetzt.

Als nächstes wollten wir untersuchen, ob das Vorhandensein des Farbstoffes Phenolrot im Kulturmedium der Zellen für ihr Wachstum absolut notwendig ist, da es Hinweise dafür gibt, daß der Farbstoff selbst eine E<sub>2</sub>-Aktivität besitzt (Berthois & al 1986), was sich für die Proliferationsversuche mit E<sub>2</sub> als hinderlich hätte auswirken können. Deswegen wurden die

Zellen mit und ohne Phenolrot 4 Tage lang kultiviert und durch Zellzählungen der WF berechnet. Der fast identische MW aus 3 Versuchen zeigte, daß das Vorhandensein dieses Farbstoffes im Kulturmedium der Zellen keinen Einfluß auf ihre Proliferationsfähigkeit hat. Bei der weiteren Kultivierung der Zellen wurde also RPMI 1640 ohne Phenolrot benutzt.

Um weitere methodisch bedingte Fehler bei den Proliferationsversuchen auszuschließen, untersuchten wir, ob die Lage der Zellen auf den verschiedenen wells der Kulturplatte ihr Wachstumsverhalten beeinflussen kann. Dazu teilten wir die Kulturplatte in verschiedene Reihen auf und verglichen den WF der Zellen in den einzelnen wells untereinander. Dabei ergaben sich auch keine signifikanten Unterschiede.

Für unsere Versuche wollten wir parallel zu den Zelllinien auch frisch isolierte Blutmonozyten aus gesunden männlichen Probanden untersuchen und die Ergebnisse untereinander vergleichen. Dazu führten wir eine Ficoll-Dichtezentrifugation durch, nahmen die Zellen der mononukleären Schicht ab (PMN-Zellen) und setzten sie in Kultur. Da die PMN-Zellen eine Mischkultur aus Lymphozyten und Monozyten sind, bestimmte man dann mittels Durchflußzytometrie den Anteil an CD14-positiven Zellen, d.h. Monozyten, bzw. man untersuchte durch eine doppelparametrische FACS-Analyse nur die CD14-positiven Zellen anhand der Expression weiterer Antigene. Das Problem bei dieser Methode war nur, daß der Anteil an CD14-positiven Zellen im Verlauf der *in vitro* Kultur stark abnahm; nach 3 Tagen Kultur waren je nach Proband weniger als 4% der Zellen noch CD14-positiv. Diese niedrige Zahl an „reifen“ Monozyten hätte sowohl die nachfolgenden Zytokinbestimmungen als auch die FACS-Analyse deutlich erschwert. Deswegen fügten wir einen Zwischenschritt ein: Nach der Dichtezentrifugation inkubierten wir die PMN-Zellen 1h lang in Plastik-Kulturflaschen. Die Monozyten haften hierbei auf dem Boden der Kulturflasche fest an, so daß die nicht-adhärenen Lymphozyten entfernt werden können. Danach können die Monozyten vom Boden der Flasche mobilisiert und in hydrophoben Kulturplatten, an denen sie nicht adhären, weiter kultiviert werden. Bei dieser von uns als MBP-bezeichneten Zellpopulation war der Anteil an CD14-positiven Zellen nach 3 Tagen Kultur noch über 10%. Aus diesem Grund setzten wir für die nachfolgenden Versuche immer MBP-Zellen in Kultur.

Als letzten methodischen Schritt wollten wir die Bestimmung der Oberflächenexpression von TF standardisieren. Zu diesem Zweck setzten wir den einzig erhältlichen direkt markierten AK von American Diagnostica ein. Sowohl PMN- als auch MBP-Zellen wurden isoliert, in Kultur gesetzt und teilweise mit LPS stimuliert. Dann wurden speziell die CD14-positiven Zellen auf ihre TF-Expression untersucht. Bei beiden Zellgruppen waren jedoch auffällig hohe Werte für den basalen TF zu sehen und die Stimulation mit LPS führte zu keiner deutlichen Erhöhung der TF-Expression. Die 2 plausibelsten Ursachen für dieses Phänomen wären, daß entweder die Zellen durch die Kultur im unphysiologischen *ex-vivo* System voraktiviert wurden und deswegen schon vor LPS-Stimulation relativ hohe Mengen an TF auf ihrer Oberfläche exprimierten, oder daß diese hohe TF-Werte methodisch bedingt durch eine unspezifische Bindung des Anti-TF-Antikörpers an Fc-Rezeptoren der Monozytenoberfläche entstanden. Deswegen neutralisierten wir als nächstes vor der AK-Markierung alle Fc-Rezeptoren mit dem FcR-Blocking-Reagent von MACS Magnetic Cell Sorting. Tatsächlich waren auf diese Weise die basalen TF-Werte viel niedriger und die TF-Expression stieg unter LPS-Stimulation deutlich an.

Das gleiche wurde auch bei den MM6-Zellen durchgeführt, um zu überprüfen, ob es auch bei diesen Zellen notwendig ist, die Fc-Rezeptoren vor der TF-Bestimmung zu blockieren. Tatsächlich produzierten auch die MM6-Zellen schon in unstimuliertem Zustand signifikante Mengen an Fc-Rezeptoren, die sowohl die unspezifische als auch die spezifische Bindung für TF beeinflussten. Da sich die Expression dieser Rezeptoren besonders nach Stimulation der Zellen stark erhöht hätte, blockierten wir für die weiteren Versuche bei beiden Zelllinien vor der TF-Bestimmung die Fc-Rezeptoren.

Als nächstes wollten wir bei den MM6-Zellen untersuchen, ob es notwendig ist, eine doppelparametrische TF- und CD14-Bestimmung durchzuführen. Dazu untersuchten wir die TF-Expression der Zellen einzelparametrisch als Gesamtpopulation nach ihrem Erscheinungsbild in der FSC/ SSC-Darstellung (gate A) und des weiteren speziell diejenige der CD14-positiven MM6-Zellen. Die Anzahl der Zellen in gate A, die TF exprimierten, war unabhängig von der Anzahl der Zellen, die CD14 exprimierten. Die CD14-positiven Zellen (gate G), die TF exprimierten, taten es in einer minimal höheren Menge im Vergleich zur Gesamtpopulation. Im Grunde genommen hätte eine 2-parametrische Bestimmung des TF (bezogen auf CD14) nicht viel mehr Information bei den MM6-Zellen geliefert, da diese anhand ihrer Größe und Granularität als relativ homogene Population gut zu erkennen waren und schon konstitutiv hohe Mengen an CD14 exprimierten.

Bislang hatten wir die isolierten Blutmonozyten nicht länger als 4h für die Stimulation mit LPS in Kultur gesetzt. Im Gegensatz zu den Zelllinien, wo TF schon konstitutiv in relativ hohen Mengen exprimiert wird, geschieht dies in unstimulierten peripher zirkulierenden Monozyten nicht. Da wir aber die Zellen nachfolgend längere Zeit mit den Hormonen *in vitro* behandeln wollten, was zu einer Kultur-bedingten TF-Erhöhung hätte führen können, kombinierten wir die basale TF-Expression mit einer Vitalitätsprüfung über 3 Tage. Wie erwartet, exprimierten die Zellen im Verlauf der Kultur mehr TF und es starben mehr Zellen ab, wobei sich eine relativ konstante Phase zwischen 24h und 48h ergab. Wir legten uns dann auf 48h als die längste Kulturdauer der Monozyten fest und führten zu diesem Zeitpunkt Stimulationen mit LPS durch, um die optimale LPS-Konzentration zu ermitteln. Im Gegensatz zu frisch isolierten PMN-Zellen, bei denen eine Erhöhung der LPS-Konzentration von 1ng/ml auf 1µg/ml zu keiner erheblichen Veränderung der schon maximalen TF-Expression geführt hatte, waren die MBP-Zellen nach 48h Kultur deutlich weniger empfindlich auf LPS. Erst eine LPS-Konzentration von 1µg/ml konnte zu einer deutlichen TF-Erhöhung führen.

### 7.3 Calcitriol

Monozyten sind die einzigen im Blut zirkulierenden Zellen, die in der Lage sind, TF, den hauptsächlichen Initiator der extrinsischen Koagulationskaskade, zu produzieren und spielen somit eine zentrale Rolle bei der Regulation von physiologischen und pathophysiologischen Reaktionen bezüglich des Gerinnungssystems. Es wurde tatsächlich eine Erhöhung des monozytischen TF sowohl bei septischen Patienten (Vickers et al 1998) als auch bei Patienten mit Leberzirrhose (Saliola et al 1998) beschrieben. Des weiteren wurde in verschiedenen *in vitro* Studien die monozytische TF-Expression nach Stimulation induziert (Luther et al 1990, van-der-Logt et al 1994). Wie aber auch von Osterud (1998) erwähnt, ist es sehr wichtig, den Unterschied zwischen Monozyten *in vivo* in ihrer normalen Umgebung und adhärennten *in vitro* kultivierten Monozyten zu berücksichtigen.

Nach einem kurzen Adhärierungsprozeß der isolierten mononukleären Zellen züchteten wir die MBP-Zellen in hydrophoben Kulturplatten an, damit sie für die restliche Versuchszeit in Suspension blieben. Trotzdem wurde deutlich gezeigt, daß ihre LPS-Sensitivität im Verlauf der Kultur, möglicherweise als Folge der Unterregulation der CD14-Expression, abnahm. Zudem stieg die konstitutive TF-Expression im Laufe der Zeit an. Beides ist als Zeichen eines stimulatorischen Effekts der unphysiologischen *in vitro* Kultur dieser Primärzellen zu werten. Tenno et al (1997) untersuchten die TF-Expression in monozytischen Zelllinien. Die unreifen U-937-Zellen exprimierten konstitutiv hohe Mengen an TF, eine zusätzliche Stimulation mit LPS konnte zu keiner weiteren Erhöhung dieser Expression führen. Im Gegensatz dazu besaßen die CD14-exprimierenden MM6-Zellen eine signifikant niedrigere Oberflächenexpression von TF, die sich nach Behandlung mit LPS deutlich stimulieren ließ, was ein möglicher Hinweis für eine Regulation der TF-Expression im Prozeß der Monozyt/ Makrophagen-Differenzierung sein könnte.

Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde zusätzlich die TF-Expression von 2 monozytischen Zelllinien untersucht, die sich in unterschiedlichen Stadien des monozytischen Differenzierungsweges befanden. Diese wurde, sowohl mit als auch ohne dem Differenzierungsinduktor Calcitriol, mit der reifer peripherer Monozyten verglichen.

Calcitriol führte tatsächlich zu einer Hochregulation der CD14- und zu einer Herunterregulation der TF-Expression in allen 3 Zellarten, was einem reduzierten prokoagulatorischen Effekt entsprechen könnte und im Einklang zu den von Koyama et al (1998a,b) beschriebenen antikoagulatorischen Eigenschaften von Calcitriol steht.

Obwohl aber Calcitriol die phänotypische Differenzierung aller Zellen induzierte, erhöhte es die LPS-Sensitivität bezüglich der TF-Expression nur bei den MM6-Zellen. Diese reagierten im Vergleich zu den Kontrollen mit einem erhöhten relativen Anstieg von TF auf LPS. Trotzdem waren die stimulierten Maximalwerte von TF niedriger unter Calcitriol, was die Differenzierungstheorie unterstützt. Die Zellen wurden also den peripheren Blutmonozyten ähnlicher, bildeten den LPS-Rezeptor CD14 in signifikant höheren Mengen aus, exprimierten sowohl im basalen als auch im stimulierten Zustand insgesamt weniger TF, und der relative Anstieg auf LPS unter Calcitriol war stärker, was möglicherweise über das CD14-Oberflächenantigen vermittelt wurde.

Die Behandlung der THP-1-Zellen mit Calcitriol hatte, verglichen mit der Behandlung der MM6-Zellen mit Calcitriol, einen unterschiedlichen Differenzierungseffekt; im allgemeinen wurde die TF-Expression herunterreguliert, aber der relative TF-Anstieg nach LPS-Stimulation war unter Calcitriol niedriger. Der Einfluß von Calcitriol auf die LPS-induzierte TF-Expression der THP-1-Zellen wurde noch nicht beschrieben. Oeth et al (1998) zeigten aber, daß Retinoinsäure, die ähnliche Differenzierungseffekte wie Calcitriol hat, die LPS-induzierte TF-Expression humaner Monozyten und THP-1-Zellen hemmt. In unseren Versuchen reagierten die Zellen interessanterweise auch mit einer erhöhten unspezifischen Bindung von Antikörpern auf ihrer Oberfläche. Ein erhöhtes unspezifisches Signal als Folge einer erhöhten Expression von Fc-Rezeptoren unter Calcitriol ist unwahrscheinlich, da wir die Fc-Rezeptoren vor Inkubation mit den Antikörpern blockierten. Außerdem beschrieben Boltz-Nitulescu et al (1995), mit Ausnahme von Fc $\alpha$ R, einen herunterregulierenden Effekt von Calcitriol auf die Expression von Fc-Rezeptoren auf THP-1-Zellen und auf anderen monozytischen Zellen und Monozyten. Da die Zellen auch mit einer erhöhten Streuung von Licht in beiden Winkeln (FSC, SSC) reagierten, kann man davon ausgehen, daß die Zellen unter Calcitriol im Durchschnitt größer und granulierter wurden, was die erhöhte unspezifische Bindung erklären könnte. Dies könnte Ausdruck einer Entwicklung dieser Zellen unter Calcitriol auf tiefere Stufen der monozytischen Zellreihe sein, die einem aktivierten makrophagenähnlichen Phänotyp entsprechen könnte. Die CD14-Expression nahm zwar zu und die basale TF-Produktion ab, der relative TF-Anstieg war aber unter Calcitriol niedriger.

Um diese Calcitrioleffekte bei den Zelllinien mit peripheren Blutmonozyten zu vergleichen, setzten wir MBP-Zellen in Kultur und inkubierten diese ebenfalls mit Calcitriol. Dabei konnten wir keine Veränderung des Parameters “% CD14-positive Zellen” bestimmen, weil wir die Monozyten gerade über ihre CD14-Expression identifiziert hatten. Trotzdem konnten wir die Intensität bestimmen (MCFI), mit der die CD14-positiven Zellen den Rezeptor exprimierten, und diese verdoppelte sich unter Calcitriol. Ähnlich wie bei den Zelllinien reduzierte sich auch die basale TF-Expression unter Calcitriol. Im Gegensatz zu den Zelllinien war aber bei diesen Zellen unter Calcitriol keine Induktion des TF mit LPS möglich. Obwohl also auch bei diesen Zellen die Expression des LPS-Rezeptors zunahm, waren die Zellen zumindest bezüglich TF überhaupt nicht mehr auf LPS empfindlich.

Der Einfluß von Calcitriol auf die Zytokinproduktion monozytischer Zellen war des öfteren der Gegenstand von Studien. Hinzusetzen von Calcitriol zu PMA-stimulierten U-937-Zellen führt zu einer synergistischen Erhöhung der mRNS für TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , bei HL-60-Zellen

nur zu einer Erhöhung von IL-1 $\beta$  (Bhalla et al 1991). Calcitriol erhöht die LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Produktion von Knochenmarksmakrophagen (Abu-Mer & Bar-Shavit 1994), hat aber einen inhibitorischen Effekt auf die Zytokinproduktion peripherer Blutmonozyten (Katakami et al 1991, Muller et al 1992, Zarrabeitia et al 1992, Muller et al 1991). Wir untersuchten den Einfluß von Calcitriol auf die TNF $\alpha$ -Produktion von MM6-Zellen und peripheren Blutmonozyten, und das Ergebnis war ähnlich wie bei TF. Die unreifen MM6-Zellen produzierten unter Calcitriol nach LPS-Stimulation signifikant höhere Mengen an TNF $\alpha$ , wohingegen die terminal differenzierten Monozyten unter Calcitriol in ihrer TNF $\alpha$ -Produktion gehemmt wurden.

Diese Ergebnisse bestätigen die starken immunmodulierenden Eigenschaften von Calcitriol und verdeutlichen die unterschiedlichen Differenzierungseffekte, die in monozytischen Zellen in Abhängigkeit vom ursprünglichen Differenzierungszustand der Zielzellen induziert werden.

## 7.4 Östradiol

Mossuz et al (1998) beschrieben einen inhibitorischen Effekt von E<sub>2</sub> auf die Proliferation von U-937-Zellen, welcher mit einem Zellzyklusstillstand und einer Akkumulation in der G2/M-Phase einherging. Um im physiologischen E<sub>2</sub>-Niveau zu bleiben, untersuchten wir Konzentrationen zwischen 100 und 1000pg/ml E<sub>2</sub> und es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Proliferationsrate (WF), der Zellvitalität oder dem DNS-Verteilungsmuster zwischen E<sub>2</sub>-behandelten und nicht-behandelten MM6-Zellen.

Dieselbe Arbeitsgruppe beobachtete auch eine signifikante Erhöhung der Expression des myelomonozytischen Markers CD13 und des monozytischen Markers CD64, wobei die Expression anderer granulomonozytischer Marker wie CD14 nicht anstieg. Andererseits zeigten Studien, daß eine Östrogenbehandlung von Kupffer-Zellen *in vivo* deren LPS-Empfindlichkeit über einen Anstieg von CD14 erhöht (Kono et al 2000, Yin et al 2000, Enomoto et al 1999).

Wir untersuchten den Einfluß von E<sub>2</sub> auf den Phänotyp nicht-stimulierter MM6-Zellen und es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der CD14- oder der TF-Expression. Dieses Ergebnis stimmt mit der Arbeit von Angstwurm et al (1997) überein, wo kein Effekt der *in vivo* Schwankungen von Östrogen während des Menstruationszyklus auf die CD14-Expression von Monozyten registriert wurde. Eine Östrogenbehandlung scheint also keinen Einfluß auf den Phänotyp nicht-stimulierter Monozyten zu haben.

Der *in vitro* Effekt von E<sub>2</sub> auf die TF-Expression wurde noch nicht gründlich untersucht. Es wurden klinische Studien durchgeführt, in denen Hämostaseparameter während der Ovarialstimulation für die *in vitro* Fertilisation untersucht wurden: Biron et al (1997) beobachteten eine Aktivierung des hämostatischen Systems im Sinne einer Erhöhung des D-Dimers und der Fragmente 1+2 auf Prothrombinebene während des Progesteronplateaus, wobei der E<sub>2</sub>-Peak keine signifikante Modifikation von Hämostasemarkern induzierte. Aune et al (1993) beschrieben nach Ovulationsinduktion eine erhöhte LPS-induzierte monozytische TF-Aktivität, wobei eine andere Studie der gleichen Arbeitsgruppe (Aune et al 1995) nach 12 Monaten Hormonsubstitutionstherapie eine signifikante Erniedrigung der TF-Aktivität LPS-stimulierter und nicht-stimulierter Monozyten beobachtete. Hölschermann et al (1999) untersuchten den E<sub>2</sub>-Effekt *in vitro* und beschrieben eine erhöhte TF-Gentranskription und NFkB Bindungsaktivität in Monozyten/ Makrophagen-Kulturen, die mit Östradiol behandelt wurden.

Wir untersuchten den E<sub>2</sub>-Effekt auf die TF-Expression aller 3 Zellarten sowohl im nicht stimulierten Zustand als auch nach Gabe von LPS. Die Menge an TF auf der Oberfläche der unstimulierten Zellen veränderte sich unter E<sub>2</sub> nicht. E<sub>2</sub> führte aber bei allen 3 Zellarten zu

einer signifikanten Erhöhung der TNF-Expression nach LPS-Stimulation, und dieser Effekt wurde nicht durch eine erhöhte Expression von CD14 vermittelt.

Anschließend wollten wir untersuchen, ob eine  $E_2$ -Vorbehandlung der MM6-Zellen und der peripheren Monozyten deren LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Produktion verändert. Dazu setzten wir die Zellen in Kultur und inkubierten sie, ähnlich wie beim TNF, mit verschiedenen  $E_2$ -Konzentrationen, stimulierten sie dann mit LPS und bestimmten TNF $\alpha$  im Überstand des Kulturmediums. Bei beiden Zellarten führte  $E_2$  ab einer Konzentration von 500pg/ml zu einer deutlichen Inhibition der LPS-induzierten TNF $\alpha$ -Produktion.

Polan et al (1990) untersuchten die IL-1-Produktion peripherer Monozyten von Frauen, bei denen eine Human Menopausal Gonadotropin(HMG)-stimulierte Ovulationsinduktion durchgeführt wurde. Es wurden Monozyten der späten folliculären Phase kurz vor HCG-Gabe mit am 12. Tag nach HCG-Gabe isolierten Monozyten verglichen und es wurde eine signifikant höhere monozytische IL-1-Bioaktivität in der Lutealphase im Vergleich zu der späten folliculären Phase beobachtet.

Die Tatsache, daß der höchste  $E_2$ -Peak in der späten folliculären Phase stattfindet, würde zur Annahme führen, daß die Inhibition der IL-1-Freisetzung übereinstimmend mit der in unserer Arbeit beschriebenen  $E_2$ -vermittelten Hemmung der TNF $\alpha$ -Freisetzung auf LPS  $E_2$ -vermittelt wird. Diese Unterschiede *in vivo* könnten jedoch Folge der hohen Progesteronspiegel während der Lutealphase des Zyklus sein. Im Gegensatz dazu beobachteten Angstwurm et al (1997) keine zyklische Veränderungen der TNF $\alpha$ -Freisetzung nach *ex-vivo* Stimulation von Vollblut mit LPS, wohingegen Schwarz et al (2000) während der Lutealphase des Zyklus eine niedrigere LPS-induzierte monozytische TNF $\alpha$ -Freisetzung im Vergleich zur folliculären Phase prämenopausaler Frauen beschrieben.

Verthelyi & Klinman (2000) verzeichneten auch eine höhere Anzahl von TNF $\alpha$ -produzierenden Zellen nach PHA-Behandlung während der folliculären Phase, dieser Unterschied erreichte aber keine statistische Signifikanz. Rogers and Eastell (1998) untersuchten den Effekt einer Östrogentherapie postmenopausaler Frauen auf Zytokine im peripheren Blut und beobachteten eine (nicht signifikante) Tendenz höherer stimulierter Mengen an IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  in der nicht-behandelten Frauengruppe.

Signifikante Unterschiede wurden von Elsässer-Beile et al (1992) beschrieben, die im Vergleich zu den Kontrollen eine reduzierte Produktion von IFN- $\gamma$  und TNF $\alpha$  Mitogen-stimulierter Vollblutkulturen schwangerer Frauen oder von Frauen, die orale Kontrazeptiva nahmen, verzeichneten. Die Ergebnisse von *in vivo* Studien auf den Einfluß von Östrogen auf die Zytokinproduktion sind also nicht schlüssig.

Es ist einfacher, den Einfluß von  $E_2$  auf die Zytokinproduktion von Monozyten *in vitro* zu untersuchen, weil man hiermit sowohl die Konzentration als auch die Dauer der Östrogenbehandlung der Zielzellen spezifisch regulieren kann. In diesem Fall besteht aber das Problem, daß die Ergebnisse abhängig von der Zellart, die als Modell benutzt wird, Unterschiede zeigen können.

Unser Befund steht im Einklang mit den Beobachtungen von Shanker et al (1994) mit THP-1-Zellen und mit Deshpande et al (1997) und Salem et al (1999) mit murinen Makrophagen, die einen inhibitorischen Effekt von Östrogen auf die TNF $\alpha$ -Freisetzung beschreiben; es gibt aber nur wenige Studien, die sich mit dem *in vitro* Effekt von  $E_2$  auf die TNF $\alpha$ -Freisetzung isolierter Monozyten befassen. Ralston et al (1990) verzeichneten eine Östrogen-induzierte Hemmung der TNF $\alpha$ -Freisetzung peripherer Blutmonozyten von postmenopausalen Frauen, aber nicht von prämenopausalen Frauen oder Männern. Evans et al (1997) beschrieben den gleichen Effekt, aber nur in prämenopausalen zyklierenden Frauen mit SLE und nicht in normalen Kulturen. Wir sahen diesen inhibitorischen  $E_2$ -Effekt sowohl bei der monozytischen Zelllinie MM6 als auch bei isolierten Blutmonozyten gesunder Männer.

Deshpande et al (1997) assoziierten diesen inhibitorischen E<sub>2</sub>-Effekt bei murinen Makrophagen mit einer reduzierten NFκB-Aktivierung. Srivastava et al (1999) schlugen vor, daß E<sub>2</sub> die TNFα-Produktion herunterregulieren könnte, indem es die Bindung von c-Jun/c-Fos- und Jun/c-Fos-Heterodimeren zur AP-1-Konsensussequenz am TNFα-Promoter durch eine Inhibition der JNK-Aktivität reduziert (ein für die murine myeloische Zelllinie RAW 264,7 beschriebener Effekt). Trotzdem bleibt der tatsächliche Mechanismus, durch den E<sub>2</sub> seine immunmodulierenden Effekte ausübt, noch weitgehend unklar.

### **7.5 Interaktion Östradiol/ Calcitriol**

Bisher ist sehr wenig über die interaktive Wirkung von Calcitriol und Östrogen auf Zellen der monozytischen Zellreihe bekannt. Beschrieben wurde, daß Östrogene die Anzahl der 1,25-Dihydroxyvitamin D-Rezeptoren auf osteoblastenähnlichen Zellen (Liel et al 1992, Ishibe et al 1995) steigern und daß sie den stimulierenden Effekt von Calcitriol auf die alkalische Phosphataseaktivität humaner Osteosarkom SaOS-2-Zellen (Rao et al 1996) erhöhen. Andererseits führt Calcitriol zu einer Herunterregulation des Östrogenrezeptors und hemmt Östrogenwirkungen auf MCF-7 humanen Mammakarzinomzellen (Swami et al 2000).

Unsere Ergebnisse schlagen keine direkt synergistischen oder antagonistischen Effekte von Calcitriol und E<sub>2</sub> vor, wenn sie gleichzeitig appliziert werden, trotzdem kann aber Calcitriol die E<sub>2</sub>-Effekte verstärken oder maskieren, indem es die LPS-Sensitivität der Zielzellen verändert. Die E<sub>2</sub>-induzierte Herunterregulation der TNFα-Freisetzung war sowohl bei den Calcitriol-behandelten als auch bei den nicht behandelten MM6-Zellen vorhanden, wobei die Calcitriol-behandelten peripheren Monozyten nach Stimulation so wenig TNFα produzierten, daß bei diesen Zellen keine weitere Hemmung durch E<sub>2</sub> zu sehen war. Ähnlich dazu war die E<sub>2</sub>-vermittelte Erhöhung der LPS-induzierten TF-Expression nur bei den MM6-Zellen unter Calcitriol am höchsten, weil nur diese Zellen mit einer Steigerung ihrer LPS-Empfindlichkeit zumindest bezüglich TF reagierten. Bei den THP-1-Zellen und den peripheren Monozyten, die auf Calcitriol mit einer Reduktion ihrer LPS-Empfindlichkeit reagierten, waren diese E<sub>2</sub>-Effekte nur bei den nicht-behandelten Zellen vorhanden.

Es wird deutlich, daß Östradiol und Calcitriol, beides Steroide, die zu den 2 großen Gruppen der nukleären Rezeptorfamilie gehören (Evans 1998), einen wesentlichen Einfluß auf Zellen der monozytischen Zellreihe haben und somit eine wichtige regulatorische Rolle in physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen spielen, die sowohl das Immun- als auch das Gerinnungssystem betreffen.

## VIII. Literaturverzeichnis

1. Abe E, Miyaura C, Sakagami H, Takeda M, Konno K, Yamazaki T, Yoshiki S & Suda T 1981 Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin  $D_3$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78** 4990-4994
2. Abu-Amer Y, Bar-Shavit Z 1994 Regulation of TNF $\alpha$  release from bone marrow-derived macrophages by vitamin D. *Journal of Cellular Biochemistry* **55(4)** 435-444
3. Agnello V, Pariser K, Gell J, Gelfand J & Turksoy RN 1983 Preliminary observations on Danazol therapy of systemic lupus erythematosus: effects on DNA antibodies, thrombocytopenia and complement. *Journal of Rheumatology* **10** 682-687
4. Ahmed SA, Penhale WJ & Talal N 1985 Sex hormones and autoimmune diseases: mechanisms of sex hormone action. *American Journal of Pathology* **121** 521-559
5. Angstwurm M, Gärtner R & Ziegler-Heitbrock HWL 1997 Cyclic plasma IL-6 levels during normal menstrual cycle. *Cytokine* **9(5)** 370-374
6. Ansar A, Dauphinee MJ & Talal N 1985 Effect of short term administration of sex hormones on normal and autoimmune mice. *Journal of Immunology* **134** 204-210
7. Aune B, Oian P & Osterud B 1993 Enhanced sensitivity of the extrinsic coagulation system during ovarian stimulation for in-vitro fertilization. *Human Reproduction* **8(9)** 1349-1352
8. Aune B, Oian P, Omsjo I & Osterud B 1995 Hormone replacement therapy reduces the reactivity of monocytes and platelets in whole blood - a beneficial effect on atherogenesis and thrombus formation? *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **173(6)** 1816-1820
9. Barak V, Biran S, Halimi M & Treves AJ 1986 The effect of estradiol on human myelomonocytic cells. II. Mechanism of enhancing activity of colony formation. *Journal of Reproductive Immunology* **9(4)** 355-363
10. Barak V, Maimovitz A, Weinstein D, Simon A, Maoz H, Kaiser N, Halimi M, Yagel S, Biran S & Treves A 1985 The effect of estradiol on human myelomonocytic cells. Enhancement of colony formation. *Journal of Reproductive Immunology* **7** 325-335
11. Baranao RI, Tenenbaum A, Sales ME & Rumi LS 1992 Functional alterations of murine peritoneal macrophages during pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology* **27(1-2)** 82-86
12. Benten WP, Lieberherr M, Giese G & Wunderlich C 1998 Estradiol binding to cell surface raises cytosolic free calcium in T cells. *FEBS Letters* **422** 249-353
13. Berthois Y, Katzenellenbogen JA & Katzenellenbogen BS 1986 Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83(8)** 2496-2500
14. Bhalla A, Amento E, Serog B & Glimcher L 1984  $1,25$ -Dihydroxyvitamin  $D_3$  inhibits antigen-induced T cell activation. *Journal of Immunology* **133** 1748-1755
15. Bhalla AK, Amento EP, Clemons TL, Holick HF & Krane SM 1983 Specific high-affinity receptors for  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin  $D_3$  in human peripheral blood mononuclear cells: presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **57** 1308-1310
16. Bhalla AK, Paavonen T, Williams MM, Delves PJ & Lydyard PM 1991 Regulation of interleukin-1 and tumour necrosis factor gene expression in myelomonocytic cell lines by  $1,25$ -dihydroxyvitamin  $D_3$ . *Immunology* **72(1)** 61-64
17. Biron C, Galtier-Dereure F, Rabesandratana H, Bernard I, Aguilar-Martinez P, Schved JF & Hedon B 1997 Hemostasis parameters during ovarian stimulation for in vitro fertilization: results of a prospective study. *Fertility and Sterility* **67(1)** 104-109

18. Boltz-Nitulescu G, Willheim M, Spittler A, Leutmetzer A, Tempfer C & Winkler S 1995 Modulation of IgA, IgE, and IgG Fc receptor expression on human mononuclear phagocytes by  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and cytokines. *Journal of Leukocyte Biology* **58** 256-262
19. Boorman GA, Luster MI, Dean JH & Wilson RE 1980 The effect of adult exposure to diethylbestrol in the mouse macrophage function and numbers. *Journal of the Reticuloendothelial Society* **28** 547-559
20. Bruneau C, Intrato L, Sobel A, Beaumont V & Billecoqo A 1986 Antibodies to cardiolipin and vascular complications in women taking oral contraceptives. *Arthritis and Rheumatism* **29** 1294
21. Budd RC, Cerottini JC & MacDoland HR 1987 Selectively increased production of interferon  $\gamma$  by subsets of Lyt-2+ and L3T4+ T cells identified by expression of Pgp-1. *Journal of Immunology* **138** 3583-3589
22. Butterworth MB, McClellan B & Alansmith M 1967 Influence of sex on immunoglobulin levels. *Nature* **214** 1224-1228
23. Carbone A, Piantelli M, Musiani P, Larocca LM, Aiello FB, Maggiano N, Scopetta C, Crucitti F & Ranelletti FO 1986 Estrogen binding sites in peripheral blood mononuclear cells and thymocytes from 2 myasthenia gravis patients. *Journal of Clinical and Laboratory Immunology* **21** 87-91
24. Casteels K, Bouillon R, Waer M & Mathieu C 1995 Immunomodulatory effects of  $1,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* **4** 313-318
25. Chao TC, Van Alten PJ & Walter RJ 1994 Steroid sex hormones and macrophage function: modulation of reactive oxygen intermediates and nitrite release. *American Journal of Reproductive Immunology* **32(1)** 43-52
26. Chao TC, Van Alten PJ, Greager JA & Walter RJ 1995 Steroid sex hormones regulate the release of tumor necrosis factor by macrophages. *Cellular Immunology* **160(1)** 43-49
27. Cohen JHM, Danel L, Cordier G, Saez S & Revillard JP 1983 Sex steroid receptors in peripheral T cells: absence of androgen receptors and restriction of estrogen receptors to OKT8-positive cells. *Journal of Immunology* **131** 2767-2771
28. Cohen MS, Mesler DE, Snipes RG & Gray TK 1986  $1,25$ -Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> activates secretion of hydrogen peroxide by human monocytes. *Journal of Immunology* **136** 1049-1053
29. Cutolo M 1999 Macrophages as effectors of the immunoendocrinologic interactions in autoimmune rheumatic diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* **876** 32-41
30. Cutolo M, Accardo S, Villaggio B, Barone A, Serio B, Sulli A, Decesari F, Picchetta F, Felli L, Cannella S, Granato L & Castagnetta L 1993a Cultured synovial tissue macrophages from rheumatoid synovium contain androgen receptors and metabolize testosterone. *European Journal of Histochemistry* **37** 76-77
31. Cutolo M, Accardo S, Villaggio B, Barone A, Sulli A, Coviello DA, Carabbio C, Felli L, Miceli D, Farruggio R, Carruba G & Castagnetta L 1996 Androgen and estrogen receptors are present in primary cultures of human synovial macrophages. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **81(2)** 820-827
32. Cutolo M, Accardo S, Villaggio B, Clerico P, Bagnasco M, Coviello DA, Carruba G, Io Casto M & Castagnetta L 1993b Presence of estrogen-binding sites on macrophage-like synoviocytes and CD8+, CD29+, CD45RO+ T lymphocytes in normal and rheumatoid synovium. *Arthritis and Rheumatism* **36(8)** 1087-1097
33. Cutolo M, Balleari E, Giusti M, Intra E & Accardo S 1991 Androgen replacement therapy in male patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* **34** 1-5

34. Cutolo M, Balleari E, Giusti M, Monachesi M & Accardo S 1986 Sex hormone status in women suffering from rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology* **13** 1019-1023
35. Cutolo M, Balleari E, Giusti M, Monachesi M & Accardo S 1988 Sex hormone status of patients with rheumatoid arthritis: evidence of low serum concentrations of testosterone at baseline and after human chorionic gonadotropin stimulation. *Arthritis and Rheumatism* **31** 1314-1317
36. Cutolo M, Sulli A, Serio B, Accardo S & Masi AT 1995 Estrogens, the immune response and autoimmunity. *Clinical and Experimental Rheumatism* **13** 217-226
37. D'Agostino, Milano S, Barbera C, Di Bella G, La Rosa M, Ferlazzo V, Faruggio R, Miceli DM, Miele M, Castagnetta L & Cillari E 1999 Sex hormones modulate inflammatory mediators produced by macrophages. *Annals of the New York Academy of Sciences* **876** 426-429
38. Danel L, Menouni M, Cohen JH, Magaud JP, Lenoir G, Revillard JP & Saez S 1985 Distribution of androgen and estrogen receptors among lymphoid and haemopoietic cell lines. *Leukemia Research* **9(11)** 1373-1378
39. Danel L, Souweine G, Monier JC & Saez S 1983 Specific estrogen binding sites in human lymphoid cells and thymic cells. *Journal of Steroid Biochemistry* **18** 559-563
40. Deshpande R, Khalili H, Pergolizzi RG, Michael SD & Chang MD 1997 Estradiol down-regulates LPS-induced cytokine production and NFkB activation in murine macrophages. *American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology* **38(1)** 46-54
41. Dinarello CA 1984 Interleukin 1. *Reviews of Infectious Diseases* **6** 51
42. Dresser DW 1962 Specific inhibition of antibody production. Protein over-loading paralysis. *Immunology* **7** 105-111
43. Durum SK, Schmidt JA & Oppenheim JJ 1985 Interleukin 1: an immunological perspective. *Annual Review of Immunology* **3** 263
44. Edgington TS, Mackman N, Brand K & Ruf W 1991 The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thrombosis and Haemostasis* **66** 67-79
45. Elsässer-Beile U, Kleist SV, Hölsch P, Mönting SJ & Werner I 1992 Cytokine levels in whole blood cell cultures of oral contraceptive users and pregnant women. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* **5(3)** 185-191
46. Enomoto N, Yamashina S, Schemmer P, Rivera CA, Bradford BU, Enomoto A, Brenner DA & Thurman RG 1999 Estriol sensitizes rat Kupffer cells via gut-derived endotoxin. *American Journal of Physiology* **277(3 Pt 1)** G671-677
47. Eperon S & Jungi TW 1996 The use of human monocytoïd lines as indicators of endotoxin. *Journal of Immunological Methods* **194** 121-129
48. Eperon S, De Groote D, Werner-Felmayer G & Jungi TW 1997 Human monocytoïd cell lines as indicators of endotoxin: comparison with rabbit pyrogen and Limulus amoebocyte lysate assay. *Journal of Immunological Methods* **207** 135-145
49. Evans JM, MacLaughlin S, Marvin DR & Abdou IN 1997 Estrogen decreases in vitro apoptosis of peripheral blood mononuclear cells from women with normal menstrual cycles and decreases TNF $\alpha$  production in SLE but not normal cultures. *Clinical Immunology and Immunopathology* **82(3)** 258-262
50. Evans RM 1998 The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240(4854)** 889-895
51. Flynn A 1984 Stimulation of interleukin-1 production from placental monocytes. *Lymphokine Research* **3(1)** 1-5
52. Flynn A 1986 Expression of Ia and the production of interleukin-1 by peritoneal exudate macrophages activated in vivo by steroids. *Life Sci* **38** 2455-60
53. Fox HS, Bond BL & Parslow TG 1991 Estrogen regulates the IFN- $\gamma$  promoter. *Journal of Immunology* **2** 205-209

54. Frankenberger M, Hofmann B, Emmerich B, Nerl C, Schwendener RA & Ziegler-Heitbrock HWL 1997 Liposomal 1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> compounds block proliferation and induce differentiation in myelomonocytic leukemia cells. *British Journal of Haematology* **98** 186-194
55. Frazier-Jessen MR & Kovacs EJ 1995 Estrogen modulation of JE/monocyte chemoattractant protein-1 mRNA expression in murine macrophages. *Journal of Immunology* **154(4)** 1838-1845
56. Friedman D, Netti F & Schreiber AD 1985 Effect of estradiol and steroid analogues on the clearance of immunoglobulin G-coated erythrocytes. *Journal of Clinical Investigation* **75(1)** 162-167
57. Gavison R & Bar-Shavit Z 1989 Impaired macrophage activation in vitamin D<sub>3</sub> deficiency: differential in-vitro effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on mouse peritoneal macrophage functions. *Journal of Immunology* **143** 3686-3690
58. Girasole G, Wang JM, Pedrazzoni M, Pioli G, Balota C, Passeri M, Lazzarin A, Ridolfo A & Mantovani A 1990 Augmentation of monocyte chemotaxis by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: stimulation of defective migration of AIDS patients. *Journal of Immunology* **145** 2459-2464
59. Graff RJ, Lappe MA & Snell GD 1969 The influence of the gonads and adrenal glands on the immune response to skin grafts. *Transplantation* **7** 105-111
60. Gulshan S, McCrudden AB & Stimson WH 1990 Oestrogen receptors in macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology* **31(6)** 691-697
61. Hall GM, Huskisson EC & Spector TD 1994 A randomised controlled trial of the effect of hormone replacement therapy on disease activity in postmenopausal rheumatoid arthritis. *Annales of the Rheumatic Diseases* **53** 112-116
62. Hanker G, Sorci-Thomas M & Adams MR 1995 Estrogen modulates the inducible expression of platelet-derived growth factor mRNA by monocyte/macrophages. *Life Sciences* **56(7)** 499-507
63. Haq AU 1989 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (calcitriol) suppresses concanavalin A-stimulated human T cell proliferation through monocytes. *Clinical Immunology and Immunopathology* **50** 364-373
64. Hazes JMW, Dijkmans BAC, Vanderbrouche LP & Cats A 1989 Oral contraceptive treatment for rheumatoid arthritis. An open study in 10 female patients. *British Journal of Rheumatology* **28(Suppl.I)** 24-27
65. Hedman M, Nilsson E & De la Torre B 1989 Low sulpho-conjugated steroid hormone levels in systemic lupus erythematosus. *Clinical and Experimental Rheumatology* **7** 583-588
66. Hewison M 1992 Vitamin D and the immune system. *Journal of Endocrinology* **132** 173-175
67. Hölschermann H, Terhalle HM, Zakel U, Maus U, Parvitz B, Tillmanns H & Haberbusch W 1999 Monocyte tissue factor expression is enhanced in women who smoke and use oral contraceptives. *Thrombosis and Haemostasis* **82** 1614-1620
68. Hu SK, Mitcho YL & Rath NC 1988 Effect of estradiol on interleukin 1 synthesis by macrophages. *International Journal of Immunopharmacology* **10(3)** 247-252
69. Huygen K & Paifliet K 1984 Strain variation in interferon  $\gamma$  production of BCG-sensitized mice challenged with PPD. *Cellular Immunology* **85** 75-79
70. Hynes RO 1987 Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* **48** 549-554
71. Iho S, Kura F, Sugiyama H, Takahashi T & Hoshino T 1985 The role of monocytes in the suppression of PHA-induced proliferation and IL-2 production of human mononuclear cells by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Immunology Letters* **11** 331-336
72. Ishibe M, Nojima T, Ishibashi T, Koda T, Kaneda K, Rosier RN & Puzas JE 1995 17 $\beta$ -estradiol increases the receptor number and modulates the action of 1,25-

- dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in human osteosarcoma-derived osteoblast-like cells. *Calcified Tissue Research* **57(6)** 430-435
73. Jakob F, Homann D & Adamski J 1995 Expression and regulation of aromatase and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 4 in human THP-1 leukemia cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **55(5-6)** 555-563
  74. Julkunen HA 1991 Oral contraceptives in systemic lupus erythematosus: side-effects and influence on the activity of SLE. *Scandinavian Journal of Rheumatology* **20** 427-433
  75. Jungers P, Kuttenn F, Liote F, Pelissier C, Athea N, Laurent MC, Viriot J, Dougados M & Bach JF 1985 Hormonal modulation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* **28** 1243-1250
  76. Jungers P, Nahoul K, Pelissier C, Dougados M, Tron F & Nach JF 1982 Low plasma androgens in women with active or quiescent systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* **25** 454-457
  77. Kanda N & Tamaki K 1999 Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **103(2Pt1)** 282-288
  78. Kanda N, Tsuchida T & Tamaki K 1999 Estrogen enhancement of anti-double-stranded DNA antibody and immunoglobulin G production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* **42(2)** 328-337
  79. Katakami N, Nakao Y & Fujita T 1991 Suppressive effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, and glucocorticoids on production of tumor necrosis factor-alpha by human peripheral blood adherent cells. *The Kobe Journal of the Medical Sciences* **37(3)** 179-188
  80. Kelsey SM, Newland AC, Cunningham J, Makin HLJ, Coldwell RD, Mills MJ & Grant IR 1992 Sustained haematological response to high-dose oral alfacalcidol in patients with myelodysplastic syndromes. *Lancet* **340** 316-317
  81. Koefler HP, Hirji K, Itri L & Group SCL 1985 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: in vivo and in vitro effects on human preleukemic and leukemic cells. *Cancer Treatment Reports* **69** 1399-1406
  82. Kono H, Wheeler MD, Rusyn I, Lin M, Seabra V, Rivera CA, Bradford BU, Forman DT & Thurman RG 2000 Gender differences in early alcohol-induced liver injury: role of CD14, NF-kappaB, and TNF-alpha. *American Journal of Physiology / Gastrointestinal and Liver Physiology* **278(4)** G652-661
  83. Koyama T & Hirosawa S 1998 Anticoagulant effects of synthetic retinoids and activated vitamin D<sub>3</sub>. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* **24(3)** 217-226
  84. Koyama T, Shibakura M, Ohsawa M, Kamiyama R & Hirosawa S 1998 Anticoagulant effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on human myelogenous leukemia cells and monocytes. *Blood* **92(1)** 160-167
  85. Kreutzig T 1994 Biochemie, Jungjohann Verlagsgesellschaft, 8.Auflage
  86. Lahita R, Brandlow HL, Kunkel HG & Fishman J 1981 Increased 16 alpha-hydroxylation of estradiol in systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **53** 174-178
  87. Lahita RG 1993 Sex hormones as immunomodulators of disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* **685** 278-287
  88. Lahita RG 1996a The connective tissue diseases and the overall influence of gender. *International Journal of Fertility* **41(2)** 156-165
  89. Lahita RG 1996b The basis for gender effects in the connective tissue diseases. *Annales de Medecine Interne (Paris)* **147(4)** 241-247
  90. Lahita RG, Kunkel HG & Brandlow HL 1983 Increased oxidation of testosterone in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* **26** 1517-1521

91. Landers JP & Spelsberg TC 1992 New concepts in steroid hormone action: Transcription factors, protooncogenes, and the cascade model for steroid regulation of gene expression. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* **2** 19-63
92. Lemire JM 1992 Immunomodulatory role of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Journal of Cellular Biochemistry* **49** 26-31
93. Lemire JM, Archer DC, Beck L & Spiegelberg HL 1995 Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: preferential inhibition of Th1 functions. *Journal of Nutrition* **125(6 Suppl)** 1704s-1708s
94. Lemire JM, Beck L, Faherty D, Gately MK & Spiegelberg HL 1994 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibits the production of IL-12 by human monocytes and B cells. In Vitamin D, a pluripotent steroid hormone: structural studies, molecular endocrinology and clinical applications. Edited by Norman AW, Bouillon R, Thomasset M. Berlin: Walter de Gruyter 531-539
95. Li ZG, Danis VA & Brooks PM 1993 Effect of gonadal steroids on the production of IL-1 and IL-6 by blood mononuclear cells in vitro. *Clinical and Experimental Rheumatology* **11** 157-162
96. Liel Y, Kraus S, Levy J & Shany S 1992 Evidence that estrogens modulate activity and increase the number of 1,25-dihydroxyvitamin D receptors in osteoblast-like cells (ROS 17/2.8). *Endocrinology* **130(5)** 2597-2601
97. Löffler G & Petrides P 1988, Physiologische Chemie Springer Verlag, 4. Auflage
98. London WT & Drew JR 1977 Antibody response to hepatitis B infection among patients receiving chronic dialysis treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74** 2561-2563
99. Luther T, Flossel C, Hietschold V, Koslowski R & Muller M 1990 Flow cytometric analysis of tissue factor expression on stimulated monocytes – comparison to procoagulant activity of mononuclear cells. *Blut.* **61(6)** 375-378
100. Mangelsdorf DJ, Koeffler HP, Donaldson CA, Pike JW & Haussler MR 1984 1,25Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced differentiation in a human promyelocytic leukemia cell line (HL-60): receptor-mediated maturation to macrophage-like cells. *Journal of Cell Biology* **98** 391-398
101. Manolagas SCD, Provvedini DM, Murray EJ, Tsoukas CD & Deftos LJ 1986 The antiproliferative effect of calcitriol on human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **63** 294-300
102. Maoz H, Kaiser N, Halimi M, Barak V, Haimovitz A, Weinstein D, Simon A, Yagel S, Biran S & Treves AJ 1985 The effect of estradiol on human myelomonocytic cells. 1. Enhancement of colony formation. *Journal of Reproductive Immunology* **7(4)** 325-335
103. Masi AT, Feigenbaum SL, Chatterton RT & Cutolo M 1995 Integrated hormonal-immunological-vascular (H-I-V triad) systems interactions in the rheumatic diseases. *Clinical and Experimental Rheumatology* **13(2)** 203-216
104. Masi AT, Josipovic DB & Jefferson WE 1984 Low adrenal-anabolic steroids in women with rheumatoid arthritis (RA): gas-liquid chromatographic (GLC) studies of RA patients and matched normal control women indicating decreased 11-deoxy-17-ketosteroid excretion. *Seminars in Arthritis and Rheumatology* **14** 1-23
105. Maziere C, Auclair M, Ronveaux MF, Salmon S, Santus R & Maziere JC 1991 Estrogens inhibit copper and cell-mediated modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis* **89(2-3)** 175-182
106. McCrohon JA, Nakhla S, Jessup W, Stanley KK & Celermajer DS 1999 Estrogen and progesterone reduce lipid accumulation in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* **100** 2319-2325

107. McFarland HL & Bigley NJ 1989 Sex-dependent, early cytokine production by NK-like spleen cells following infection with the D variant of encephalomyocarditis virus (EMCV-D). *Viral Immunology* **2** 205-209
108. Mellibovsky L, Diez A, Aubia J, Nogues X, Perez-Vila E, Serrano S & Recker RR 1993 Long-standing remission after 25-OH D<sub>3</sub> treatment in a case of chronic myelomonocytic leukemia. *British Journal of Haematology* **85** 811-812
109. Miller L & Hunt JS 1996 Minireview: Sex steroid hormones and macrophage function. *Life Sciences* **59(1)** 1-14
110. Miyaura C, Abe E, Kuribayashi T, Tanaka H, Konno K, Nishii Y & Suda T 1981 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> induces differentiation of human myeloid leukemia cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **102** 937-943
111. Mohan PF & Jacobson MS 1993 Inhibition of macrophage superoxide generation by dehydroepiandrosterone. *American Journal of Medical Sciences* **306(1)** 10-15
112. Mori H, Nakagawa M, Itoh N, Wada K & Tamaya T 1990 Danazol suppresses the production of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor by human monocytes. *American Journal of Reproductive Immunology* **24(2)** 45-50
113. Mori H, Sawairi M, Itoh N, Hanabayashi T & Tamaya T 1992 Effects of sex steroids on cell differentiation and interleukin-1 beta production in the human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Reproductive Medicine* **37(10)** 871-878
114. Morishita M, Miyagi M & Iwamoto Y 1999 Effects of sex hormones on production of interleukin-1 by human peripheral monocytes. *Journal of Periodontology* **70(7)** 757-760
115. Mossuz P, Cousin F, Castinel A, Chauvet M, Sotto MF, Polack B, Sotto JJ & Kolodie L 1998 Effects of two sex steroids (17 $\beta$  estradiol and testosterone) on proliferation and clonal growth of the human monoblastic leukemia cell line, U937. *Leukemia Research* **22(11)** 1063-1072
116. Muller K, Gram J, Bollerslev J, Diamant M, Berington T, Hansen MB & Bendtzen K 1991 Down-regulation of monocyte functions by treatment of healthy adults with 1 alpha, 25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *International Journal of Immunopharmacology* **13(5)** 525-530
117. Muller K, Haahr PM, Diamant M, Rieneck K, Kharazmi A & Bendtzen K 1992 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibits cytokine production by human blood monocytes at the post-transcriptional level. *Cytokine* **4(6)** 506-512
118. Müller K, Heilmann C, Poulsen LK, Barington T & Bendtzen K 1991 The role of monocytes and T cells in 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> mediated inhibition of B cell function in vitro. *Immunopharmacology* **21** 121-8
119. Munker R, Norman A & Koeffler HP 1986 Vitamin D compounds: effect of clonal proliferation and differentiation of human myeloid cells. *Journal of Clinical Investigation* **78** 424-430
120. Myron G, Rotstein J, Calvin C, Estrin I, Davidson A & Pincus G 1964 Norethynodrel in treatment of rheumatoid arthritis. *Journal of the American Medical Association* **190** 235-239
121. Nathan L, Pervin S, Singh R, Rosenfeld M & Chaudhuri G 1999 Estradiol inhibits leukocyte adhesion and transendothelial migration in rabbits in vivo. *Circ Res* **85** 377-385
122. Nemerson Y 1988 Tissue factor and hemostasis. *Blood* **71** 71-78
123. Nilsson B, Carlsson S, Damber MG, Lindblom D, Sodergard R & Shoultz B 1984 Specific binding of 17 $\beta$ -estradiol in the human thymus. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **149** 544-547

124. Oeth P, Yao J, Fan ST & Mackman N 1998 Retinoic acid selectively inhibits lipopolysaccharide induction of tissue factor gene expression in human monocytes. *Blood* **91(8)** 2857-2865
125. Okada M, Suzuki A, Mizuno K, Asada Y, Ino Y, Kuwayama T, Tamakoshi K, Mizutani S & Tomoda Y 1997 Effects of 17 $\beta$ -estradiol and progesterone on migration of human monocytic THP-1 cells stimulated by minimally oxidized low-density lipoprotein in vitro. *Cardiovascular Research* **34** 529-535
126. Olsen NJ & Kovacs WJ 1996 Gonadal steroids and immunity. *Endocrine Reviews* **17(4)** 369-384
127. Osterud B 1998 Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathophysiological roles. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* **9(suppl 1)** S9-S14
128. Paavonen T, Anderson LC & Adlercreutz H 1981 Sex hormone regulation of in vitro immune response. Estradiol enhances human B cell maturation via inhibition of suppressor T cells in pokeweed mitogen-stimulated cultures. *Journal of Experimental Medicine* **154** 1935-1945
129. Pacifici R, Rifas L, McCracken R, Vered I, McMurtry C, Avioli LV & Peck WA 1989 Ovarian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin 1 release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86(7)** 2398-2402
130. Polan ML, Daniele A & Kuo A 1988 Gonadal steroids modulate human monocyte interleukin-1 (IL-1) activity. *Fertility and Sterility* **49(6)** 964-968
131. Polan ML, Kuo A, Loukides J & Bottomly K 1990 Cultured human luteal peripheral monocytes secrete increased levels of interleukin-1. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **70** 480-484
132. Polan ML, Loukides J, Nelson P, Carding S, Diamond M, Walsh A & Bottomly K 1989 Progesterone and estradiol modulate interleukin-1 beta messenger ribonucleic acid levels in cultured human peripheral monocytes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **69(6)** 1200-1206
133. Polla BS, Healy AM, Amento EP & Krane SM 1986 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> maintains adherence of human monocytes and protects them from thermal injury. *Journal of Clinical Investigation* **77** 1332-1339
134. Poller L 1978 Oral contraceptives, blood clotting and thrombosis. *British Medical Bulletin* **34** 151-156
135. Provvedini DM & Manolagas SC 1989 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor distribution and effects in subpopulations of normal human T lymphocytes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **68** 774-779
136. Provvedini DM, Deftos LJ & Manolagas SC 1986 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> promotes in-vitro morphologic and enzymatic changes in normal human monocytes consistent with their differentiation into macrophages. *Bone* **7** 23-28
137. Provvedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ & Manolagas SC 1983 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptors in human leukocytes. *Science* **221** 1181-1183
138. Ralston SH, Russel RG & Gowen M 1990 Estrogen inhibits release of tumor necrosis factor from peripheral blood mononuclear cells in postmenopausal women. *Journal of Bone and Mineral Research* **5(9)** 983-988
139. Ranelletti FO, Piantelli M, Carbone A, Rinelli A, Scambia G, Panici PB & Mancuso S 1988 Type II estrogen-binding sites and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **67(5)** 888-892
140. Rao LG, Wylie JN, Kung-Sutherland MS & Murray TM 1996 17 $\beta$ -Oestradiol enhances the stimulatory effect of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on alkaline phosphatase

- activity in human osteosarcoma SaOS-2 cells in a differentiation-dependent manner. *Journal of Endocrinology* **148(1)** 181-187
141. Rhodes K, Scott A, Markhan RL & Monk-Jones ME 1969 Immunological sex differences. *Annals of the Rheumatic Diseases* **28** 104-119
  142. Rigby WFC & Waugh MG 1992 Decreased accessory cell function and costimulatory activity by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-treated monocytes. *Arthritis and Rheumatism* **35** 110-119
  143. Rigby WFC, Waugh M & Graziano RF 1992 Regulation of human monocyte HLA-DR on human peripheral blood monocytes. *Immunology* **75** 349-354
  144. Rogers A & Eastell R 1998 Effects of estrogen therapy of postmenopausal women on cytokines measured in peripheral blood. *Journal of Bone and Mineral Research* **13(10)** 1577-1586
  145. Roit IM, Brostoff J & Male DK 1996 Kurzes Lehrbuch der Immunologie, Georg Thieme Verlag, 3.Auflage
  146. Rudge SR, Kowanko IC & Drury PL 1983 Menstrual cyclicality of finger joint size and grip strength in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* **42** 425-430
  147. Salem ML, Hossain MS, Nomoto K 2000b Mediation of the immunomodulatory effect of  $\beta$ -estradiol on inflammatory responses by inhibition of recruitment and activation of inflammatory cells and their gene expression of TNF $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . *International Archives in Allergy and Immunology* **121(3)** 235-245
  148. Salem ML, Matsuzaki G, Kishihara K, Madkour GA & Nomoto K 2000a  $\beta$ -Estradiol suppresses T cell-mediated delayed-type hypersensitivity through suppression of antigen-presenting cell function and Th1 induction. *International Archives in Allergy and Immunology* **121(3)** 161-169
  149. Salem ML, Matsuzaki G, Madkour GA & Nomoto K 1999 Beta-estradiol-induced decrease in IL-12 and TNF- $\alpha$  expression suppresses macrophage functions in the course of Listeria monocytogenes infection in mice. *International Journal of Immunopharmacology* **21(8)** 481-497
  150. Saliola M, Lorenzet R, Ferro D, Basili S, Caroselli C, Santo AD, Sallese M & Violi F 1998 Enhanced expression of monocyte tissue factor in patients with liver cirrhosis. *Gut* **43(3)** 428-432
  151. Schreiber AD, Nettel FM, Sanders MC, King M, Szabolcs P, Friedman D & Gomez F 1988 Effect of endogenous and synthetic sex steroids on the clearance of antibody-coated cells. *Journal of Immunology* **141(9)** 2959-2966
  152. Schwarz E, Schäfer C, Bode JC & Bode C 2000 Influence of the menstrual cycle on the LPS-induced cytokine response of monocytes. *Cytokine* **12(4)** 413-416
  153. Shanker G, Sorci-Thomas M & Adams MR 1994a Estrogen modulates the expression of tumor necrosis factor  $\alpha$  mRNA in phorbol ester-stimulated human monocytic THP-1 cells. *Lymphokine and Cytokine Research* **13(6)** 377-382
  154. Shanker G, Sorci-Thomas M, Register TC & Adams MR 1994b The inducible expression of THP-1 cell interleukin-1 mRNA: effects of estrogen on differential response to phorbol ester and lipopolysaccharide. *Lymphokine and Cytokine Research* **13(1)** 1-7
  155. Spittler A, Willheim M, Leutmezer F, Ohler R, Krugluger W, Reissner C, Lucas T, Brodowicz T, Roth E & Boltz-Nitulescu 1997 Effects of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and cytokines on the expression of MHC antigens, complement receptors and other antigens on human blood monocytes and U937 cells: role in cell differentiation, activation and phagocytosis. *Immunology* **90(2)** 286-293

156. Srivastava S, Weitzmann MN, Cenci S, Ross FP, Adler S & Pacifici R 1999 Estrogen decreases TNF gene expression by blocking JNK activity and the resulting production of c-Jun and JunD. *Journal of Clinical Investigation* **104(4)** 503-513
157. Stimson WH 1988 Oestrogen and human T lymphocytes: Presence of specific receptors in the T-suppressor/cytotoxic subset. *Scandinavian Journal of Immunology* **28** 345-350
158. Suenaga R, Evans M, Mitamura K, Rider V & Abdou N 1998 Peripheral blood T cells and monocytes and B cell lines derived from patients with lupus express estrogen receptor transcripts similar to those of normal cells. *Journal of Immunology* **131** 2767-2771
159. Suenaga R, Mitamura K, Evans MJ & Abdou NI 1996 Binding affinity and quantity of estrogen receptor in peripheral blood monocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* **5(3)** 227-231
160. Swami S, Krishnan AV & Feldman D 2000  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> down-regulates estrogen receptor abundance and suppresses estrogen actions in MCF-7 human breast cancer cells. *Clinical Cancer Research* **6(8)** 3371-3379
161. Szekeres-Bartho J, Kilar F, Falkay G, Csernus V, Torok A & Pacsa AS 1985 The mechanism of the inhibitory effect of progesterone on lymphocyte cytotoxicity: I. Progesterone-treated lymphocytes release a substance inhibiting cytotoxicity and prostaglandin synthesis. *American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology* **9(1)** 15-18
162. Tanaka H, Abe E, Miyaura C, Kuribayashi T, Konno K, Nishii Y & Suda T 1982  $1\alpha,25$ -Dihydroxycholecalciferol and a human myeloid leukemia cell line (HL-60). *Biochemical Journal* **204** 713-719
163. Tenno T, Botling J, Öberg F, Nilsson K & Siegbahn A 1997 Tissue factor expression in human monocytic cell lines. *Thrombosis Research* **88(2)** 215-228
164. Tokuda N & Mizuki N 1992  $1,25$ -Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> down-regulation of HLA-DR on human peripheral blood monocytes. *Immunology* **75** 349-54
165. Van Ham G, Ceuppens J & Bouillon R 1989 T lymphocytes and their CD4 subset are direct targets for the inhibitory effect of calcitriol. *Cellular Immunology* **124** 320-333
166. van-der-Logt CP, Dirven RJ, Reitsma PH & Bertina RM 1994 Expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in monocytes in response to bacterial lipopolysaccharide and phorbol ester. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* **5(2)** 211-220
167. Vernon-Roberts B 1969 The effects of steroid hormones on macrophage activity. *International Review of Cytology* **25** 131-159
168. Verthelyi D & Klinman DM 2000 Sex hormone levels correlate with the activity of cytokine-secreting cells in vivo. *Immunology* **100(3)** 384-390
169. Verthelyi DI, Ahmed SA 1998 Estrogen increases the number of plasma cells and enhances their autoantibody production in nonautoimmune C57BL/6 mice. *Cellular Immunology* **189(2)** 125-134
170. Vessey MP 1982 Oral contraceptives and cardiovascular disease: some questions and answers. *British Medical Journal* **284** 615-616
171. Vickers J, Russwurm S, Dohrn B, Portele T, Spangenberg P, Reinhart K & Losche W 1998 Monocyte tissue factor (CD142) and MAC-1 (CD11b) are increased in septic patients. *Thrombosis and Haemostasis* **79(6)** 1219-1220
172. Wada K, Itoh T, Nakagawa M, Misao R, Mori H & Tamaya T 1992 Estrogen binding sites in peripheral blood monocytes and effects of danazol on their sites in vitro. *General Pharmacology* **23(4)** 693-700

173. Wuesten JJAM, Blankenstein MA, Gmelig-Meyling FHJ, Shuurman HJ, Kater L & Thijssen JHH 1986 Presence of estrogen receptors in human blood mononuclear cells and thymocytes. *Acta Endocrinologica (Copenh)* **112** 409-414
174. Yamada K, Hayashi T, Kuzuya M, Naito M, Asai K & Iguchi A 1996 Physiological concentration of  $17\beta$ -estradiol inhibits chemotaxis of human monocytes in response to monocyte chemoattractant protein 1. *Artery* **22(1)** 24-35
175. Yin M, Ikejima K, Wheeler MD, Bradford BU, Seabra V, Forman DT, Sato N & Thurman RG 2000 Estrogen is involved in early alcohol-induced liver injury in a rat enteral feeding model. *Hepatology* **31(1)** 117-123
176. Zarrabeitia MT, Riancho JA, Amado JA, Olmos JM & Gonzalez-Macias J 1992 Effect of calcitriol on the secretion of prostaglandin  $E_2$ , interleukin 1, and tumor necrosis factor alpha by human monocytes. *Bone* **13(2)** 185-18

## IX. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
BSA	Bovines Serum Albumin
CD14	Cluster of Differentiation 14
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E <sub>2</sub>	17β-Östradiol
ECD	R-Phycoerythrin und Texas Rot
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FITC	Fluorescein
FKS	Fötale Kalbserum
FSC	Forward Angle Light Scatter
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
IgG	Immunglobulin G
LPS	Lipopolysaccharid
MBP	Monozyten-bereicherte Population
MCFI	Mean Channel Fluorescence Intensity
MM6	Mono Mac 6
MW	Mittelwert
NFκB	Nuklear Factor kappa B
PBM	Periphere Blutmonozyten
Pcy5	R-Phycoerythrin und Cyanin
PE	R-phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PMN	Periphere Mononukleäre Zellen
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SD	Standard Deviation
SSC	Side Angle Light Scatter
TF	Tissue Factor
RA	Rheumatoide Arthritis
TNFα	Tumour Necrosis Factor α
Upm	Umdrehungen pro Minute
Vit.D <sub>3</sub>	1α,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> (Calcitriol)
h	Stunde
Mio	Millionen
Min	Minute
WF	Wachstumsfaktor
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses

## X. Anhang

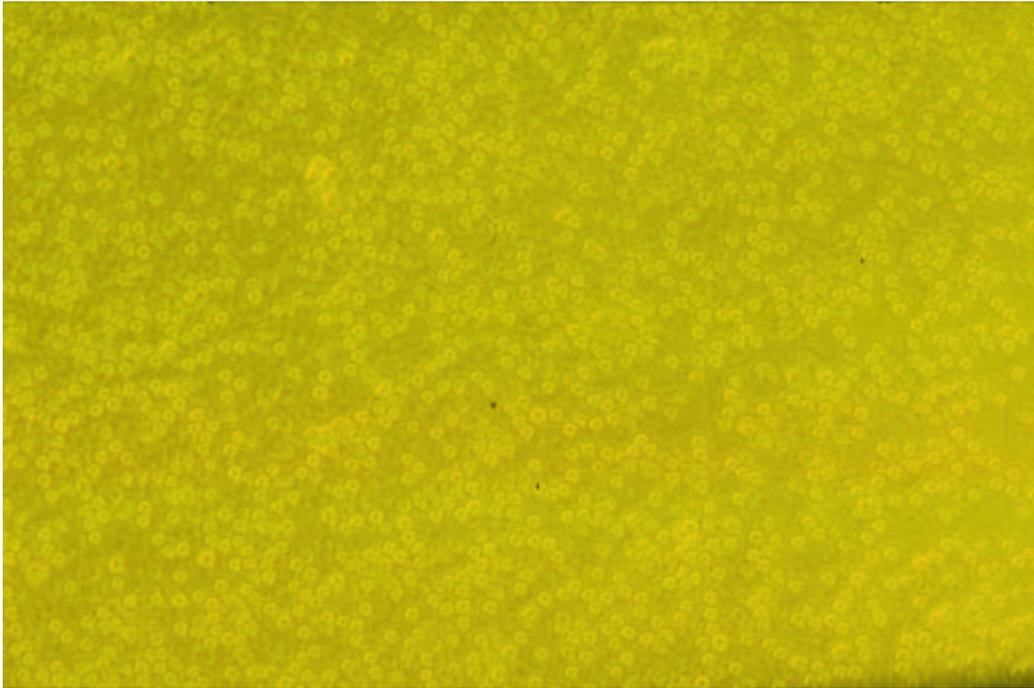


Photo 1: PMN-Zellen, ca. 100-fache Vergrößerung



Photo 2: PMN-Zellen, ca. 200-fache Vergrößerung, Ausschnittsvergrößerung von Photo 1

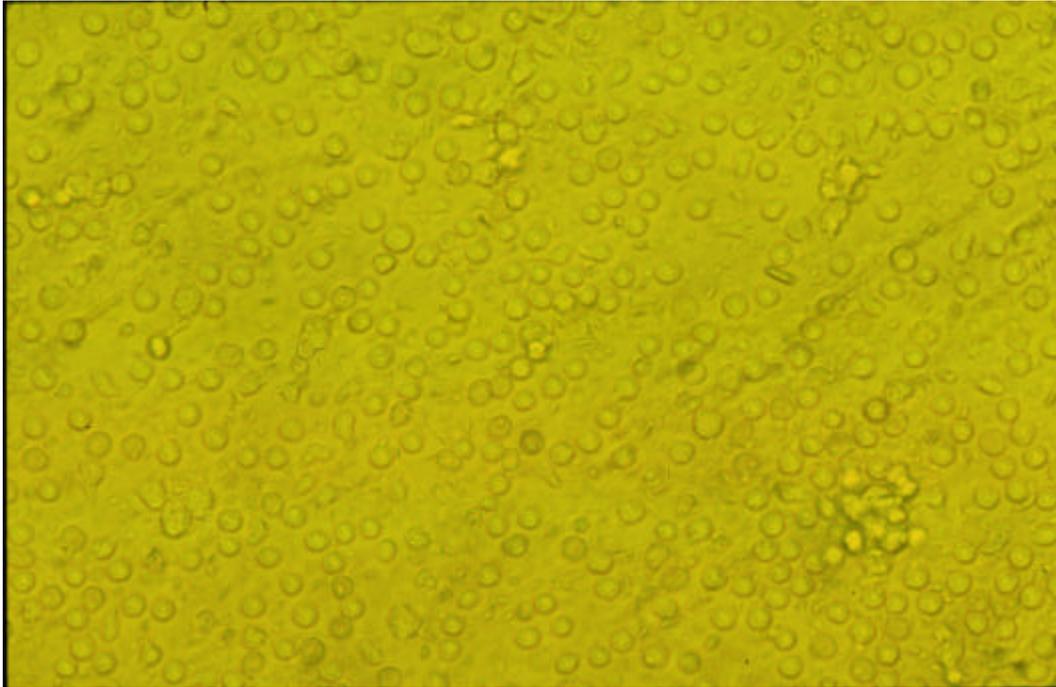


Photo 3: MBP-Zellen, ca. 100-fache Vergrößerung

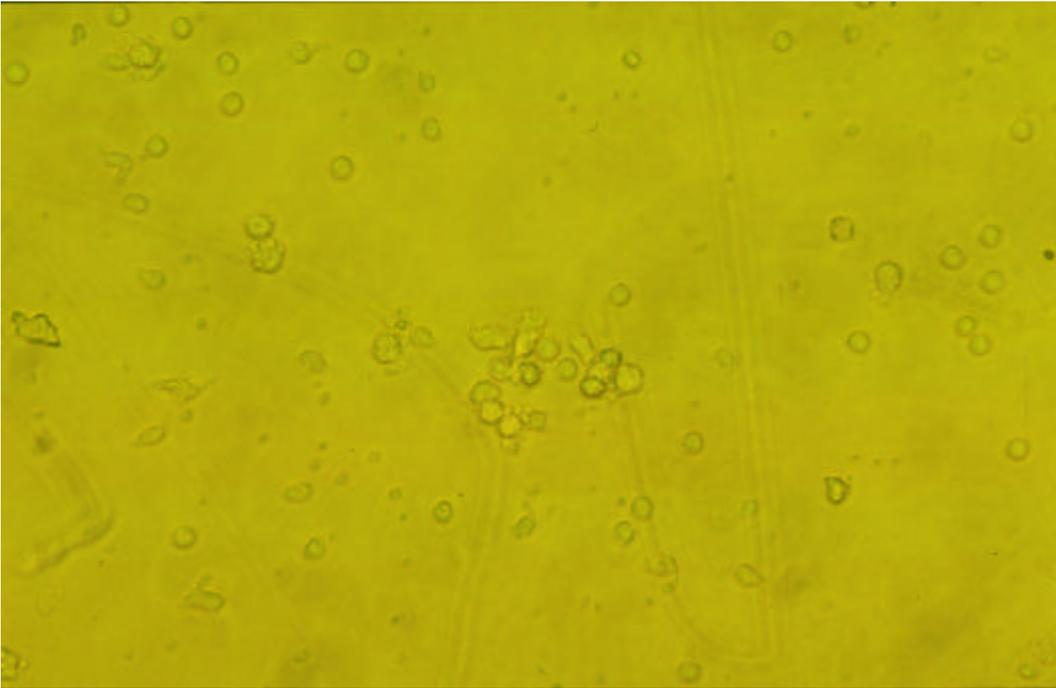


Photo 4: MBP-Zellen, ca. 200-fache Vergrößerung, Ausschnittsvergrößerung von Photo 3

## **XI. Lebenslauf**

George Vlotides

geboren, den 2. Dezember 1975 - in London / England

<b>Schul- besuch</b>	1981–1987	Grundschule der Republik Griechenland „Makedonika Ekpedeutiria“ in Thessaloniki, Griechenland
	1988-1993	Deutsche Schule Thessaloniki, Griechenland
<b>Studium</b>	Mai 1994	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
	März 1996	Ärztliche Vorprüfung, Fortsetzung des Medizinstudiums an der Technischen Universität München
	März 1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	August 1997	United States Medical Licensing Examination, Step 1
	Januar 1998	Beginn der Promotionsarbeit in der Endokrinologie bei Herrn Prof. Dr. R. Gärtner
	März 2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Fortsetzung des Medizinstudiums für das Praktische Jahr an der Ludwig-Maximilians-Universität München
	April – August 2000	PJ- Tertian in Chirurgie im Aristotelian University of Thessaloniki, Griechenland
	August – Dezember 2000	PJ- Tertian in Innere Medizin in der Medizinischen Klinik der LMU München, Standort Innenstadt
	Dezember – März 2001	PJ- Tertian in Frauenheilkunde in der Frauenklinik der LMU München, Klinikum Großhadern
	Juni 2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	August 2001	United States Medical Licensing Examination, Step 2
	Dezember 2001	Arzt im Praktikum, Medizinische Klinik II der LMU München, Klinikum Grosshadern
<b>Sprachen</b>		Deutsch, Englisch, Griechisch, Französisch, Italienisch, Spanisch