

**Aus dem Medizinischem Zentrum für Innere Medizin
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. R. Arnold
Abteilung für Poliklinik
Direktor: Professor Dr. P. von Wichert**

**Der Einfluß von Katecholaminen auf die
Interleukinproduktion von Monozyten in vitro**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin**

**dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt**

**von
Jakob Baron v. Engelhardt
aus Heidelberg**

Marburg 2001

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin

der Philipps-Universität Marburg am 21.06.2001

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Professor Dr. R. Arnold

Referent: Professor Dr. P. v. Wichert

Correferent: Professor Dr. Dr. K.-U. Hartmann

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
1. Vorwort	6
2. Einführung	7
2.1. Das Immunsystem	7
2.1.1. Monozyten/Makrophagen	9
2.1.1.1. Morphologie	10
2.1.1.2. Funktionen	11
2.1.2. Interleukine	14
2.1.2.1. Interleukin-1	14
2.1.2.2. Interleukin-6	16
2.1.2.3. Interleukin-12	17
2.1.2.4. Faktoren mit Einfluß auf die Interleukin-Produktion	19
2.1.2.5. Interleukine und Borreliose	21
2.2. Das autonome Nervensystem	23
2.2.1. Adrenozeptoren	24
2.2.1.1. Einteilung	24
2.2.1.2. Struktur der Adrenozeptoren	24
2.2.1.3. Transduktionsmechanismus	26
2.3. Einfluß des autonomen Nervensystems auf das Immunsystem	28
2.3.1. Innervation immunologischer Organe	28
2.3.2. Adrenozeptoren auf Leukozyten	29
2.3.3. Faktoren mit Einfluß auf die Adrenozeptorendichte	29
2.3.4. Einfluß des autonomen Nervensystem in vivo und in vitro	31
3. Fragestellung der Arbeit	38
4. Methoden	39
4.1. Arbeitsmaterial und Chemikalien	39
4.2. Monozytengewinnung	41
4.2.1. Monozyten/Lymphozytengewinnung mit Hilfe der Isopaque-Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation	41
4.2.2. Methoden zum Separieren von Monozyten	42
4.2.3. Durchführung des MACS	43

4.3. β-Rezeptorenbestimmung	45
4.3.1. Theorie der Radiorezeptorassays	45
4.3.2. ICYP-Verdünnungsreihe	48
4.3.3. Messung der Radioaktivität	49
4.3.4. Berechnung der Rezeptorzahl	49
4.4. Kulturansatz	53
4.5. Interleukinbestimmung	55
4.5.1. Prinzip der Interleukinbestimmung	55
4.5.2. Durchführung der Interleukinbestimmung	56
4.6. FACS	57
4.7. Statistik	58
5. Ergebnisse der Stimulationsversuche	59
5.1. Einführung	59
5.2. Stimulationserfolg	59
5.2.1. Einfluß von LPS	60
5.2.2. Einfluß von IFN- γ	61
5.2.3. Einfluß von Borrelien	61
5.3. Einfluß der Katecholamine	62
5.3.1. Einfluß nach Stimulation mit LPS	62
5.3.2. Einfluß nach Stimulation mit IFN- γ	64
5.3.3. Einfluß nach Stimulation mit Borrelien	70
5.4. β-Rezeptoren	74
5.4.1. Anzahl an β -Rezeptoren	74
5.4.2. Korrelation zwischen β -Rezeptoren und Katecholamineinfluß	74
5.5. Ergebnisse der FACS-Analyse	76
6. Diskussion	77
6.1. Methodenkritik	77
6.2. Stimulation mit LPS, IFN-γ und Borrelien	78
6.3. Einfluß von Katecholaminen auf Stimulationseffekte	81
6.3.1. Einfluß auf die Produktion von Interleukin-1 β	81
6.3.2. Einfluß auf die Produktion von Interleukin-6	84
6.3.3. Einfluß auf die Produktion von Interleukin-12	91
6.3.4. Einfluß auf Th ₁ - und Th ₂ -Antworten	92

6.3.5. Zusammenhänge zwischen Th ₁ -/Th ₂ -Antworten und Krankheiten	94
6.4. Adrenozeptoren	96
7. Zusammenfassung	98
8. Literaturverzeichnis	100
9. Anhang	124
9.1. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	124
9.2. Mittelwerte, Standardabweichungen und Anzahl der Messungen	126
9.3. Anzahl der gemessenen β-Rezeptoren bei den einzelnen Versuchen	130
9.4. Lebenslauf	131
9.5. Die akademischen Lehrer	133
9.6. Danksagung	134

1. Vorwort

Nervensystem und Immunsystem nehmen nicht unabhängig voneinander ihre Aufgaben wahr, sondern sind in der Lage, sich gegenseitig zu beeinflussen. Einflüsse des Nervensystems auf das Immunsystem sind seit beinahe 100 Jahren bekannt. Loeper und Crouzon beschrieben 1904 eine Leukozytose nach Injektion von Adrenalin, welches wenige Jahre zuvor von Otto von Fürth erstmals isoliert worden war (Loeper, 1904). Wittkower sprach 1929 von einer „Affektleukocytose“, die er durch emotionale Anspannung bei unter Hypnose ausgelöster Angst, Traurigkeit, Eifersucht und Freude auslöste (Wittkower, 1929). Nachdem diese Ergebnisse beinahe in Vergessenheit geraten sind, wird seit etwa 30 Jahren den Zusammenhängen zwischen Nervensystem und Immunsystem wieder vermehrt Aufmerksamkeit geschenkt. Neuroanatomische Untersuchungen zeigten eine ausgeprägte noradrenerge Innervierung primärer und sekundärer lymphatischer Organe. Auf den Zellen des Immunsystems konnten u.a. Rezeptoren für die Hormone des Nervensystems nachgewiesen werden. Die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin sind in der Lage, zahlreiche Immunfunktionen zu modulieren. Eine zentrale Rolle im Rahmen von Immunfunktionen nehmen Monozyten ein, die sich neben der Phagozytose, der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität und der Antigenpräsentation vor allem durch ihre sekretorischen Fähigkeiten auszeichnen. Insbesondere über die Interleukinproduktion nehmen Monozyten Einfluß auf zahlreiche Immunfunktionen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluß von Adrenalin und Noradrenalin auf die Interleukinproduktion von Monozyten. Es werden Monozyten in Kultur genommen, mit Lipopolysacchariden, Borrelien und Interferon- γ stimuliert und die Produktion von Interleukin-1, Interleukin-6 und Interleukin-12 nach Zugabe von Katecholaminen und Katecholaminantagonisten gemessen. Zusätzlich wird die Dichte der β -Rezeptoren auf den Monozyten bestimmt, um eine Korrelation zwischen einem Einfluß von Katecholaminen mit der Rezeptordichte nachzuweisen.

Zum besseren Verständnis wird im weiteren näher auf das Immunsystem, hier besonders auf Monozyten und die von ihnen produzierten Interleukine, auf das autonome Nervensystem und auf Zusammenhänge zwischen Immun- und Nervensystem eingegangen.

2. Einführung

2.1. Das Immunsystem

Der menschliche Körper hat sich täglich mit einer Vielzahl von Fremdorganismen auseinander zu setzen, hat sich dem Angriff von Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten zu erwehren. Dabei muß er in der Lage sein, zwischen „Selbst“ und „Fremd“ zu unterscheiden. Diese Aufgabe übernimmt das Immunsystem. Mit seinen verschiedenen Zellen gelingt es ihm, Fremdes zu erkennen und zu eliminieren und sich dadurch vor Infektionskrankheiten zu schützen.

Man kann ein angeborenes von einem erworbenen Immunsystem unterscheiden. Das entwicklungsgeschichtlich ältere angeborene Immunsystem bildet die erste Verteidigungslinie des Immunsystems. Unspezifisch reagiert es auf Fremdorganismen, auch wenn es noch nie Kontakt zu diesen gehabt hat. Ein wichtiger Mechanismus ist dabei die Phagozytose, das heißt die Aufnahme von Fremdmaterial in die Zelle, wo dieses abgebaut werden kann. Zellen, die diese Fähigkeit besitzen, vor allem die Makrophagen und die Granulozyten, haben demnach eine besondere Bedeutung bei der ersten Abwehr von Mikroorganismen. Auf die zahlreichen Funktionen, die die Makrophagen neben der Phagozytose wahrnehmen, wird noch ausführlich eingegangen. Granulozyten unterteilt man anhand der Anfärbbarkeit von Granula im Zytoplasma in neutrophile, eosinophile und basophile Zellen. Die neutrophilen Granulozyten bilden den größten Teil der Zellen des erworbenen Immunsystems. Neben der Phagozytose haben sie die Aufgabe, über die Synthese von Entzündungsmediatoren Entzündungsprozesse zu verstärken und aufrecht zu erhalten. Eosinophile Granulozyten spielen eine besondere Rolle bei der Abwehr von Parasiten. Basophile Granulozyten bilden Mediatoren, die für allergische Reaktionen zuständig sind.

Im Rahmen einer spezifischen Immunantwort lernt das Immunsystem bei einem Erstkontakt bestimmte Strukturen der Fremdorganismen, sogenannte Antigene, erkennen und ist dann bei erneutem Kontakt durch ein Gedächtnis, das es für die Antigene hat, in der Lage, schnell und gezielt auf den Fremdorganismus zu reagieren. Auf diesem Wege wird eine zeitweise, eventuell sogar lebenslange Immunität gegen ein Pathogen erworben. Die Zellen der spezifischen Immunantwort sind die Lymphozyten.

B-Lymphozyten produzieren Proteine, die für die humorale Immunität zuständig sind. Diese Proteine, die Antikörper, binden spezifisch an Antigene, markieren dadurch den Fremdorganismus, so daß dieser zerstört wird. B-Lymphozyten exprimieren auf ihrer Zellmembran Antikörper, den sie produzieren, können dadurch das Antigen erkennen und sich nach Kontakt mit diesem zu Antikörper sezernierenden Plasmazyten differenzieren.

T-Lymphozyten sind für die zelluläre spezifische Immunität zuständig, sie können direkt auf das Pathogen einwirken. Dafür besitzen sie in der Zellmembran T-Zell-Antigenrezeptoren, die ähnlich den Antikörpern spezifisch Antigene erkennen. Es gibt mehrere Subpopulationen der T-Lymphozyten, die unterschiedlich auf den Fremdorganismus reagieren: Zytotoxische T-Lymphozyten produzieren Substanzen, die zur Lyse der Eindringlinge führen. Sie sind damit unmittelbare Effektorzellen. Helfer-T-Lymphozyten (Th-Zellen) modulieren dagegen nur über die Produktion von Botenstoffen die Aktivität anderer immunologischer Zellen. Anhand der Zytokine, die sie produzieren, unterteilt man die Th-Zellen in zwei Subpopulationen, deren gemeinsame Vorläuferzelle die naive CD4⁺ T-Helferzelle ist. Man unterscheidet die Th₁-Zellen, die sich durch die Produktion von IL-2, IFN- γ und TNF- α auszeichnen und die vor allem die zelluläre Immunität anregen, und die Th₂-Zellen, die IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13 produzieren und die besondere Bedeutung für die Differenzierung und Aktivierung von B-Lymphozyten zu Antikörper produzierenden und sezernierenden Plasmazelle haben. Die naiven T-Helferzellen werden in ihrer Differenzierung durch Zytokine beeinflusst. IL-12, das von Antigen-präsentierenden Zellen produziert wird, ist in der Lage, die Differenzierung der naiven T-Helferzellen zu Th₁-Zellen zu induzieren, dagegen wird die Differenzierung zu Th₂-Zellen durch IL-4 angeregt. Th₁- und Th₂-Zellen können mit Zytokinen auf die eigene Differenzierung stimulierend und hemmend auf die der anderen Population einwirken. Eine Th₁-Antwort richtet sich vor allem gegen intrazelluläre Pathogene wie Tuberkuloseerreger und Leishmanien. Sie spielen vor allem durch ihre Produktion von IFN- γ eine Rolle bei der Aktivierung von zytotoxischen Zellen und damit verbunden zum Beispiel der Zerstörung von Tumoren. Th₂-Zellen sind über ihre Fähigkeit vor allem die Produktion von IgE zu stimulieren von Bedeutung bei der Abwehr von Parasiten (Paul, 1999). T-Lymphozyten können auch supprimierend auf das Immunsystem einwirken. Man geht heute nicht mehr davon aus, daß es eigens dafür Suppressor-T-Lymphozyten gibt, sondern nimmt an, daß jede

Subpopulation der T-Lymphozyten auf bestimmte Immunfunktionen hemmenden Einfluß hat. So scheinen Th₁-Zellen und Th₂-Zellen sich gegenseitig in ihrer Entwicklung zu hemmen.

Es gibt Lymphozytenpopulationen, die man weder den B- noch den T-Lymphozyten zuordnen kann. Man bezeichnet diese als Nullzellen, unter denen die Natürlichen-Killer-Zellen (NK-Zellen) eine wichtige Rolle einnehmen. Da sie verschiedene Differenzierungsmarker mit den T-Lymphozyten gemeinsam haben, scheinen sie sehr nahe verwandt mit diesen zu sein. Aufgabe der Natürlichen-Killer-Zellen ist es vor allem, virusinfizierte Zellen und Tumorzellen zu töten.

2.1.1. Monozyten/Makrophagen

Monozyten und Makrophagen stammen von pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks ab. Über Monoblasten und Promonozyten entwickeln sich die Monozyten. Die Monozytopoiese wird angeregt durch granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) und macrophage colony stimulating factor (M-CSF) (Nicola, 1986). Nachdem Monozyten das Knochenmark verlassen haben, zirkulieren sie für 8-70 Stunden im Blutsystem. Die Dauer, die Monozyten im Blut verbleiben, wird maßgeblich beeinflusst von im Laufe einer Entzündung gebildeten Produkten, die Monozyten veranlassen, an Endothelien zu adhäsieren und aus den Gefäßen in das Gewebe zu wandern (Chemotaxis) (Beekhuizen, 1993). Abhängig von dem Gewebe, in dem der Monozyt sich nun in eine Makrophage differenziert, entstehen unterschiedlichste Zellen, die 1924 von Aschoff unter dem Begriff retikulohistiozytären System zusammengefaßt wurden, das man heute als Monozyten-Makrophagen System bezeichnet (Aschoff, 1924). Hierzu gehören Alveolarmakrophagen, Peritonealmakrophagen, Kupffersche Sternzellen, Milzmakrophagen, Osteoklasten, Gelenkmakrophagen, Makrophagen des Bindegewebes, die Mikroglia im Gehirn und Makrophagen in der Niere. Im Immunsystem nehmen Makrophagen eine sehr zentrale Stellung ein. Sie übernehmen vielseitige Aufgaben, wie die Phagozytose, das Abtöten von Mikroorganismen durch antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität, die Präsentation von Antigenen und die Produktion einer nahezu unüberschaubaren Anzahl an sekretorischen Substanzen, die z.B. der Kommunikation mit anderen Zellen dienen.

2.1.1.1. Morphologie

Die Zellen des Monozyten-Makrophagen Systems sind mit einem Durchmesser von 12-30 μm relativ große Zellen. Sie haben einen ovalen bis nierenförmigen Zellkern. Ein gut ausgebildeter Golgi-Apparat deutet auf ihre sekretorischen Fähigkeiten hin. Ihr Zytosol beinhaltet zahlreiche Lysosomen, die mit phagozytiertem Material zu Phagolysosomen verschmelzen können. Auf ihrer Zellmembran findet man eine Vielzahl an Rezeptoren, so z. B. für IgG ($\text{Fc}\gamma\text{R1}(\text{CD64})$, $\text{Fc}\gamma\text{R2}(\text{CD32})$, $\text{Fc}\gamma\text{R3}(\text{CD16})$), für Komplementfaktoren, für zahlreiche Zytokine wie Interleukin 2 oder $\text{IFN-}\gamma$, für Hormone, unter anderem die für diese Arbeit wichtigen Rezeptoren für Katecholamine, und für Lipopolysaccharide (CD14). Monozyten und Makrophagen haben sowohl MHC-Klasse-1, als auch MHC-Klasse-2 Moleküle, was darauf hindeutet, daß sie zu den antigen-präsentierenden Zellen (APC) gehören. Eine große Anzahl an CD-Molekülen (cluster of differentiation) ist auf ihnen beschrieben worden, z.B. CD9, CD11a, CD11b, CD13, CD14, CD16, CD25, CD32, CD35, CD64, CD68 und CD71.

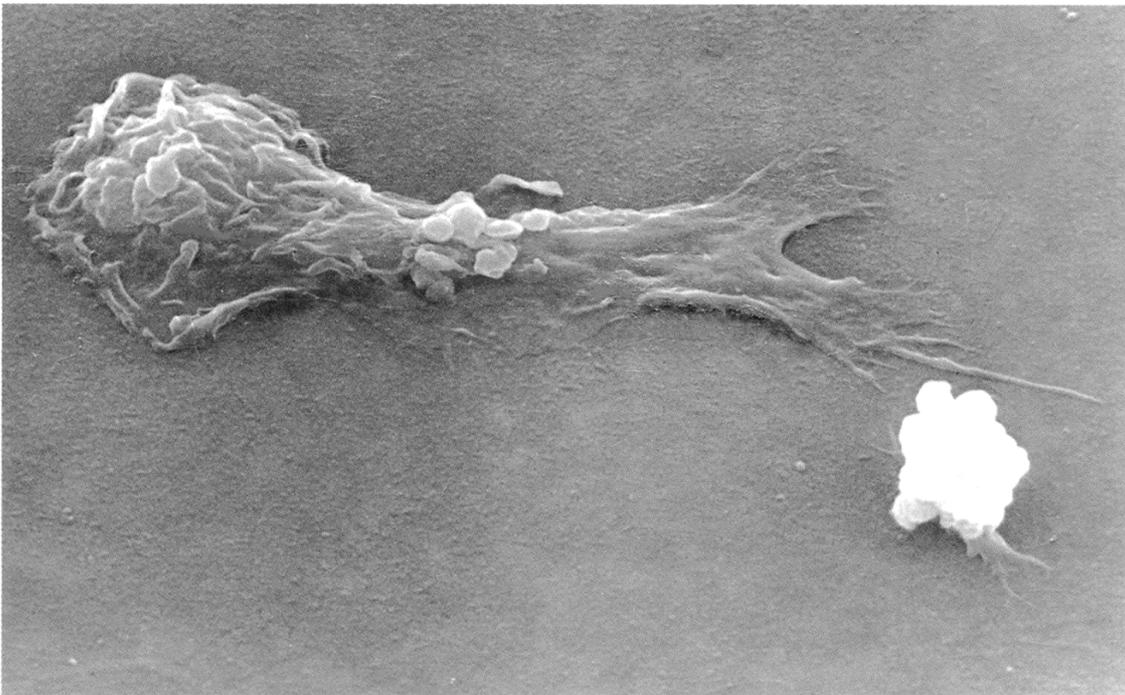


Abb. 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines aktivierten Makrophagen mit Zellausläufern (Pseudopodien), (Kirchner, 1993, S. 48)

2.1.1.2. Funktionen

a) Phagozytose

Makrophagen können Fremdkörper wie z.B. Pathogene durch Phagozytose in sich aufnehmen. Dafür müssen diese an die Zelle gebunden werden. Dies geschieht entweder direkt über Bindung von antigenen Oberflächenmolekülen wie Glykoproteinen an Rezeptoren (Stahl, 1992) oder über die Bindung von opsoniertem Material (Brown, 1991). Antigen-Antikörperkomplexe werden über Fc γ -Rezeptoren für IgG an Makrophagen gebunden (Unkeless, 1988). Hat das Pathogen an die Zelle gebunden, kann es phagozytiert werden. Die Zelle bildet dabei durch Einstülpung der Zellmembranbereiche, an die das Pathogen gebunden hat, sogenannte Phagosomen aus, die im Zellinnern mit Lysosomen zu Phagolysosomen verschmelzen. In diesen sorgen ein sehr niedriger pH-Wert, reaktive Sauerstoffmetaboliten und Enzyme wie Säurehydrolasen, Myeloperoxidasen und Muraminidasen für das Abtöten der Mikroorganismen und den Abbau der Fremdproteine (Elsbach., 1983; Moulder, 1985).

b) Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität

Können Makrophagen Pathogene nicht durch Phagozytose eliminieren, da diese zum Beispiel zu groß sind, zerstören sie, ähnlich wie NK-Zellen die Organismen mittels zytotoxischer Substanzen. Ein Pathogen muß dafür mit Antikörpern markiert sein. Die Bindung an Fc-Rezeptoren der Makrophagen führt dann zu einer Degranulation lytischer Substanzen, die den Fremdorganismus abtöten. Man bezeichnet dies als antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität. Über einen noch nicht genau bekannten Mechanismus können Makrophagen auch Zellen ,die nicht durch Opsonierung markiert sind, wie Tumorzellen erkennen und zerstören.

c) Antigenpräsentation

T-Lymphozyten können freie Antigene nicht direkt erkennen und auf sie reagieren. Sie müssen diese Antigenen präsentiert bekommen. Dies geschieht in Verbindung mit den MHC-Molekülen (major histocompatibility complex). Man unterscheidet beim Menschen zwei Sorten dieser auf der Zellmembran lokalisierten Glykoproteine. MHC-

Klasse-2 Moleküle, die von antigen-präsentierenden Zellen produziert werden (Kappes, 1988) binden durch Antigenprozessing in Phagolysosomen entstandene Proteinfragmente und präsentieren diese Th₁- und Th₂-Zellen (Germain, 1994). Diese wiederum wirken durch Zytokinproduktion auf die antigen-präsentierenden Zellen. Auf Grund einer sehr hohen Polymorphie und Polygenie weist die Bindungsstelle der MHC Moleküle interindividuell so unterschiedliche Struktur auf, daß das Abwehrsystem mit ihrer Hilfe „Selbst“ und „Fremd“ mit großer Sicherheit unterscheiden kann.

d) Aktivierung von Makrophagen

Damit Makrophagen nicht unkontrolliert körpereigenes Zellen angreifen, sind sie normalerweise in einem inaktiviertem Zustand. Erst wenn extrazelluläre oder intrazelluläre Erreger vernichtet und virusinfizierte sowie neoplastisch transformierte zerstört werden müssen, besteht die Notwendigkeit, die Makrophagen zu aktivieren. Früher nahm man an, daß es einen von Lymphozyten produzierten Faktor, den makrophagenaktivierenden Faktor (MAF), dafür gibt, heute weiß man, daß sich hinter diesem Begriff mehrere Substanzen verbergen (IFN- γ , GM-CSF, M-CSF, IL-2, IL-1, TNF- α und andere). Die Aktivierung der Makrophagen geschieht in zwei Schritten. Nach Voraktivierung durch Zytokine, besonders durch IFN- γ (Pace, 1983), werden sie durch unterschiedlichste Faktoren, wie Lipopolysaccharide (LPS), hitzeinaktivierte Mikroorganismen, von Lymphozyten gebildete Faktoren, wie Lymphotoxin, TNF- α und IL-1, zu vollständig aktivierten Makrophagen (Roberts, 1982; Chen, 1987).

Nach Aktivierung werden eine Reihe von Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α und G-CSF innerhalb von etwa 4-8 Stunden vermehrt produziert. Deutlich später, mit einem Maximum 24-48 Stunden nach LPS Stimulation, wird IL-10 von Monozyten produziert. Da IL-10 ein potenter Inhibitor der Zytokin-Produktion und der Expression von MHC-Klasse-2-Molekülen der Monozyten und Makrophagen ist, hat es eine den Verlauf einer Entzündung limitierende Bedeutung (de Waal, 1991). Bei Untersuchungen bezüglich der zerstörenden Aktivität der Makrophagen auf Tumorzellen zeigte sich, daß sich im ersten Schritt der Aktivierung durch IFN- γ die Anzahl an TNF- α -Rezeptoren auf den Makrophagen erhöht, so daß sich die Wirkung von TNF- α im zweiten Schritt der Aktivierung maßgeblich verstärkt (Rugiero, 1986). Man bezeichnet die Wirkung von

IFN- γ auf Makrophagen, durch die diese sensitiver für das endgültige Aktivierungssignal werden, als „Priming“. T-Helferzellen stimulieren mit IFN- γ das Exprimieren der MHC-Moleküle bei Makrophagen, die dadurch in verstärktem Maße fähig sind, Antigene zu präsentieren. Makrophagen können sich parakrin und autokrin durch TNF- α , IL-1 IFN- γ und CSF-1 aktivieren.

e) Sekretorische Fähigkeiten

Monozyten und Makrophagen gehören zu den sekretorisch aktivsten Zellen des Körpers. Weit über hundert sekretorische Faktoren werden von ihnen produziert, darunter Zytokine, Komplementfaktoren, proteolytische Enzyme, aggressive Sauerstoffprodukte, Gerinnungsfaktoren, Fibronectin und Wachstumsfaktoren. Mit Hilfe dieser Produkte werden von Monozyten und Makrophagen eine Vielzahl immunologischer Prozesse beeinflusst, Entzündungen gefördert, aber auch gehemmt, Erreger und körpereigenes geschädigtes Gewebe beseitigt, andere Zellen zu Wachstum und Differenzierung stimuliert.

Tab. 1: Auswahl sekretorischer Produkte von Monozyten/Makrophagen:

Zytokine und Polypeptid-Hormone	IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL 12, TNF- α , IFN- α , IFN- γ , TGF- β , CSF-1, G-CSF, GM-CSF, β -Endorphin, ACTH,
Komplementfaktoren	C1, C2, C3, C4, C5, Faktor B, D, H und I
Koagulatorische Faktoren	Thromboplastin, Faktor 5, 7, 9, 10, Prothrombin, Prothrombinase und Plasminogen-Aktivator Inhibitoren
Andere Plasma-Proteine:	α_2 -Makroglobulin, α_1 -Antiprotease, Lipomodulin, Fibronectin, Thrombospondin, Tranferrin, Transcobalamin, Apolipoprotein- E
Enzyme:	Phosphatase, Aryl-Sulfatase, Cholesteryl-Esterase, Ribonuclease, Lipasen, Glycosidasen, Proteinasen, Cathepsin B und D, Plasminogen Aktivator, Elastase, Kollagenasen, Lysozyme
Bioaktive Lipide:	Prostaglandin E2, F2a, I2, Thromboxan B2, Leukotriene, Prostacycline, Plättchen-aktivierende Faktoren
Reaktive Produkte:	O $_2$ -, H $_2$ O $_2$, OH, NO $_2$ -, NO $_3$ -

(Nathan, 1987; Cavaillon, 1994)

2.1.2. Interleukine

Interleukine (IL) sind Polypeptide, die der Kommunikation zwischen Leukozyten dienen. Ähnlich den endokrinen Hormonen wirken sie schon in sehr geringen Konzentrationen von etwa 10^{-10} - 10^{-15} M (Klein, 1991). Während jedoch die Hormone vor allem mit dem Blut transportiert über größere Entfernung Zellen beeinflussen, wirken Interleukine hauptsächlich lokal. Gemeinsam mit den Interferonen und Wachstumsfaktoren werden sie als Zytokine bezeichnet. Die Geschichte der Interleukine beginnt mit dem Interleukin-1, das 1972 entdeckt und 1979 als solches benannt wurde. Heute unterscheidet man schon an die 20 Interleukine, die alle auf verschiedene Weise Immunreaktionen modulieren, diese unterstützen oder auch hemmen, einzelne Zelltypen zur Proliferation, Differenzierung und Zytokin-Produktion anregen. Monozyten produzieren eine Reihe von Interleukinen (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12), die in bestimmten Bereichen auch gegenteilige Wirkungen haben. Eine zentrale Stellung bei dem Einfluß auf Immunantworten nehmen IL-1, IL-6 und IL-12 ein.

2.1.2.1. Interleukin-1

Interleukin-1 wurde 1972 zum ersten Mal als Lymphozyten-aktivierender-Faktor (LAF) beschrieben (Gery, 1972). Dieser Substanz, die sich aus dem Zellüberstand menschlicher Blutleukozyten isoliert ließ, war in der Lage, die Proliferation von Thymozyten zu stimulieren. Es zeigte sich wenige Jahre später, daß LAF mit einer zwei Jahre danach als B-Lymphozyten stimulierender Faktor (BAF) übereinstimmte. Seit 1979 bezeichnet man diese Substanz als Interleukin-1 (IL-1). Monozyten und Makrophagen sind die wichtigste Quelle für IL-1, aber auch von lymphatischen Zellen, Granulozyten, Fibroblasten, Keratinozyten, Langerhanszellen und glatten Muskelzellen wird das Interleukin produziert (Mahe, 1992).

a) Struktur von IL-1

IL-1 ist ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von etwa 17,5 kDa. Man unterscheidet ein IL-1 α von einem IL-1 β , beides Produkte von Genen, die auf dem Chromosom 2 liegen. Auch wenn sie beides Agonisten am selben Rezeptor sind, haben

sie doch nur 26 % homologe Aminosäuresequenzen. Auch durch isoelektrische Punkte von 5 und 6,8 unterscheiden sie sich deutlich voneinander. Während IL-1 α vor allem als Zelloberflächenmolekül juxtakrin auf andere Zellen wirkt, hat IL-1 β exozytotisch freigesetzt auch über größere Entfernung Einfluß.

Neben den beiden IL-1-Rezeptoragonisten wird von denselben Zellen, die IL-1 α und IL-1 β produzieren, auch ein ebenfalls 17,5 kDa umfassenden IL-1-Rezeptorantagonist gebildet. Er ist zu 19% mit IL-1 α und zu 26-30% mit IL-1 β homolog (Mahe, 1992). Er bindet sehr viel schwächer an den IL-1-Rezeptor, so daß er eine mindestens 100fach höhere Konzentration als IL-1 α und IL-1 β haben muß, um deren Effekte wirkungsvoll abzuschwächen. Als immunsuppressive Substanz soll der IL-1-Rezeptorantagonist zum Beispiel beim septischen Schock die Letalität senken.

b) IL-1-Rezeptor

Man unterscheidet zwei unterschiedliche IL-1-Rezeptoren. Den 80 kDa schwere Typ-1-Rezeptor findet man vor allem auf T-Lymphozyten, Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen und Chondrozyten, den 65 kDa umfassenden Typ-2-Rezeptor auf B-Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten, aktivierten T-Lymphozyten und Makrophagen. Eine Bindung von IL-1 an den Typ-2-Rezeptor auf der Zellmembran führt wahrscheinlich zu keiner Wirkung, als gelöster Rezeptor, der IL-1, bevor es an der Zelle wirken kann, abfängt, scheint er aber eine Bedeutung zu haben. IL-1 α hat eine größere Affinität zum Typ-1, IL-1 β zum Typ-2 (Sims, 1994).

c) Funktion von IL-1

IL-1 hat schon in Konzentrationen von 10^{-15} bis 10^{-13} M ein großes Spektrum von sehr vielseitigen Wirkungen, von denen einige besonders wichtige beschrieben werden sollen. Im Knochenmark erhöht IL-1 die Sensitivität der Stammzellen für koloniestimulierende Faktoren, dadurch steigert es die Hämatopoese, induziert die Produktion von Wachstumsfaktoren. Auf diesem Wege kann IL-1 die Myelosuppressiven Effekte von Radio- und Chemotherapie abschwächen. Im Thymus ist IL-1 ein wichtiger Faktor für die Reifung von T-Lymphozyten. Reife T-

Lymphozyten werden zur Teilung angeregt, es kommt zur vermehrten Produktion von IL-2, IL-4, IL-5 sowie IL-6 und Expression des IL-2 Rezeptoren. Die zytolytische Aktivität von natürlichen Killerzellen verstärkt sich unter dem Einfluß von IL-1. B-Lymphozyten werden in ihrer Proliferation und Differenzierung unterstützt, IL-1 führt zu einer Modulation der Antikörperproduktion. IL-1 stimuliert bei Makrophagen die Produktion von zahlreichen sekretorischen Substanzen wie IL-1, IL-6, TNF- α , Interferon, CSF, Prostaglandinen und Komplementfaktoren. IL-1 wirkt auf verschiedenen Wegen entzündungsfördernd. Granulozyten binden unter dem Einfluß von IL-1 verstärkt an Endothelzellen, was ihre Migration in Entzündungsgebiete unterstützt. Im Entzündungsgebiet werden vermehrt inflammatorische Substanzen freigesetzt. In der Leber steigert IL-1 die Bildung von Akute-Phase-Proteinen. Als endogenes Pyrogen ist IL-1 über eine vermehrte Freisetzung von Prostaglandinen für eine Sollwertverstellung der Körpertemperatur und damit für Fieber verantwortlich. IL-1 führt im Hypothalamus zur Produktion von CRH und damit zu einer vermehrten Freisetzung von ACTH. Dadurch erhöht sich die Konzentration an Glukokortikoiden im Blut. Zusätzlich vermindert IL-1 die Freisetzung an Gn-RH, LH und TSH. Bei der Pathogenese chronisch entzündlicher Erkrankungen scheint IL-1 eine wichtige Rolle zu spielen. So wurde in der Synovialflüssigkeit bei Patienten mit rheumatoider Arthritis eine erhöhte IL-1 Konzentration festgestellt. IL-1 beeinflusst Chondrozyten, Osteoblasten und Osteoklasten. Knochen und Knorpel werden abgebaut und es kommt zur Freisetzung von Prostaglandinen, Kollagenase und anderen entzündungsfördernden Substanzen.

2.1.2.2. Interleukin-6

B-cell-stimulatory factor 2, hybridoma/plasmocytoma growth factor, hepatocyte stimulating factor, monocyte/granulocyte inducer type 2, Interferon- β_2 , hämopoetischer Faktor 309 und Thrombopoetin sind nur einige der Bezeichnungen, unter denen Interleukin 6 (IL-6) beschrieben wurde. IL-6 wird unter anderem von Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Mast-Zellen, Astrozyten, Mikroglia, Fibroblasten, Endothelzellen, Osteoblasten, Keratinozyten, Synovialzellen, Chondrozyten, glatten Muskelzellen, Lydig-Zellen, und Tumorzellen produziert.

a) Struktur von IL-6

IL-6 ist ein aus 184 Aminosäuren bestehendes Protein, das abhängig vom Maße der Glykolisierung ein Molekulargewicht von 23-30 kDa hat. Es ist Produkt eines Gens, das auf dem Chromosom 7 lokalisiert ist.

b) IL-6-Rezeptor

Der IL-6-Rezeptor ist ein Polypeptid aus 468 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 80 kDa. Es gibt niedrig und hochaffine Rezeptoren für IL-6. Der Rezeptor hat strukturelle Ähnlichkeiten zum IL-2-, IL-3-, IL-4-, IL-7, Wachstumshormon- und Erythropoetin-Rezeptor. Die Anzahl an Rezeptoren auf Zellen liegt zwischen 100 und 20000. Der IL-6-Rezeptor wird exprimiert von Hepatozyten, Monozyten, aktivierten B-Lymphozyten, CD4+/CD8- und CD4-/CD8+ T-Lymphozyten. (Kishimoto, 1996)

c) Funktion von IL-6

B-Lymphozyten werden durch IL-6 in ihrer Proliferation und Differenzierung gefördert. Es kommt vermehrt zu einer Reifung zu antikörperproduzierenden Plasmazellen. IL-6 stimuliert bei T-Lymphozyten die Proliferation, Zytokinproduktion und Expression des IL-2-Rezeptors. Mononukleäre Phagozyten haben unter dem Einfluß von IL-6 eine erhöhte Phagozytosefähigkeit, sie exprimieren verstärkt den Fc-Rezeptor. In der Leber induziert IL-6 die Bildung von Akute-Phase-Proteinen durch Hepatozyten. Insbesondere im Rahmen von inflammatorischen, aber auch autoimmunen Erkrankungen findet man erhöhte Konzentrationen an IL-6. Gemeinsam mit IL-3 ist IL-6 ein wichtiger Faktor für die Proliferation von Stammzellen im Knochenmark. Neben IL-1 ist IL-6 ein Interleukin, daß Fieber hervorruft. Außerdem ist es wie IL-1 ein Aktivator der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse, es bewirkt vor allem eine verstärkte Freisetzung von ACTH. Da Glukokortikoide hemmend auf die Produktion von IL-6 wirken, kann IL-6 über die Freisetzung von ACTH und den damit verstärkten Einfluß von Glukokortikoiden hemmend auf die eigene Produktion wirken (Papanicolaou, 1998).

2.1.2.3. Interleukin-12

Interleukin-12 (IL-12) wurde von vier Arbeitsgruppen unter den Namen cytotoxic lymphocyte maturation factor (Gately, 1991), natural killer cell stimulatory factor (Trinchieri, 1996), T-cell stimulating factor (Germann, 1993) und IL-2 receptor inducing factor (Kato, 1992) beschrieben. Zuerst wurde IL-12 als Produkt von B-Lymphozyten isoliert. Später zeigte sich daß die Hauptproduzenten Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen sind. Daneben wird es in geringen Mengen von Langerhans-Zellen, Mikroglia, Astrozyten, Mastzellen, und Granulozyten produziert.

a) Struktur von IL-12

Das 70-75 kDa schwere IL-12 setzt sich aus zwei über eine Disulfid-Brücke verbundene Polypeptid-Ketten, IL-12p40 und IL-12p35, zusammen. Das 306 Aminosäuren umfassende IL-12p40, dessen Gen auf dem Chromosom 5 lokalisiert ist, zeigt Homologien zur α -Kette des IL-6-Rezeptors. IL-12p35 setzt sich aus 197 Aminosäuren zusammen, das dazugehörige Gen liegt auf Chromosom 3, es zeigt Homologien zum IL-6. IL-12p40 wird von den IL-12 sezernierenden Zellen in weit größerem Maße produziert als IL-12p35. Ohne IL-12p35 ist IL-12p40, das als Monomer oder Homodimer sezerniert wird, ein schwacher IL-12 Antagonist. Bei einer aktivierten Zelle verschiebt sich das Verhältnis von IL-12p40 zu IL-12p35 von ungefähr 100:1 in einen nahezu äquivalenten Bereich von etwa 5:1, so daß die Wirkung des nun verstärkt sezernierten IL-12 die des schwachen Antagonisten IL-12p40 weit übertrifft.

b) IL-12-Rezeptor

Der IL-12 Rezeptor setzt sich einer 100 kDa und einer 130 kDa schweren Kette zusammen. Er gehört zur Zytokin-Rezeptor-Superfamilie mit Ähnlichkeiten zu IL-6-, LIF- und G-CSF-Rezeptoren.

c) Funktion von IL-12

IL-12 hat für zwei Zellgruppen besonders große Bedeutung, NK-Zellen und T-

Lymphozyten beeinflusst es in ihrer Proliferation, Zytokin-Produktion, vor allem in der Produktion von IFN- γ , und es verstärkt deren zytotoxische Aktivität. Eine wichtige Funktion von IL-12 ist die Induktion einer Differenzierung von naiven CD4⁺-T-Lymphozyten zu IFN- γ produzierenden Th₁-Zellen und eine Hemmung der Differenzierung zu IL-4 produzierenden Th₂-Zellen. IL-12, das relativ früh nach Kontakt mit Fremdorganismen sezerniert wird, kann so eine Immunantwort in Richtung Th₁-Antwort lenken und ist damit auch ein wichtiges Zytokin für die Verbindung vom angeborenem unspezifischem zum erworbenem spezifischem Immunsystem. Antagonistisch auf diese Th₁-Antwort induzierte Fähigkeit von IL-12 wirken IL-4 und IL-10, sie hemmen die Produktion von IL-12 und IFN- γ und sind ihrerseits in der Lage, die Differenzierung zu Th₂-Zellen zu stimulieren (Paul, 1999). IL-12 stimulierte Zellen produzieren vermehrt IFN- γ , TNF- α , GM-CSF und IL-2, IL-3 und IL-9. Die verstärkte Produktion an IFN- γ ist besonders wichtig, über IFN- γ entfaltet IL-12 einen großen Teil seiner Wirkungen. Bei aktivierten B-Lymphozyten kann IL-12 indirekt über IFN- γ die Sekretion von Immunglobulinen verstärken und führt zu einem Ig-Shift von IgG1 und IgE zu IgG2. Gemeinsam mit anderen Wachstumsfaktoren wie IL-3 regt IL-12 hämatopoetische Zellen zur Proliferation und Differenzierung an. Bei Tieren konnte nachgewiesen werden, daß IL-12 zur Regression von Tumoren und zur Reduktion von Metastasierung führt. Dies wird vermittelt über eine verstärkte antitumorale Immunität, Inhibierung der Angiogenese und Produktion von E-Cadherin, das supprimierend auf Metastasen wirkt (Hiskox, 1997).

2.1.2.4. Faktoren mit Einfluß auf die Interleukin-Produktion

Eine Vielzahl an Faktoren können Makrophagen zum Produzieren von IL-1 anregen, wie z.B. Zellwandprodukte von Bakterien, LPS, Leukotriene, Komplementfaktoren (C5a), Immunkomplexe, ultraviolette Strahlung, Viren, Parasiten und andere Mikroorganismen. Indirekt können Faktoren durch die Sekretion von Zytokinen wie Lymphotoxin, GM-CSF und IL-1 durch Lymphozyten zu einer IL-1 Produktion führen (Krakauer, 1996). Durch LPS induzierte Produktion von IL-1 kann intrazellulär nach 2 Stunden, extrazellulär kurze Zeit danach gemessen werden. Einen Peak in der Produktion kann man nach 4 Stunden beobachten (de Bont, 1996). IL-1 Produktion konnte nach Stimulation mit LPS in Konzentrationen ab 0.01ng/ml beobachtet werden,

für einen Einfluß auf die IL-6 Produktion benötigte man noch höhere LPS Konzentrationen (Zhong, 1993). Hemmenden Einfluß auf die eigene Produktion hat IL-1 durch negativen „Feedback“, ähnlich dem, den man bei der Selbstregulation von Hormonen kennt. Im ZNS stimuliert IL-1 die ACTH-Synthese, erhöht dadurch die Glukokortikoidkonzentration im Körper. Glukokortikoide wirken hemmend auf die Produktion von IL-1, so daß IL-1 die eigene Synthese via ZNS hemmt. LPS und Borrelien stimulieren die Produktion von IL-6 bei Monozyten und Makrophagen (Giambartolomei, 1999; Biondillo, 1994).

Es gibt zwei wichtige Wege, auf denen Zellen zur Produktion und Sekretion von IL-12 angeregt werden. Erstens geschieht dies bei Kontakt mit Bakterienmaterial (z.B LPS, Borrelien), mit Viren und mit intrazellulären Parasiten, zweitens bei Kontakt mit aktivierten Th₁-Lymphozyten, die CD40 exprimieren. IL-10 hat einen hemmenden Einfluß auf die Produktion von IL-12. Da Monozyten und Makrophagen selbst IL-10 produzieren, können sie inhibitorisch auf die eigene Produktion von IL-12 wirken und haben damit einen limitierenden Einfluß auf Entzündungsreaktionen (Isler, 1999).

IFN- γ ist allein nicht in der Lage die Produktion von IL-1, IL-6 und IL-12 zu steigern. In Kombination mit anderen Stimulantien wie LPS beobachtet man einen Priming-Effekt, es wird dann die Produktion sehr viel deutlicher gesteigert als nur mit dem Stimulans (Gerrard, 1987; Biondillo, 1994; Hayes, 1995).

Tab. 2: Faktoren mit Einfluß auf die Produktion von IL-1, IL-6 und IL-12:

IL-1:	Stimulierend	LPS, IL-2, TNF- α , TGF- β , IL-1, Borrelien (Miller, 1993)
	Inhibierend	IFN- α , IL-4, IL-10, TGF- β (Sone, 1994; Donnelly 1991)
	Priming-Effekt	TNF- α , IFN- γ , IL-2 (Danis, 1990), IFN- γ , Cycloheximide (Arend, 1988), IL-3 (Cohen, 1991)
IL-6:	Stimulierend	LPS (Biondillo, 1994), Borrelien (Giambartolomei, 1999)
	Inhibierend	IL10 (de Waal, 1991)
	Priming-Effekt	IFN- γ (Biondillo, 1994), IL-3 (Cohen, 1991)
IL-12:	Stimulierend	LPS (Hayes, 1995), Mycobacterium tuberculosis, Borrelien (Infante-Duarte, 1997)
	Inhibierend	IL-4, IL-10 (Isler, 1999), IL-13, TGF- β , (Xiaojing, 1996) Prostaglandin E2 (van der Pouw Kraan, 1995)
	Priming-Effekt	IFN- γ (Hayes, 1995)

2.1.2.5. Interleukine und Borreliose

Borrelien induzieren die Produktion von IL-1, IL-6 (Giambartolomei, 1999) und IL-12 (Infante-Duarte, 1997). Die Bedeutung der stimulierenden Fähigkeiten von Borrelien bezüglich der Interleukine IL-1, IL-6 und IL-12 wird deutlich, wenn man sich den Einfluß der drei Interleukine auf den Krankheitsverlauf der Borreliose vor Augen hält. IL-1 scheint für viele der klinischen Symptome der Borreliose mitverantwortlich zu sein (Beck, 1989). Bei der Borreliose spielt IL-1 vor allem eine große Rolle bei der Auslösung von Fieber, Unwohlsein, Erythema migrans und Arthritis (Diehl, 1989). Miller et al weisen darauf hin, daß eine hohe Konzentration an IL-1 β und vor allem ein großes Verhältnis von IL-1 β zu dem IL-1 Antagonisten (IL-1ra) mit besonders schwerem Verlauf der Borreliose einhergeht. Vor allem die Erholungszeit von der Arthritis sei verlängert (Miller, 1993). IL-1 ruft, wenn es bei Hasen intradermal in die Hinterläufe injiziert wird, Hautveränderungen hervor, die einem Erythema chronicum migrans sehr ähnlich sind (Beck, 1986). Kelleher beobachtete im Frühstadium nach Infektion mit Borrelien im Herzgewebe von Mäusen vor allem IL-1 β , aber auch die von TNF- α und INF- γ , Interleukine, die besonders eine Th₁-Antwort verstärken, IL-4, ein Interleukin, daß für die Th₂-Antworten induzieren kann, war nicht vorhanden (Kelleher,

1998). IL-12, dessen Produktion von Borrelien induziert wird, ist ebenfalls ein Hormon, das in der Lage ist, Th₁-Antworten zu stärken, Th₂-Antworten zu hemmen (Infante-Duarte, 1997). Antagonisten von IL-12 sind in der Lage, den Verlauf einer Borreliose abzuschwächen (Anguita, 1997). Eine vermehrte Produktion von IL-6 bei der Borreliose wird unterschiedlich bewertet. Während einige Autoren in IL-6 bezüglich der Borreliose eher ein proinflammatorisches Hormon sehen, beobachten beispielsweise Anguita et al. bei IL-6-defizienten Mäusen eine verstärkte Arthritis im Verlauf einer Borreliose. IL-6 wirkt ihrer Meinung nach vor allem über eine Th₂-Antworten verstärkende Fähigkeit protektiv (Anguita, 1998).

2.2. Das autonome Nervensystem

Das autonome Nervensystem beeinflusst vegetative Körperfunktionen über das sympathische, parasympathische und das in der Darmwand lokalisierte intramurale Nervensystem. Sympathikus und Parasympathikus setzen sich zusammen aus präganglionärem Neuron, dessen Zellkörper im Hirnstamm und im Rückenmark liegen und deren Transmitter Acetylcholin ist, und dem postganglionärem Neuron, dessen Zellkörper beim Sympathikus im Grenzstrang und beim Parasympathikus nahe der Zielorgane liegen. Parasympathischer Transmitter ist hier Acetylcholin, bei Erregung des sympathische Nervensystem wirken Noradrenalin und Adrenalin auf die Zielorgane. Einfluß hat das autonome Nervensystem vor allem auf glatte Muskulatur, auf den Herzmuskel und auf Drüsen. Parasympathikus und Sympathikus haben dabei meist gegenteilige Effekte, während der Parasympathikus eine trophotrope Wirkung hat, die Körperfunktionen in Richtung Ruhe, Erholung und Energiespeicherung lenkt, bereitet der Sympathikus den Körper auf „Flucht-und Kampfreaktionen“ vor, er hat ergotrope Wirkung.

Tabelle 3, Effekte des Autonomen Nervensystems:

	α_1 Rezeptor	α_2 Rezeptor	β_1 Rezeptor	β_2 Rezeptor
Herzkontrakt.			Zunahme	
Herzfrequenz			Zunahme	
Gefäße	Kontraktion			Dilatation
Gallenwege				Erschlaffung
Motilität(Magen-Darm-Trakt)		Abnahme		Abnahme
Sphinkteren	Kontraktion			
Insulinsekretion		Abnahme		Zunahme
Bronchien				Erschlaffung
Gluconeogenese				Zunahme
Glycolyse				Zunahme
Lipolyse				Zunahme

2.2.1. Adrenozeptoren

2.2.1.1. Einteilung

Das sympathische Nervensystem entfaltet seine Wirkung mit seinen Transmittern über Adrenozeptoren. Nach der unterschiedlichen Wirkpotenz von Adrenalin, Noradrenalin und Isoprenalin auf Subtypen der Adrenozeptoren unterteilte Ahlquist 1948 diese in α -Rezeptoren und β -Rezeptoren:

α -Rezeptoren: Adrenalin > Noradrenalin >> Isoprenalin

β -Rezeptoren: Isoprenalin > Adrenalin >= Noradrenalin

Seit 1967 werden der β -Rezeptor (Lands, 1967) und wenige Jahre später auch der α -Rezeptor (Berthelsen, 1977) in zwei weitere Subtypen unterteilt. Ein weiterer β -Rezeptor (β_3) ist vor einigen Jahren auf Adipozyten beschrieben worden (Caron, 1991). Molekularbiologische Techniken ermöglichen es, die zwei α -Rezeptoren in weitere Subtypen (α_1A , α_1B , α_1C und α_2A , α_2B , α_2D) zu klassifizieren (Ahlquist, 1948; Lands, 1967; Langer, 1974; Berthelsen, 1977). Es gibt Agonisten wie auch Antagonisten, die sowohl an α -, wie auch an β -Rezeptoren wirken, häufig entfalten Agonisten/Antagonisten an einem Rezeptor-Typ mehr Wirkung als an dem anderem und einige sind nur an einem ganz bestimmten Subtyp Agonist bzw. Antagonist.

2.2.2.2. Struktur der Adrenozeptoren

Adrenozeptoren sind in der Zellmembran lokalisierte Glykoproteine mit einer etwa 400-550 Aminosäuren umfassenden Polypeptidkette und einem Molekulargewicht von 65-80 kD. Die Struktur der unterschiedlichen Adrenozeptoren ähnelt sich sehr, so daß man davon ausgeht, daß sie einen gemeinsamen genetischen Ursprung haben, obwohl sie Produkte von Genen sind, die auf unterschiedlichen Chromosomen liegen (Strasser, 1992).

Die Polypeptidkette des Rezeptors ist so gefaltet, daß sie die Zellmembran siebenmal durchquert, intrazellulär endet sie mit einer terminalen Carboxy-Gruppe, extrazellulär mit einer terminalen Amino-Gruppe. Im Bereich der 3. und 5. α -helikalen hydrophoben

transmembranären Domänen werden Liganden an den Adrenozeptor gebunden. Die dritte intrazelluläre Schleife und die terminale Carboxy-Gruppe sind verantwortlich für die Bindung des G-Proteins, der ersten Komponente für die intrazelluläre Signaltransduktion. Phosphorylierung von Hydroxygruppen der dritten Schleife und des Carboxyendes durch eine Proteinkinase A und eine β -Adrenozeptor-spezifische Proteinkinase führen zu einer Desensibilisierung, das G-Protein kann nicht mehr gebunden werden, und zu einer Internalisierung des Rezeptors. Dies ist ein wichtiger Mechanismus, der beispielsweise nach langfristiger Stimulation mit Katecholaminen in hohen Konzentrationen einer Desensibilisierung und „down-regulation“ des Adrenozeptors führt.

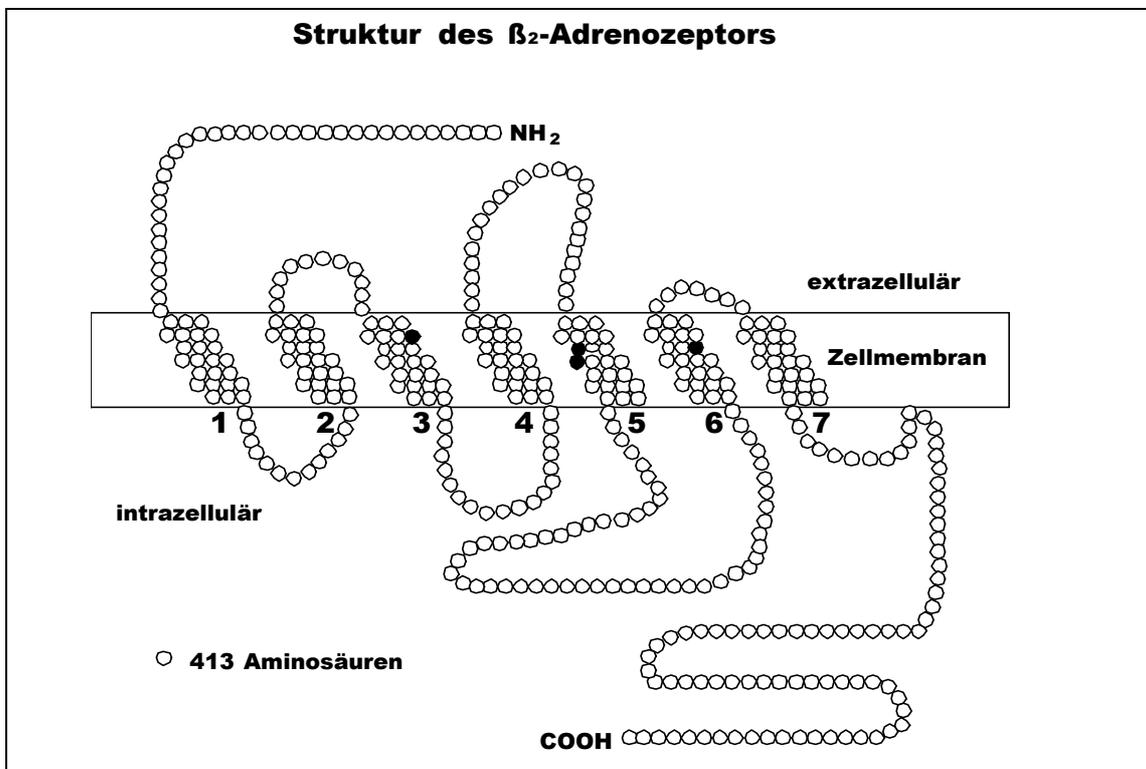


Abb. 2: Struktur des humanen β_2 -Adrenozeptors mit seinen sieben transmembranären Domänen. Schwarze Kreise deuten auf Aminosäuren, die essentiell für die Bindung der β_2 -Agonisten (Barnes, 1995)

Von einer heterologen Desensibilisierung spricht man, wenn es durch Substanzen wie Histamin, Dopamin, Serotonin, Glukagon, Prostaglandin E2 über deren Rezeptoren zu einer erhöhten Aktivität der Proteinkinase A und damit verbunden zu einer Phosphorylierung des Adrenozeptors kommt (Sibley, 1987).

2.2.2.3. Transduktionsmechanismus

Adrenozeptoren zählen zur Superfamilie der G-Protein bindenden Rezeptoren. Nach Bindung eines Agonisten an den Adrenozeptoren ist der erste Schritt der intrazellulären Signaltransduktion die Komplexbildung und damit verbunden die Aktivierung eines G-Proteins (Guanin-Nucleotid-bindendes Protein). G-Proteine sind Heterotrimere, die nach Bindung an den Rezeptor-Agonisten Komplex ihre aus drei Untereinheiten (α , β und γ) bestehende Struktur dahingehend verändern, daß ein gebundenes GDP gegen GTP ausgetauscht wird und das Trimer in eine α -Einheit mit gebundenem GTP und eine $\beta\gamma$ -Einheit zerfällt. Die α -Einheit verändert nun auf verschiedene Weise die Konzentration von Second messengern, abhängig davon, welches G-Protein aktiviert wurde.

Nach Bindung von Adrenozeptor-Agonisten an α_1 -Rezeptoren aktiviert die α -Einheit des G-Proteins die Phospholipase C, die Phosphatidyl-Inositol-bisphosphat zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. (IP3) bewirkt als Second messenger am endoplasmatischen Retikulum eine Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen, DAG aktiviert in der Zellmembran eine Proteinkinase C, die ihrerseits Proteine in ihrem Funktionszustand durch Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten verändert (Lefkowitz,1987).

β -und α_2 -Rezeptoren sind an G-Proteine gekoppelt, die nach Aktivierung Einfluß auf eine Adenylatcyclase haben. Das G_s -Protein der β -Rezeptoren stimuliert diese, durch das G_i -Protein der α_2 -Rezeptoren wird die Adenylatcyclase in ihrer Aktivität inhibiert. Die aktivierte Adenylatcyclase ihrerseits führt zu einer verstärkten Bildung von cyclischem Adenosin 3',5' Monophosphat (cAMP) aus Adenosin-triphosphat (ATP), so daß nach Bindung von Katecholaminen an einen β -Rezeptor die Konzentration von cAMP steigt, nach Bindung an einen α_2 -Rezeptor aber fällt. Der Second messenger cAMP aktiviert eine Proteinkinase C, die durch Phosphorylierung verschiedener Proteine diese in ihrer Aktivität und Funktion beeinflusst. Bindung an den α_2 -Rezeptor führt außerdem G-Protein-vermittelt, Bindung an β_1 -Rezeptoren direkt zu einem Ca^{2+} -Influx.

Die Wirkung von Agonisten am Adrenozeptor wird beendet, indem eine GTPase das GTP des aktiven G-Proteins zu GDP hydrolysiert, Second messenger werden abgebaut, beispielsweise cAMP von einer Phosphodiesterase. Die G-Protein gekoppelte Signaltransduktion wird potenziert, indem nach Bindung des Liganden an den Rezeptor mehrere G-Proteine aktiviert werden, die ihrerseits wieder jeweils mehrere Second messenger erzeugen.

2.3. Einfluß des autonomen Nervensystems auf das Immunsystem

Seit 1904, als Loeper und Crouzon (Loeper, 1904) anhand des Differentialblutbildes die Wirkung subcutan injizierten Adrenalins untersuchten und feststellten, daß es zu einer Leukozytose kam, ist bekannt, daß sich Nervensystem und Immunsystem beeinflussen. Dieser Einfluß ist bidirektional, es werden nicht nur Immunfunktionen von dem Nervensystem verändert, sondern das Immunsystem hat auch auf jenes System einen Einfluß. Das Immunsystem hat Rezeptoren für neuroendokrine Hormone wie Glukokortikoide und Katecholamine, teils sind die Zellen des Immunsystems sogar in der Lage, diese Hormone selbst zu produzieren (Berquist, 1994). Das Nervensystem und hier vor allem die neuroendokrinen Bereiche (Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse) exprimieren ihrerseits Rezeptoren für Zytokine und werden durch sie in ihrer Funktion beeinflusst (Besedovsky, 1983 und 1996; Rabin, 1989; Carlson, 1987; Woloski, 1985). Immunsystem und Nervensystem verwenden nach Blalock eine gemeinsamen biochemischen Sprache (Blalock, 1994).

Als besonders wichtig für den Einfluß des Nervensystem auf das Immunsystem stellte sich das autonome Nervensystem heraus, das vor allem mit seinen sympathischen Transmittern Noradrenalin und Adrenalin in das Immunsystem eingreift. Für einen direkten Einfluß der Katecholamine auf Zellen des Immunsystems ist es notwendig, daß die Zellen Kontakt mit Katecholaminen haben und daß es Rezeptoren auf den Zellen gibt, über die die Katecholamine ihren Einfluß ausüben können.

2.3.1. Innervation immunologischer Organe

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß nicht nur Organe vegetativer Körperfunktionen wie Herz oder Darm, sondern auch immunologische Organe sympathisch innerviert sind (Cohen, 1994; Felten, 1986, 1991b, 1992a und 1992b). In der Milz (Felten, 1987a und 1987b), in Lymphknoten (Felten, 1991; Giron, 1980) und im Thymus (Felten, 1991b; Bellinger, 1988) konnte ein direkter Kontakt von sympathischen Nervenendigungen mit Makrophagen, B- und T-Lymphozyten nachgewiesen werden.

2.3.2. Adrenozeptoren auf Leukozyten

Eine Vielzahl von Studien mit radioaktiv markierten Liganden zeigten, daß immunologische Zellen Adrenozeptoren exprimieren, über die das sympathische Nervensystem sie in der Aktivität und Produktion von sekretorischen Stoffen beeinflusst. Dies geschieht hauptsächlich über β_2 -Rezeptoren (Johnson, 1981), es gibt nur einzelne Hinweise für einen Einfluß über α -Rezeptoren (Liebmann, 1996; Spengler, 1990; Titinchi, 1984).

Die Dichte an β_2 -Rezeptoren auf Immunozyten ist von vielen Faktoren abhängig. So exprimieren die einzelnen Populationen eine sehr unterschiedliche Anzahl an β_2 -Rezeptoren. Die Dichte der gemessenen β_2 -Rezeptoren wird von einzelnen Autoren sehr unterschiedlich angegeben, was darauf hindeutet, daß diese Angaben methodenabhängig variieren. Vergleich man allerdings die β_2 -Rezeptordichten der einzelnen Immunozyten-Subpopulationen bei einem Autor, so ergeben sich bei allen Autoren ähnliche Verhältnisse.

β_2 -Rezeptordichte:

B-Lymphozyten > Monozyten > (CD8+) T-Lymphozyten > (CD4+) T-Lymphozyten

Angaben bezüglich der Zahl der β_2 -Rezeptoren auf Monozyten variieren zwischen 1174+/-233 und 3278+/-690 (Landmann, 1984 und 1992; Tits, 1990).

2.3.3. Faktoren mit Einfluß auf die β_2 -Rezeptordichte

Innerhalb der einzelnen Populationen verändert sich die Anzahl an β_2 -Rezeptoren abhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen (Radojcic, 1991; Singh, 1979). Bei T-Lymphozyten ist beispielsweise beschrieben worden, daß sich im Laufe der Differenzierung die Anzahl an β_2 -Rezeptoren vergrößert (Ackermann, 1991).

Lymphozyten verändern nach Aktivierung ihre Anzahl an β_2 -Rezeptoren. Die Richtung der Änderung ist nicht abhängig von dem Maß der Aktivierung an sich, sondern von dem Aktivator und damit dem jeweils spezifischen Aktivierungsweg. Nach

Immunisierung mit Schaf-Erythrozyten reduziert sich die Dichte von β_2 -Rezeptoren auf Milz-Lymphozyten (Fuchs, 1988) Im Gegensatz dazu erhöht sich die Anzahl von β_2 -Rezeptoren auf Lymphozyten nach Kontakt mit Pikryl-Chlorid (Madden, 1989) oder nach Kontakt mit Cocanavalin A (Radojicic, 1991).

Die Dichte an β_2 -Rezeptoren wird durch Hormone und Zytokine beeinflusst. Glukokortikoide, Trijodthyronin und Progesteron erhöhen die Anzahl an β_2 -Rezeptoren auf Zellen (Davis, 1984). Nach Stimulation mit IL-1 β für 72 Stunden vermindert sich die Anzahl an β -Rezeptoren auf Lymphozyten, IL-2 erhöht im gleichen Zeitraum die Anzahl (Krause, 1995).

Die Anzahl an β_2 -Rezeptoren ist abhängig von der Anwesenheit von Agonisten oder Antagonisten, es kommt zu einer Down- bzw. Up-Regulation. (Aarons, 1980 und 1982; Motulsky, 1986). Bedeutsam ist hier die Dauer der Einwirkung, es wird eine biphasische Änderung beschrieben. Nach einer Behandlung mit Katecholaminen für einen Zeitraum von einer Stunde wurde ein Anstieg der β_2 -Rezeptordichte auf Lymphozyten beobachtet. Bei längerer Einwirkungszeit kommt es zu einer Reduktion der Rezeptordichte (Tomeh, 1980).

Untersuchungen in vivo bezüglich der Anzahl an β_2 -Rezeptoren auf Immunozyten sind meist schwer zu beurteilen, da Verschiebungen in der Zusammensetzung der Immunozyten zugunsten von Populationen, die entweder sehr viele oder sehr wenige β_2 -Rezeptoren exprimieren, einen großen Einfluß auf die absolute Anzahl haben, ohne daß sich zwangsweise die Anzahl der Rezeptoren auf den Zellen selbst verändert haben muß.

Bei Menschen mit Krankheiten, bei denen das Immunsystem eine große Rolle spielt, lassen sich Veränderungen in der Zahl der Rezeptoren auf den Zellen des Immunsystems beobachten. Während bei Patienten mit Multipler Sklerose die Anzahl an β_2 -Rezeptoren auf Lymphozyten erhöht ist (Muthyala, 1995), findet man eine verminderte β_2 -Rezeptordichte bei Patienten mit rheumatoider Arthritis, Morbus Crohn und systemischem Lupus erythematoses (Baerwald, 1992b; Krause, 1992).

2.3.4. Einfluß des autonomen Nervensystems in vivo und in vitro

Untersucht man den Einfluß des Nervensystems, bemerkt man sehr schnell, daß dieser von einer Vielzahl an Faktoren abhängig ist. Die einzelnen Subpopulationen der Leukozyten reagieren sehr verschieden auf Katecholamine, Adrenalin und Noradrenalin entfalten unterschiedliche Wirkungen an α -Rezeptoren und β -Rezeptoren, eine Rolle spielt, ob und mit welcher Substanz die Leukozyten zusätzlich stimuliert werden und zu welchem Zeitpunkt und für welche Zeitdauer Katecholamine auf die Zellen wirken. Die Leukozyten der Milz werden nicht in jedem Fall genauso beeinflußt wie die in Lymphknoten, was auf eine Organspezifität der Wirkung hindeutet.

Große Unterschiede ergeben sich vor allem auch bei Beobachtungen in vivo im Gegensatz zu Versuchen in vitro. In vitro kann man den Einfluß des Nervensystems isoliert und sehr gezielt bezüglich nur einer Zellsorte untersuchen. Diese Ergebnisse können dann aber nicht auf die sehr viel komplexeren Verhältnisse des lebenden Menschen oder Tieres übertragen werden.

a) Sympathektomie

Eine Reihe von Versuchen an Tieren machten die Bedeutung des sympathischen Nervensystems für das Immunsystem deutlich. Tiere die neonatal sympathektomiert werden, produzieren vermehrt Antikörper (Williams, 1981; Besedovsky, 1979). Untersuchungen von Immunozyten bei Tieren nach Sympathektomie zeigten, daß es daraufhin zu einer verstärkten Proliferation und Migration in Lymphknoten kommt (Madden, 1994a). Nach Sympathektomie ist die zellvermittelte Immunität und die Aktivität der zytotoxischen T-Lymphozyten geschwächt, die T-Lymphozyten-unabhängige Abwehr wird verstärkt. Es verstärken sich nach Sympathektomie die Symptome von Autoimmunerkrankungen wie die allergische Encephalomyelitis, experimentale autoimmune Myasthenia gravis und rheumatoide Arthritis (Felten, 1992a; Schelmicka-Schorr, 1988; Agius, 1987). Die Symptome der allergischen Encephalomyelitis bleiben aus, wenn die sympathektomierten Ratten mit Isoproterenol behandelt werden (Schelmicka-Schorr, 1989). Das sympathische Nervensystem scheint eine duale Rolle bei der Beeinflussung von autoimmunen Erkrankungen zu haben. Sympathektomiert man Ratten nicht vollständig, sondern läßt die sympathische Innervation in den Gelenken intakt, beeinflußt also das Immunsystem nur auf der Ebene

der lymphatischen Organe, so verstärken sich die Symptome einer reumatoiden Arthritis (Lorton, 1996). Eine systemische chemische Sympathektomie, die auch zu einer Denervation in den Gelenken führt, hat im Gegensatz dazu protektive Effekte, die Zerstörungen in den Gelenken werden abgeschwächt (Levine, 1986).

b) Streß

Rückschlüsse auf den Einfluß des sympathischen Nervensystems auf das Immunsystems beim Menschen in vivo erhält man vor allem, wenn man Beobachtungen in Situationen macht, in denen das sympathische Nervensystem besonders aktiv ist. Eine wichtige Aufgabe des Sympathikus ist es, die Homöostase während vermehrter Anforderung im Sinne von körperlicher Anstrengung und Streß aufrecht zu erhalten. Der Einfluß des sympathischen Nervensystems auf das Immunsystem zeigt sich demnach auch besonders in solchen Situationen (Keller, 1991; Kiecolt-Glaser, 1991). Bereits 1927 beobachteten Mora et al., daß es in Streßsituationen, zum Beispiel bei Menschen, die in Erwartung einer Operation emotional beansprucht sind, zu einer vorübergehenden Leukozytose kommt (Mora, 1927). Unter Streß bzw. harter Arbeit erhöht sich die Zahl der Leukozyten und Lymphozyten. Während die Zahl der Leukozyten nach Abbruch der Arbeit weiter steigt, fällt die der Lymphozyten deutlich ab (Hoffmann-Goetz, 1994). Streß, der durch elektrische Schocks hervorgerufen wird, vermag die Reaktion von Lymphozyten auf Mitogene, und die Aktivität von NK-Zellen zu vermindern. (Lysle, 1988 und 1990) Diese Effekte lassen sich mit dem β -Rezeptor-Antagonisten Propranolol blockieren. (Lysle 1991) Arbeit erhöht den Gehalt an IL-1 β in Muskelgewebe und die Aktivität von IL-1, IL-6 und TNF- α im Blut (Cannon, 1989; Evans, 1986). Arbeit steigert die Konzentration von IL-6 und TNF- α im Blut (Northoff, 1991; Espersen, 1990). Durch Anstrengung vermehrt sich die Anzahl an β -Rezeptoren auf Lymphozyten (Mäki, 1989).

c) Krankheiten

Welche Bedeutung der Einfluß des Nervensystems auf das Immunsystem für die Medizin haben kann, zeigen zahlreiche Beobachtungen an Krankheiten, bei denen das

Immunsystem pathophysiologisch eine große Rolle spielt. Bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis, Morbus Crohn und Systemischem Lupus erythematoses ist die Zahl an β -Rezeptoren auf PBMC verringert (Baerwald 1992a und 1992b; Krause, 1992). Dagegen haben Patienten mit Multipler Sklerose eine erhöhte Anzahl an β -Rezeptoren auf Lymphozyten, die Sekretion an IFN- γ durch Lymphozyten ist vermehrt. Sowohl die Anzahl der β 2-Rezeptoren auf Lymphozyten als auch die Produktion an IFN- γ kann durch eine Behandlung mit β -Rezeptor Agonisten vermindert werden (Muthyala, 1995). Die Symptome einer Psoriasis exacerbieren bei Behandlung mit β 2-Antagonisten (Abel, 1986).

d) Einfluß auf unterschiedliche Zelltypen

Das autonome Nervensystem beeinflusst die einzelnen Zelltypen des Immunsystems sehr unterschiedlich. Gründe hierfür finden sich viele. Die Zellen exprimieren nicht in gleichem Ausmaße Adrenozeptoren, zudem ist die Verteilung der Subtypen von Zelle zu Zelle verschieden. Abhängig von der Nähe zu sympathischen Nervenendigungen sind die Zellen unterschiedlichen Katecholaminkonzentrationen ausgesetzt. Einige Zellen sind sogar selbst in der Lage, Katecholamine zu produzieren, so daß man annehmen muß, daß es nicht nur einen Einfluß von Adrenalin und Noradrenalin auf Immunfunktionen über das sympathische Nervensystem gibt, sondern daß dies auch parakrin und autokrin durch die Immunozyten geschieht (Musso, 1996).

Monozyten/Makrophagen:

Beim Menschen führt die Injektion von Noradrenalin zu einem Anstieg der Anzahl an zirkulierenden Monozyten im Blut (Gader, 1974). Durch LPS stimulierte TNF- α Sekretion von Monozyten kann mit β -Agonisten gehemmt werden (Seldon, 1998). Dieser Effekt ist partiell mit dem β -Rezeptorantagonisten Propranolol blockierbar, während der α -Rezeptorantagonist Phentolamin die Wirkung der Katecholamine sogar verstärkt (Hu, 1991). LPS stimulierte TNF- α Produktion durch Makrophagen kann mit Noradrenalin und dem α 2-adrenozeptor Agonisten UK-14304 im nanomolarem Bereich verstärkt werden. Mit einer Konzentration von 0.225 μ M wird die Produktion dagegen gehemmt. Der UK-14304 bedingte Effekt konnte mit dem α -Blocker Yohimbin, der

durch Noradrenalin hervorgerufene Effekt mit Propranolol verhindert werden (Spengler, 1994). Die durch IFN- γ stimulierte lytische Aktivität von Makrophagen kann mit Noradrenalin 10^{-6} M und Adrenalin 10^{-6} M gehemmt werden. Vasoaktives intestinales Polypeptid, welches die cAMP Konzentration bei Makrophagen erhöht, verstärkt die Hemmung der Aktivität noch (Irimajiri, 1985; Koff, 1985). Die β -Rezeptor-Antagonisten Salbutamol und Fenoterol führen zu einer verstärkten Expression des IgE-Rezeptors, der Membranmoleküle CD 11b, CD11c und CD18 auf Monozyten (Paul-Eugene, 1994). β -Agonisten erhöhen die durch LPS induzierte Produktion von IL-10 bei Makrophagen (Suberville, 1996). Durch LPS stimulierte Produktion von IL-1, IL-6 wird unterschiedlich durch Substanzen, die wie Katecholamine nach Bindung an β -Rezeptoren die intrazelluläre Konzentration von cAMP erhöhen, wie Prostaglandin E₂, Dibutyryl cAMP und 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin, beeinflusst. Die IL-1 Produktion wird nicht verändert, IL-6 wird vermehrt produziert, TNF- α wird in seiner Produktion gehemmt (Baille, 1990).

Lymphozyten:

Beim Menschen führt die Injektion von Noradrenalin zu einem Anstieg der Anzahl an zirkulierenden Lymphozyten im Blut, vor allem der CD8⁺ Lymphozyten zytotoxischen Lymphozyten und NK-Zellen, die Anzahl an CD4⁺ Lymphozyten dagegen vermindert sich (Gader, 1974; Tits, 1990; Landmann, 1992). Noradrenalin inhibiert die Aktivierung von Lymphozyten (Hadden, 1970; Besedovsky, 1979; Johnson, 1981). Die Proliferation von T-Lymphozyten wird inhibiert bei Stimulation von β -Rezeptoren durch Noradrenalin und durch andere Substanzen, die die Konzentration an intrazellulärem cAMP erhöhen (Hadden, 1970; Kammer, 1988; Carlson, 1989). Durch LPS induzierte Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten wird durch Noradrenalin verstärkt. Dieser Effekt läßt sich durch den β -Blocker Propranolol unterdrücken (Kouassi, 1988). Die lytische Aktivität von NK-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten wird von Noradrenalin in einer Konzentration von 10^{-6} M vermindert, bei einer Konzentration von 10^{-8} wird die Aktivität verstärkt, beide Effekte lassen sich mit Propranolol blocken (Katz, 1982; Hellstrand, 1985). Die Aktivierung von mit Lymphokin aktivierten Killer-Zellen durch IL-2 wird mit dem α -Agonisten Phenylephrin verstärkt (Beckner, 1988).

Granulozyten:

Katecholamine und andere Stoffe, die den cAMP Spiegel erhöhen, verringern die Fähigkeit der Neutrophilen zur Phagozytose und die Freisetzung von lysosomalen Enzymen (Zurier, 1974). Katecholamine hemmen den „respiratory-burst“ (die maximale Produktion an Superoxid) (Nielson, 1987; Gibson-Berry, 1993). Noradrenalin und Isoproterenol hemmen die Motilität und Chemotaxis von Neutrophilen (Rivkin, 1975). Katecholamine vermindern die Antigen induzierte Freisetzung von Histamin durch Basophile (Lichtenstein, 1968). Von Eosinophilen weiß man, daß auch sie β_2 -Rezeptoren exprimieren (Yukawa, 1990). β_2 -Agonisten haben einen inhibitorischen Effekt auf den „oxidative burst“ und die Freisetzung von Thromboxan und LTC bei Eosinophilen (Dent, 1994; Munoz, 1994).

e) Einfluß des Rezeptorsubtyps

Abhängig von dem Rezeptortyp, über den das autonome Nervensystems auf das Immunsystem Einfluß nimmt, können sehr verschiedene Veränderungen der Immunfunktionen beobachtet werden. Stimulation von β -Rezeptoren hemmt die Proliferation von Lymphozyten, die Bildung von Antikörper und die Produktion von pro-inflammatorischen Faktoren, die Stimulation von α -Rezeptoren hat gegenteilige Effekte (Hadden, 1970; Melmon, 1974; Bourne, 1974).

Andere Katecholamineeffekte werden gleichsinnig über α - und β -Rezeptoren reguliert: Intrakardiale Injektion von Noradrenalin bzw dem β -Agonisten Isoproterenol führt zu einer Freisetzung von Lymphozyten und Granulozyten in der Milz von Meerschweinchen. Der Einfluß von Noradrenalin kann mit Phentolamin, einem α -Blocker, der von Isoproterenol mit Propranolol, einem β -Blocker, gehemmt werden (Ernström, 1973). Katecholamine vermindern die Aktivierung von lymphatischen Zellen durch LPS und Concanavalin A. Dieser Einfluß kann weder durch α -Blocker noch durch β -Blocker antagonisiert werden, so daß man annehmen muß daß Katecholamine über einen alternativen Weg Einfluß auf lymphatische Zellen haben (Cook-Mills, 1995).

f) Crosstalk

Es kann beobachtet werden, daß nicht allein die Katecholamine und damit verbunden die Erhöhung der Konzentration der intrazellulären second-messenger wie cAMP entscheidend für Hemmung oder Verstärkung einer durch Stimulantien hervorgerufenen Proliferation sind, sondern daß das Stimulans mit seinem spezifische intrazellulärem Stimulationsmechanismus wichtig dafür ist, in welche Richtung die Katecholamine wirken. Es kommt zu einer Interaktion der intrazellulären Transduktionswege der Substanzen, die auch als „Crosstalk“ bezeichnet wird. Ein Beispiel für den Stimulans-abhängigen unterschiedlichen Einfluß auf Zellen des Immunsystems ist die Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten, die nach Stimulation mit LPS durch Noradrenalin verstärkt werden, nach Stimulation mit anti-IgM durch Noradrenalin aber gehemmt werden (Kouassi, 1988).

g) Einfluß des Zeitpunktes

Bei dem Einfluß von Katecholaminen auf die durch einen Stimulans induzierte Produktion von Zytokinen ist es von großer Bedeutung, zu welchem Zeitpunkt die Katecholamine hinzugegeben werden, ob dies vor dem Stimulieren, während oder danach geschieht. LPS stimulierte Produktion von TNF- β durch PBMC wird mit Noradrenalin, oder Isoproterenol, sofern diese zur selben Zeit wie das Stimulans hinzugegeben werden, gehemmt. Werden die Zellen mit Isoproterenol vorinkubiert, verstärkt sich die Produktion von TNF- β . Diese Wirkungen sind mit Propranolol hemmbar (Severn, 1992). Wird in vivo Noradrenalin 6 Stunden vor einem Antigen-Kontakt injiziert, so verschiebt sich der Peak der Produktion von IgM und IgG 24 Stunden nach vorne, eine Injektion 2-4 Tage Kontakt mit Antigenen führte zu einer Hemmung der Antikörperantwort (Depelchin, 1981).

h) Organspezifität

Der Einfluß des Nernensystems auf das Immunsystem ist organspezifisch: Nach Sympathektomie bei Mäusen ist die Concanavalin A induzierte Proliferation von Lymphozyten in Lymphknoten vermindert, in der Milz ist sie dagegen verstärkt. Nach

Stimulation mit LPS proliferieren B-Lymphozyten in den Lymphknoten stärker, in der Milz ist das Gegenteil der Fall. Die Proliferation von T-Lymphozyten vermindert sich sowohl in den Lymphknoten als auch in der Milz. Bei den Lymphozyten der Lymphknoten ist nach Stimulation mit Concanavalin A die Produktion von IFN- γ verstärkt, die von IL-2 ändert sich nicht, in der Milz ist die Produktion von IFN- γ und IL-2 vermindert (Madden, 1994a und 1994b).

3. Fragestellung der Arbeit

Vor dem Hintergrund der geschilderten Beziehungen zwischen Immunsystem und Nervensystemsowie des gegenwärtigen Forschungsstandes beschäftigt sich die Arbeit mit dem Einfluß von Katecholaminen auf die Immunantwort von Monozyten. Insbesondere geht es um die Produktion der Interleukine 1, 6 und 12, die in Zellüberständen von Monozyten nach Stimulation mit LPS, IFN- γ und Borrelien gemessen werden, und die Beeinflußbarkeit dieser Produktion durch Adrenalin und Noradrenalin. Zusätzlich wird die Dichte an β -Rezeptoren auf den Monozyten bestimmt, um eine Korrelation zwischen dem Einfluß der Katecholamine auf die Produktion der Interleukine festzustellen.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

1. Kann LPS in vitro die Produktion von IL-1, IL-6 und IL-12 durch Monozyten stimulieren und kann die Stimulation der Produktion mit Adrenalin und Noradrenalin beeinflußt werden.
2. Kann IFN- γ in vitro die Produktion von IL-1, IL-6 und IL-12 durch Monozyten stimulieren und kann die Stimulation der Produktion mit Adrenalin und Noradrenalin beeinflußt werden.
3. Können Borrelien in vitro die Produktion von IL-1, IL-6 und IL-12 durch Monozyten stimulieren und kann die Stimulation der Produktion mit Adrenalin und Noradrenalin beeinflußt werden.
4. Ist eine Korrelation zwischen möglicher Beeinflussung durch Katecholamine und β -Rezeptorendichte auf Monozyten festzustellen.

4. Methoden

4.1. Arbeitsmaterial und Chemikalien

Anti-human CD3-Antikörper, CBL 150, Cymbus Biotechnology LTD

Ascorbinsäure L(+) (M:176,13), #127, Merck

Aqua ad iniectabilia /(0986)/B.Braun Melsungen AG

Begasungsbrutschrank, B5060-CO2 Heraeus

Dociton® (Propranololhydrochlorid 1mg/ml Ampullen), Rhein-Pharma, Plankstedt

Epinephrinhydrochlorid (Suprarenin®-Ampullen ,1,2 mg /ml), Hoechst AG, Frankfurt a. M.

Falcon-Röhrchen, PPN-KO-50ml, Art. 227261, Greiner-Labortechnik

FCS fetal calf serum, Seromed Biochrom KG ,Berlin

Ficoll Separating Solution (isotone, density 1,077), L6115, Biochrom KG Seromed®, Berlin

Gewebekulturplatten, 24-well, Falcon

Hanks´ Balanced Salt Solution (HBSS) ohne Calcium, Magnesium, ohne Phenolrot, L2043, Biochrom KG Seromed®, Berlin

HCl 1mol/l (1 N), 9057, Merck

Heraeus Sepatech Varifuge 3,2 RS, Heraeus

Human-Interleukin-IL-1β-Immunoassay-Kit, Cytoscreen KHC 0012, Biosource International

Human-Interleukin-IL-6-Immunoassay-Kit, Cytoscreen KHC 0062, Biosource International

Human-Interleukin-IL-12-Immunoassay-Kit, Cytoscreen KHC 0120, Biosource International

[125-I]-(-)Iodocyanopindolol (2200 Ci/mmol), DuPont, NEN®, NEX-189, Boston, MA

L-Glutamin (200 mM), K 0282, Biochrom KG

Lipopolysaccharid (LPS), L 4391, Sigma

MACS depletion columns, CS,413-05, Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach

Membranvakuumpumpe ME4/3,7, Vacuubrand GmbH

Monocyte Isolation Kit, 4x2 ml, 10⁹ total cells, 533-01, Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach

Mouse Monoclonal Antibody To Human CD3, CBL 150, Cymbus Biotechnology Ltd.
Multi-Crystal Gamma-Counter, LB2103, Fa. Berthold, Wildbad
Norepinephrin (Arteronol®-Ampullen), Hoechst AG, Frankfurt am Main
Penicillin-/Streptomycin-Solution (10000 IE/ml Pen./10000 IE/ml Strept.), 043-05140
H, Gibco
Phentolamin (Regitin®-Ampullen), Ciba-Geigy
Photometer, Titertek Multiskan Plus, Labsystems
RMPI 1640 ohne L-Glutamin, 041-01870 H, Gibco,
Saugpipette, Pipettboy plus, Tecnomara
Trypan-Blue-Stain, 043-05250 H, Gibco
Urapidil (Ebrantil®-Ampullen), Byk Gulden, Konstanz
VarioMACS, 431-02, Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Whatman Filter FG/B, Whatman Inc., Clifton NY

Außerdem wurden Pipettenspitzen, sterile Pipetten, Röhrchen, Reaktionsgefäße
(Eppendorf, Hamburg) verwandt.

4.2. Monozytengewinnung

Die Monozyten für die Versuche wurden aus buffy-coats, die von der Blutbank der Universität Marburg zur Verfügung gestellt wurden, isoliert. Buffy-coats fallen bei der Herstellung von Erythrozytenkonzentraten aus Vollblut an. Hierbei bildet sich nach Zentrifugation auf den Erythrozyten eine Schicht aus Leukozyten und Thrombozyten, die wegen ihrer charakteristischen Farbe als buffy-coat (lederfarbener Überzug) bezeichnet werden. Pro Blutspender fielen dabei ca. 50 ml buffy-coat an, die wir am Tag oder einen Tag nach Blutentnahme in einem sterilen Plastikbeutel erhielten. Um das Risiko einer Kontamination gering zu halten, wurden die Arbeitsschritte bis zum Anlegen der Kulturen unter der Sterilbank durchgeführt.

4.2.1. Monozyten/Lymphozyten-Isolierung mit Hilfe der Isopaque-Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Aus den buffy-coats wurden in einem ersten Schritt mit der von Böyum (Böyum, 1968) beschriebenen Isopaque-Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation Lymphozyten und Monozyten von Granulozyten und in den buffy coats verbliebenen Resten von Erythrozyten getrennt. Die Dichte der „Ficoll-Separating-Solution“ (FSS), bestehend aus Natriummetriozat (Isopaque) und dem hochpolymeren Zucker Ficoll, ist mit 1.077 g/ml niedriger als die der Erythrozyten und Granulozyten, die durch das Ficoll aggregieren, aber höher als die der mononukleären Zellen, also Monozyten und Lymphozyten, und der Thrombozyten. Daher liegt nach Zentrifugation eine Schicht mit der Trennlösung über den Erythrozyten und Granulozyten und unterhalb eines Zelleppichs mit Monozyten und Lymphozyten. Ganz oben bildet sich eine Schicht mit Plasma und Thrombozyten. Für die Dichtegradientenzentrifugation wurde der buffy-coat auf das doppelte Volumen mit „Hanks-Salt-Solution“ (HSS) verdünnt. In einem 50 ml Falcon Röhrchen wurden 20 FSS mit 30 ml der Zellsuspension vorsichtig überschichtet, so daß es zu keinem Durchmischen der Trennlösung mit der Zellsuspension kam. Daraufhin wurde bei 2200 U/min (1050g) für 20 min zentrifugiert. Mit einer 10 ml Pipette wurde die dünne Lymphozyten/Monozyten-Schicht vorsichtig abpipettiert, so daß möglichst FSS und Plasma mitgenommen wurde. Die Lymphozyten und Monozyten wurden in ein 50 ml Falcon Röhrchen gegeben. Um die Zellen von Resten FSS und Thrombozyten zu trennen, wurden die Zellen gewaschen. Dafür

wurden die Zellen mit HSS auf 50 ml aufgefüllt und bei 1800 U/min (703g) für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 50 ml HSS resuspendiert und bei 1500U/min (488g) ein weiteres Mal für 10 min zentrifugiert.

4.2.2. Methoden zum Separieren von Monozyten

Es sind zahlreiche Methoden zum Trennen von verschiedenen Zellpopulationen entwickelt worden. Beim Panning (Wysocki, 1978) werden Zellen an antikörperbeschichtete Kunststoffflächen gebunden, bei der Rosetting-Technik (Zembala, 1982) Zell-Agglutinate (z.B. mit Schaf-Erythrozyten die an CD2 Oberflächenmoleküle von T-Lymphozyten binden) gebildet, die mittels Dichtegradientenzentrifugation von den übrigen Zellen getrennt werden können. Die Fähigkeit der Zelladhäsion von Monozyten an Oberflächen wird ausgenutzt, indem man sie für 30-60 min an Plastikoberflächen binden läßt und andere Zellen herunterwäscht (Ackermann, 1978). Mit der Durchflußzytometrie, die in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung der Reinheit nach Separieren der Monozyten verwendet wurde, können die Zellen über ihre verschiedene Größe und Fähigkeit, Laserstrahlen zu streuen, unterschieden und voneinander getrennt werden. Alle genannten Methoden eignen sich nicht zum Separieren für die für unsere Versuche notwendigen Mengen an Monozyten. Bei der Plastikadhäsion ist außerdem eine unspezifische Stimulation der Monozyten beschrieben worden (Kelley, 1987), die vermieden werden sollte.

1985 beschrieben Lea et al. eine neue Methode zum Separieren von Zellen (Lea, 1985), bei der Antikörpern mit paramagnetischen Antikörpern gekoppelt werden und nachdem sie an Zellen gebunden und bei ihnen zur Rosettenbildung geführt haben, diese mit Hilfe eines starken Magneten von anderen Zellen getrennt werden. Von Miltenyi (Miltenyi, 1990) wurde die Methode in der Weise modifiziert, daß es zu keiner Rosettenbildung mehr kam, sondern die markierten Zellen als positive Fraktion an ein magnetisiertes Metallgitter gebunden, die übrigen Zellen als negative Fraktion herausgewaschen wurden (magnetic activated cell sorting = MACS). Da eine mögliche Aktivierung der Monozyten durch die Antikörper vermieden werden sollte, wurden sie bei der vorliegenden Arbeit nicht mit dieser Positivanreicherung gewonnen, sondern mit der recht neuen Methode der Negativanreicherung, bei der alle nicht gewünschten Zellen markiert und die zu separierenden Zellen als negative Fraktion gesammelt

werden. Man inkubiert hierbei die Zellen zuerst mit hapten-konjugierten Antikörpern gegen CD3 (Maus IgG2a), CD7 (Maus IgG2a), CD19 (Maus IgG1), CD45RA (Maus IgG1), CD56 (Maus IgG2b) und anti-IgE Antikörper (Maus IgG2a), markiert damit T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, dendritische Zellen und Basophile. Mit humanem Immunglobulin werden die Fc-Rezeptoren der Monozyten geblockt, so daß diese die Hapten-Antikörper nicht binden können. Nachdem nicht gebundene Antikörper durch Waschen entfernt worden sind, werden mit den paramagnetischem Partikeln (MicroBeads) konjugierte anti-Hapten-Antikörper hinzu gegeben. Die Fc-Rezeptoren werden wieder blockiert. Nach einem weiteren Waschen werden die Zellen mittels Metallgitter in positive und negative Fraktion getrennt.

4.2.3. Durchführung des MACS

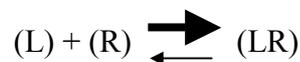
Nach dem letzten Waschen wurden für das MACSen 2×10^8 Zellen mit ca. 6°C kaltem PBS/BSA/EDTA auf eine Konzentration von $16,66 \times 10^8$ eingestellt. Dazu wurden Je $400 \mu\text{l}$ FcR-Blocking-Reagent und Hapten-Antibody-Cocktail gegeben (pro 1×10^7 Zellen $20 \mu\text{L}$ von beiden Reagentien). Bei 6°C wurde für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit PBS/BSA/EDTA auf 50 ml aufgefüllt und bei 1000 U/min (312g) für 8 min zentrifugiert. Nach Auflösen des Pellets in 50 ml PBS/BSA/EDTA wurde die Zentrifugation bei 1000 U/min (312g) wiederholt. Daraufhin wurde das Pellet in 2 ml PBS/BSA/EDTA aufgelöst und je $400 \mu\text{l}$ FcR-Blocking-Reagent und MACS-Anti-Hapten-MicroBeads zugegeben (pro 1×10^7 Zellen $20 \mu\text{L}$ von beiden Reagentien). Nach einer Inkubation von 15 min bei 6°C wurden die Zellen noch einmal mit 50 ml PBS/BSA/EDTA gewaschen und bei 1000 U/min (312g) für 8 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml PBS/BSA/EDTA aufgelöst. Die für die magnetische Zellisolierung verwendeten MACS-Säulen (Typ CS für eine maximale Kapazität von 2×10^8 Zellen) wurden vorbereitet, indem sie von unten mit 6°C kaltem PBS/BSA/EDTA gefüllt wurden, so daß möglichst keine Luftblasen in ihnen verblieben, die sonst die Durchflußgeschwindigkeit der Zellsuspension verringern und Zellen zerstören. Eine starker Ringmagnete, in den die Säule gehängt wurde, magnetisierte das sich in der Säule befindende Metallgitter. Die Durchflußgeschwindigkeit der auf die Säule gegebenen Zellsuspension wurde durch eine sterile 21 G Nadel so reduziert, daß mit metallischen Antikörpern markierte Zellen

mit dem Metallgitter in Wechselwirkung treten konnten, sie aber noch hoch genug war, daß nicht markierte Zellen wieder aus der Säule fließen konnten. Die nicht markierten Zellen wurden mit 50ml PBS/BSA/EDTA aus der Säule gespült und als negative Fraktion aufgefangen. Für die β -Rezeptorbestimmung und den Kulturansatz wurde die negative Fraktion auf zwei Falcon Röhren aufgeteilt und bei 1000 U/min (312g) für 8 min zentrifugiert.

4.3. β -Rezeptorbestimmung

4.3.1. Theorie des Radiorezeptorassays

Die Anzahl eines spezifischen Rezeptoren auf Zellen kann bestimmt werden, indem die Aktivität eines an die Rezeptoren gebundenen, radioaktiv markierten Liganden gemessen wird. Bei der Reaktion von Liganden mit Rezeptoren, können diese nicht nur aneinander binden, sondern auch dissoziieren, wobei am Anfang mehr Liganden an die Rezeptoren binden, als von ihnen dissoziieren. Dies kann mit folgender Gleichung veranschaulicht werden:



(L) steht dabei für die Konzentration an ungebundenem Liganden, (R) für die Konzentration an spezifischem Rezeptor, an den kein Ligand gebunden hat, und (LR) für die Konzentration der Liganden-Rezeptoren-Komplexe. Nach einer gewissen Zeit bildet sich ein Gleichgewicht heraus, die Zahl der zustande kommenden Bindungen entspricht der Zahl der Dissoziationen, das Ausmaß von Hinreaktion und Rückreaktion gleichen sich an:



In diesem Gleichgewichtszustand ist das Verhältnis aus dem Produkt aus (L) und (R) zu (LR) konstant. Eine Dissoziationskonstante (K_d) läßt sich berechnen:

$$K_d = \frac{(L) \times (R)}{(LR)} \quad (1)$$

Je größer die Affinität des Liganden zu dem Rezeptor, desto geringer ist, wie aus (1) ersichtlich, die Dissoziationskonstante.

Die Gesamtzahl an spezifischen Rezeptoren (B_{\max}) entspricht der Summe der Konzentration der spezifischen Rezeptoren, an die keine Liganden gebunden haben (R), und der Konzentration der Liganden-Rezeptor-Komplexe (LR):

$$B_{\max} = (R) + (LR) \quad (2)$$

Nach Umformung von (2) in

$$(R) = B_{\max} - (LR)$$

und Einsetzen in (1) ergibt sich:

$$Kd = \frac{(L) \times (B_{\max} - (LR))}{(LR)}$$

Nach Multiplikation mit (LR) und Division mit Kd und (L) ergibt sich:

$$\frac{(LR)}{(L)} = \frac{B_{\max} - (LR)}{Kd}$$

Ersetzt man nun (LR) durch B und (L) durch F erhält man die Scatchard-Gleichung, mit der sich die maximale Anzahl der Rezeptoren und die Dissoziationskonstante berechnen lassen (Scatchard, 1949).

$$\frac{B}{F} = \frac{B_{\max} - B}{Kd}$$

Dafür muß neben der Zahl der Zellen, auf denen die Rezeptoren gemessen wurden, die Konzentration des ungebundenen und des gebundenen Liganden während des Gleichgewichtszustandes bekannt sein, die ihrerseits nach Messen der Aktivität des Liganden mit Kenntnis der spezifischen Aktivität berechnet werden kann. Da bei unseren Versuchen weniger als 10% des zugefügten Liganden im Gleichgewichtszustand gebunden war, damit ein sog. Zone-A-Verhalten vorlag, konnte näherungsweise die Konzentration des freien Liganden der Gesamtkonzentration des Liganden gleichgesetzt werden. Die Bindung an den Rezeptor muß mit

unterschiedlichen Ligandenkonzentrationen durchgeführt werden. Bei unseren Versuchen wurden mit 6 verschiedenen Ligandenkonzentrationen der Assay durchgeführt.

An den Liganden eines Radiorezeptorassays werden einige Forderungen gestellt. Sie sollen eine hohe Spezifität für ihren Rezeptor haben, was einhergeht mit einer geringen unspezifischen Bindung. Damit nicht zu viele Zellen für den Assay eingesetzt werden müssen, ist es günstig, wenn die spezifische Aktivität des Liganden und seine Affinität zu dem Rezeptor hoch ist. Der Ligand soll nach Bindung von dem Rezeptor wieder dissoziieren können, weder in die Zelle internalisiert noch metabolisiert werden. Der Ligand hat möglichst stereospezifisch zu sein, daß heißt von den an den Rezeptoren besonders aktiven R-konfigurierten Agonisten verdrängt werden (Wolfe, 1977).

Im Vergleich mit in der Vergangenheit verwendeten Liganden, wie z.B. (-)-³H-dihydroalprenolol oder ¹²⁵Iodohydroxybenzylpindolol, hat sich der β -Rezeptorantagonist ¹²⁵Iodocyanopindolol (ICYP) als besonders vorteilhaft erwiesen (Brodde, 1981). Er hat eine sehr hohe spezifische Aktivität von 2200 Ci/mmol (81 TBq/mmol) und eine hohe Affinität, die im Bereich von 10 und 100 pM liegt (Brodde, 1981; Caron, 1991). Mit der Halbwertszeit von 60 Tagen von ¹²⁵Iod ist die Verwendung der Substanz allerdings auf wenige Wochen begrenzt. Da die unspezifische Bindung auch bei diesem Liganden nicht gleich Null ist, muß sie zusätzlich zur Gesamtbindung bestimmt werden. Dafür wird mit dem β -Rezeptorenantagonisten Propranolol, der eine sehr hohe Affinität zu seinem Rezeptor hat, die spezifische Bindung des ICYP geblockt. Durch Subtraktion der Aktivität des jetzt noch gebundenen ICYP von der Aktivität des gesamt gebundenem ICYP erhält man die Aktivität des spezifisch gebundenem ICYP.

Die Konzentration des von uns verwendete ¹²⁵Iodocyanopindolol lag mit der Charge ein wenig differierend bei etwa 160 μ Ci/ml (6000 KBq/ml). Die radiochemische Reinheit der vom Hersteller von nicht radioaktiv markiertem Cyanopindolol getrennten Substanz betrug mehr als 99%. Das ICYP wurde in 1 ml einer Lösung aus Propanol, H₂O und Phenol gelöst auf Trockeneis gekühlt geliefert. Nach Verdampfen der Lösung mit Stickstoff wurde das ICYP in 1 ml Inkubationspuffer (*), aliquotiert und bei -18°C bis zum Gebrauch eingefroren.

4.3.2. ICYP-Verdünnungsreihe

15 µl des aliquotierten ICYPs wurden für die Verdünnungsreihe mit Inkubationspuffer auf eine Konzentration von 500 pM verdünnt. Da die Konzentration des ICYPs in den verschiedenen Chargen nicht dieselbe war, mußte die für die 500 pmolare Lösung zu verwendende Menge an Inkubationspuffer (*) für jede Charge neu berechnet werden, sie betrug ca. 2150 µl. Von der 500 pmolaren Lösung ausgehend wurde eine Verdünnungsreihe mit 375, 250, 125, 62,5 und 31,25 pM hergestellt. Für die 250 pmolaren Lösung wurden 1 ml der Ausgangskonzentration (500 pM) mit 1 ml Inkubationspuffer gemischt. Je 500 µl von der 500 und der 250 pmolaren Lösung wurden zur 375 pmolaren Lösung gemischt. Weitere 500 µl der 250 pmolaren Lösung wurden mit 500 µl Inkubationspuffer zur 125 pmolaren Lösung gemischt. 500 µl von dieser wiederum ergaben mit 500 µl Inkubationspuffer die 62,5 pmolare Lösung und Mischen von 500µl der 62,5 pmolaren Lösung mit 500µl Inkubationspuffer ergab schließlich die 31,25 pmolare Lösung.

Die Monozyten wurden für die β-Rezeptorbestimmung nach Anfärben der Zellen eines Aliquots mit Methylblau und Auszählen in der Neubauer-Zählkammer mit Inkubationspuffer auf eine Konzentration von 6×10^6 Zellen/ml eingestellt. Nach Vorlegen von je 50 µl Inkubationspuffer in den 6 Röhrchen der Reihe für die Bestimmung für die totale Bindung und je 50 µl Propranolol (5 µM) in den 6 Röhrchen für die Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden je 100 µl Zellsuspension mit je 100 µl der unterschiedlichen Konzentrationen der ICYP-Verdünnungsreihe gemischt. Man hatte nun 2×6 Röhrchen mit je 250 µl Zellsuspension und durch Verdünnung mit dem Faktor 2,5 (100µl in einem Endvolumen von 250 µl) ICYP Konzentrationen von 200, 150, 100, 50, 25 und 12,5 pM. Nach Inkubation bei 37°C in einem Schüttelwasserbad für eine Stunde wurden 4 ml Stoppuffer (*) zum Beenden der Ausbildung von Rezeptor-Liganden Bindungen zum Inkubationsgemisch gegeben. Die auf Filtern, auf die das Inkubationsgemisch gegeben und vakuumfiltriert wurde, gesammelten Zellen wurden zweimal mit 4 ml Stoppuffer gespült, um nicht gebundene Radioaktivität zu entfernen.

(*) Herstellung des Inkubationspuffer:

154 mM NaCl \Rightarrow 8,999 g

12 mM Tris-Aminomethan \Rightarrow 1,454 g

0,55 mM (+)-Ascorbinsäure \Rightarrow 0,09669 g

30 μ M Phentolamin (Regitin®) \Rightarrow 1 ml

ad 1000 ml mit Aqua ad inject.

mit 1 M HCl auf einen pH von 7,2 bei 22°C titrieren

(in Anlehnung an Brodde, 1981)

(*) Herstellung des Stoppuffer:

154 mM NaCl \Rightarrow 8,999 g

10 mM Tris-Aminomethan \Rightarrow 1,211 g

ad 1000 ml mit Aqua ad inject.

mit 1 M HCl auf einen pH von 7,4 bei 37°C titrieren

4.3.3. Messung der Radioaktivität

Nach Ernten der Zellen wurde die Aktivität des gebundenen ICYPs in einem Gamma-Counter als Zerfälle pro Minute (cpm) gemessen. Da die Effektivität des Counters nur 75 % betrug wurden die cpm-Werte mit 0,75 multipliziert. Diese korrigierte Zahl der Zerfälle pro Minute wurde als dpm (desintegrations per minute) bezeichnet.

4.3.4. Berechnung der Rezeptorzahl

Um die Aktivität des spezifisch an den Rezeptor gebundenen Liganden zu erhalten, subtrahiert man die korrigierten dpm-Werte der Meßreihe für die Bestimmung der unspezifischen Bindung von den dpm-Werten der Meßreihe für die Bestimmung der Gesamtbindung. Die gemessenen Zerfällen pro Minute werden in die Menge an gebundenem ICYP umgerechnet, indem die dpm-Werte durch die spezifische Aktivität des ICYP (in Zerfällen pro Minute) dividiert wird:

$$A_{\text{ICYP}} = 2200 \text{ Ci/mmol}$$

bzw., da $1 \text{ Ci} = 3,7 \cdot 10^{10}$ Zefälle/Sekunde:

$$A_{\text{ICYP}} = 8140 \times 10^{10} \text{ Zefälle/ Sekunde}$$

bzw., umgerechnet auf 1 Minute

$$A_{\text{ICYP}} = 4884 \times 10^{12} \text{ Zefälle / Minute}$$

Damit lassen sich die Mengen (M_1 - M_6) an in 250 μl enthaltenem spezifisch gebundenen ICYP errechnen (in 250 μl wurden pro Ansatz die Zellen gelöst):

$$\frac{dpm_{1-6}}{4884 \times 10^{12} \text{ Zefälle/ min}} = M_{1-6}$$

Da die Radioaktivität nur am ersten Tag 2200 Ci/mmol betrug, mußten diese Werte entsprechend der jeweiligen Tagesaktivität mit einem Tagesfaktor (decay chart) dividiert werden.

$$\frac{M_{1-6}}{\text{Tagesfaktor}} = B_{1-6}$$

Nach Umrechnen von mmol in mol wurden diese Werte als X-Werte und das Verhältnis von diesen Werten zu den dazugehörigen Konzentrationen an zugefügtem ICYP (B_{1-6}/F_{1-6}) als Y-Werte in einem Diagramm, dem Scatchard-Plot, eingetragen. Nach Verbinden der einzelnen Punkte erhält man eine Regressionsgerade, deren Gleichung man durch Umformung der Scatchard-Gleichung erhält:

$$\frac{B}{F} = \frac{B_{\text{max}} - B}{Kd}$$

Umgeformt in:

$$\frac{B}{F} = -\frac{1}{Kd} \times B + \frac{B_{\text{max}}}{Kd}$$

Dies ist die Gleichung der Regressionsgeraden, wie der Vergleich mit der allgemeinen Geradengleichung zeigt:

$$\left(\frac{B}{F}\right) = \left[-\frac{1}{Kd}\right] \times \{B\} + \left\langle \frac{B_{\max}}{Kd} \right\rangle$$

$$(y) = [m] \times \{x\} + \langle b \rangle$$

m=Steigung der Geraden

b=Schnittpunkt mit der Y Achse

-b/m=Schnittpunkt mit der x-Achse

y entspricht dabei B/F, die Steigung m ist gleich $-1/Kd$, x entspricht B, der Menge an gebundenem ICYP, und der y-Achsenabschnitt b schließlich dem Verhältnis von B_{\max} zu Kd . Würde nun die Konzentration des zugefügten ICYP immer weiter erhöht werden, ginge B immer mehr gegen B_{\max} . Bei einer unendlich großen Konzentration an zugefügtem ICYP wären theoretisch alle Bindungsstellen besetzt, B wäre gleich B_{\max} :

$$\frac{B}{F \Rightarrow \infty} = -\frac{1}{Kd} \times B + \frac{B_{\max}}{Kd}$$

bzw.

$$0 = -\frac{1}{Kd} \times B + \frac{B_{\max}}{Kd}$$

Da y hier gleich Null ist, gilt für B am Schnittpunkt mit der x-Achse:

$$B = -\frac{B_{\max}}{Kd} \times (-Kd)$$

bzw.

$$B = B_{\max}$$

B_{\max} , die Menge des maximal an 600000 Zellen (so viele waren in jedem Ansatz) zu bindendem ICYP, läßt sich also als x-Achsenabschnitt in dem Scatchard-Plot ablesen.

Die Steigung m der Geraden entspricht dem negativen Kehrwert der Dissoziationskonstante:

$$m = -\frac{1}{Kd}$$

bzw.
$$Kd = -\frac{1}{m}$$

Auch die Dissoziationskonstante läßt sich also aus der Gleichung der Geraden als negativer Kehrwert der Steigung bestimmen.

Die β -Rezeptorberechnungen mit einer graphischen Darstellung des Scatchard-Plot wurden mit dem Computerprogramm Microsoft Exel 4.0 durchgeführt. Dem Ergebnisteil ist beispielhaft ein solcher Scatchard-Plot beigelegt.

4.4. Kulturansatz

Die Monozyten für die Kulturen wurden mit Nährmedium (*) auf eine Konzentration von 250000 Zellen pro ml verdünnt. Von dieser Zellsuspension wurden in 14 Vertiefungen einer 24 Well-Platte je 2ml gegeben. Nach Zugabe von Stimulans, Adrenalin und Noradrenalin in den verschiedenen Konzentrationen, dem β -Blocker Propranolol und dem α -Blocker Urapidil ergaben sich folgende Ansätze:

1. Zellsuspension (ohne Zusatz als Kontrolle)
2. Zellsuspension + Stimulans
3. Zellsuspension + Stimulans + Adrenalin, $c=1\times 10^{-5}$ M
4. Zellsuspension + Stimulans + Adrenalin, $c=1\times 10^{-5}$ M + Propranolol
5. Zellsuspension + Stimulans + Adrenalin, $c=1\times 10^{-5}$ M + Urapidil
6. Zellsuspension + Stimulans + Adrenalin, $c=1\times 10^{-9}$ M
7. Zellsuspension + Stimulans + Adrenalin, $c=1\times 10^{-9}$ M + Propranolol
8. Zellsuspension + Stimulans + Adrenalin, $c=1\times 10^{-9}$ M + Urapidil
9. Zellsuspension + Stimulans + Noradrenalin, $c=1\times 10^{-5}$ M
10. Zellsuspension + Stimulans + Noradrenalin, $c=1\times 10^{-5}$ M + Propranolol
11. Zellsuspension + Stimulans + Noradrenalin, $c=1\times 10^{-5}$ M + Urapidil
12. Zellsuspension + Stimulans + Noradrenalin, $c=1\times 10^{-9}$ M
13. Zellsuspension + Stimulans + Noradrenalin, $c=1\times 10^{-9}$ M + Propranolol
14. Zellsuspension + Stimulans + Noradrenalin, $c=1\times 10^{-9}$ M + Urapidil

Die Konzentrationen der beiden Blocker in den Kulturansätzen betrug :

Propranolol: $c = 100$ ng/ml

Urapidil: $c = 1\times 10^{-7}$ M

Stimuliert wurde in 8 Versuchen mit LPS in einer Konzentration von 10 ng/ml, in 7 Versuchen mit γ -IFN in einer Konzentration von 10 ng/ml und in 6 Versuchen mit Borrelien in einer Konzentration von ca. 5 Borrelien pro Zelle. Die Zellen wurden bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert. Nach 4, 8 und 24 Stunden wurde vorsichtig je 600 μ l

Überstand von den einzelnen Ansätzen abpipettiert und bis zur Interleukinbestimmung bei -20°C eingefroren.

(*) Herstellung des Nährmediums:

500 ml RPMI-1640-Medium

5 ml Penicillin/Streptomycin (10000 $\mu\text{g/ml}$)

10 ml L-Glutamin (200 mM)

50 ml fetales Kälberserum

4.5. Interleukinbestimmung

4.5.1. Prinzip der Interleukinbestimmung

Es gibt mehrere verschiedene Methoden, Interleukine nachzuweisen, so z.B. mit Bioassays, Radioimmunoassays (RIA), Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assays (ELISA) und indirekt durch Nachweis der Interleukin-mRNA. Bei einem Bioassay wird die Wirkung von Zytokinen auf Zielzellen beobachtet, z.B. Wachstumsfaktoren oder Wachstumsinhibitoren mit biologischen Zellteilungstests nachgewiesen. Bioassays sind zwar sensitiv, aber, da es Überschneidungen in dem Wirkspektrum der Zytokine gibt, nicht besonders spezifisch, und, da man sie nur indirekt über ihre Wirkung nachweist, für quantitative Messungen nicht geeignet. Sehr viel genauer ist der Nachweis der mRNA der Zytokine. Sie kann nach Umschreiben mit einer reversen Transkriptase und Amplifikation mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) nachgewiesen und quantifiziert werden. Dies ist eine sehr sensitive und spezifische Methode, bei der geringste Mengen an mRNA für einen Nachweis ausreichen. Einfache und genaue Methoden, die Konzentration von Zytokinen zu bestimmen, sind schließlich der ELISA und der RIA. Mit beiden Methoden kann man sehr geringe Mengen an Interleukinen einfach und schnell nachweisen. Das Prinzip beider Methoden ähnelt sich sehr. Mit einem an eine feste Phase, z. B. den Boden einer Mikrotiterplatte, gebundenen Antikörper bildet das Interleukin einen Antigen-Antikörper-Komplex. Nicht gebundenes Interleukin wird herunter gewaschen. Ein entweder radioaktiv oder mit einem Enzym markierter Antikörper gegen das Interleukin wird hinzu gegeben. Nachdem auch hier die ungebundenen Antikörper durch Waschen entfernt werden, kann bei einem RIA die Aktivität des radioaktiven Antikörpers gemessen werden, bei einem ELISA nach Zugabe eines Substrates, das von dem gebundenen Enzym in einen Farbstoff umgewandelt wird, dieser Farbstoff mit einem Photometer gemessen werden. Die Messung erfolgt gegen einen Standard, so daß die Konzentration auch geringer Mengen an bestimmt werden kann. Da er ohne Radioaktivität auskommt erfreut sich der ELISA gegenüber dem RIA immer größerer Beliebtheit. Da der ELISA wie der RIA eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweist, zudem einfach und schnell durchzuführen ist, wurden in der vorliegenden Arbeit die Interleukine mit ihm bestimmt.

4.5.2. Durchführung der Interleukinbestimmung

Verwendet wurden zur Messung der Konzentration der Interleukine IL-1 β , IL-6 und IL-12 Immunoassay KITS. Je zweimal 50 μ l (IL-1 und IL-6) bzw. 100 μ l (IL-12) der Proben wurden für eine Doppelbestimmung in Vertiefungen einer 96 Well-Platte gegeben. An den Boden der Vertiefungen gebundene Antikörper bildeten mit den in den Proben vorhandenen Interleukinen Antigen-Antikörper-Komplexe. Es wurden je 50 μ l einer Lösung mit biotinyliertem Antikörper hinzugegeben. In einer 1 (IL-1 β) bzw. 2 (IL-6, IL-12) Stunden dauernden Inkubationszeit konnte der Antikörper an sein Antigen, nämlich das Interleukin, binden. Die Platten wurden sorgfältig mit einem Waschpuffer gewaschen, nicht gebundenes Interleukin entfernt. Da an den biotinylierten Antikörper selbst noch kein Enzym gebunden ist, wurden je 100 μ l einer Lösung mit Streptavidin, an das eine Peroxidase gebunden war, hinzugegeben. Wieder wurde inkubiert, diesmal für 30 (IL-1 β , IL-12) bzw. 60 min (IL-6). Als vierte Komponente des ELISA-Sandwiches konnte das Streptavidin in dieser Zeit an das Biotin binden. Die Platten wurden ein weiteres Mal gewaschen, worauf je 100 μ l einer Lösung mit einer Substanz, die die Peroxidase in einen blauen Farbstoff umgewandelt, hinzugegeben wurde. Nach einer letzten Inkubationszeit von 25 (IL-1 β), bzw. 20 min (IL-6), bzw. 30 min (IL-12) wurden mit je 100 μ l einer Stopplösung die Umsetzung der Substanz zu einem Farbstoff unterbrochen, die blaue Farbe wandelte sich hierbei in eine gelbe um, deren Intensität mit einem Photometer bei 450 nm gemessen werden konnte. Da sehr unterschiedliche Mengen an Interleukinen gebildet wurden, mußten die Proben in unterschiedlichem Maße verdünnt werden, damit die Konzentration der Interleukine im idealen Meßbereich der ELISA-KITS lagen. Zum Verdünnen der Proben wurde ein mit dem ELISA-KIT mitgelieferter Puffer (Standard Diluent Buffer) verwendet. In einer Doppelbestimmung wurden je 2 mal 50 μ l der Proben gegen die Standardreihe gemessen.

4.6. FACS

Die Reinheit der Monozyten nach Separieren wurde durchflußzytometrisch mittels „fluorescens-activated-cell-sorting“ (FACS) bestimmt. Dies ist eine sehr genaue Methode, unterschiedliche Zellen nachzuweisen und zu trennen. Dabei bindet man mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte monoklonale Antikörper an Antigene der gesuchten Zellen. Beim Durchfließen durch eine dünne Kapillare werden die Zellen von einem Laserstrahl zum Fluoreszieren angeregt. Mit Fluoreszenzdetektoren wird das Fluoreszieren der Zellen gemessen. Verwendet man nicht nur einen Antikörper, sondern mehrere, die zudem beim Fluoreszieren Licht in unterschiedlichen Wellenlängen emittieren, können mehr als eine Zellsorte markiert und von Detektoren, die verschiedene Fluoreszenzspektren erfassen, gemessen werden. Die Zellen streuen außerdem den Laserstrahl in einer abhängig von ihrer Morphologie charakteristischen Weise. Von Detektoren werden von jeder einzelnen an ihnen vorbei fließenden Zelle sowohl das Fluoreszieren als auch Vorwärts- und Seitstreuung gemessen. Die Vorwärtsstreuung (Forward scatter: FSC) nimmt dabei mit der Zellgröße zu, ist z.B. bei Monozyten besonders groß, mit zunehmender Granulation wird die Seitwärtsstreuung (Side scatter: SSC) stärker. Die Ergebnisse können nach Stärke des FSC und SSC als auch nach Stärke des Fluoreszierens der an die Zellen gebundenen Antikörper in einem Koordinatensystem dargestellt werden. Aus der Lokalisation der in das Koordinatensystem eingetragenen Werte kann auf die Zellsorten und deren Zusammensetzung geschlossen werden.

Die Zellen können in einem zweiten Schritt in gewünschte Subpopulationen separiert werden, indem Trägertropfen, in denen sich je eine Zelle befindet, gezielt elektrostatisch aufgeladen und nach Heraustropfen aus der Kapillare von entgegengesetzt geladenen Platten abgelenkt in getrennten Gefäßen gesammelt werden. Wegen der relativ langen Zeit, die das FACS beansprucht, ist es zum Trennen größerer Zellmengen nicht geeignet. Da es aber für die Zellanalyse ideal ist, wurde es in dieser Arbeit zur Bestimmung der Reinheit der Monozyten verwendet.

4.7. Statistik

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Werte werden mehrere Verfahren des Statistikprogramms StatAdvisor verwendet. Bei normalverteilten Werten und gleichen Varianzen werden parametrische Tests verwendet. Bei signifikanter Anova-Varianzanalyse ($p < 0.05$), werden die einzelnen Werte mittels Fishers-LSD (least significant difference)-Test miteinander verglichen und sofern signifikant unterschiedlich zum Stimulationswert in den Diagrammen mit einem Sternchen gekennzeichnet. Liegt der p-Wert der Varianzanalyse zwischen 0.05 und 0.1, so werden diese Werte als eine Tendenz anzeigend interpretiert. Da die Absolutwerte der gemessenen Interleukine eine starke Streubreite zeigen, werden nicht die Mittelwerte dieser miteinander verglichen, sondern die Prozentwerte der gemessenen Interleukine bezogen auf den Stimulationswert, der mit 100 % festgesetzt wird. Signifikante Katecholamineinflüsse werden in Korrelation mit den gemessenen β -Rezeptorzahlen der einzelnen Versuche gesetzt.

5. Ergebnisse der Stimulationsversuche

5.1. Einführung

Die Interleukinwerte und die Anzahl an β -Rezeptoren auf den Monozyten wird auf folgende Fragestellungen untersucht:

Ist es durch die drei Stimulantien (Borrelien, LPS und IFN- γ) im Vergleich zum Leerwert zu einer Stimulation im Sinne einer vermehrten Produktion von Interleukinen gekommen.

Ist der Stimulationserfolg durch Katecholamine zu beeinflussen und ist der mögliche Katecholamineinfluß mit Propranolol oder Urapidil antagonisierbar.

Findet sich eine Korrelation zwischen der Anzahl an β -Rezeptoren und dem Einfluß von Katecholaminen.

Da schon bei den Leerwerten sehr unterschiedliche Konzentrationen an Interleukinen gemessen wurden, die Zellen aber vor allem sehr unterschiedlich ausgeprägt mit vermehrter Produktion an Interleukinen auf den Stimulationsreiz reagierten, werden nicht nur die Absolutwerte miteinander verglichen, sondern es werden Prozentwerte miteinander verglichen, bezogen auf die Konzentration an Interleukin bei der reinen Stimulation, die mit 100 Prozent festgesetzt wird.

5.2. Stimulationserfolg

Die zentrale Frage nach der Beeinflußbarkeit eines Stimulationserfolges setzt voraus, daß es verglichen mit den Leerwerten bei den Stimulationswerten zu einer Änderung der Interleukinproduktion kommt. Dies wurde vor allem auch, um die optimale Dosis der einzelnen Stimuli zu bestimmen, in Vorversuchen abgeklärt. Es zeigte sich, daß dies nicht immer der Fall ist, teilweise kann überhaupt keine Produktion an Interleukinen gemessen werden. IFN- γ ist nicht in der Lage, die Produktion von IL-12 anzuregen. Die Produktion von IL-12 kommt nach Behandlung mit Borrelien erst nach 8 Stunden und

nach Behandlung mit LPS erst nach 24 Stunden in Gang. Während die basalen Konzentrationen von IL-1 und IL-12 entweder nicht oder kaum meßbar sind, kommt es auch ohne Stimulans zu einer deutlichen Produktion an IL-6. So ist es möglich, daß mit IFN- γ eine verminderten Produktion an IL-6 gemessen wird und demnach der Einfluß von Katecholaminen auf eine Suppression der Produktion von IL-6 durch IFN- γ untersucht wird.

Zum Teil kann nach Zugabe eines Stimulans bei einzelnen Versuchen kein Interleukin gemessen werden, obwohl andere Versuche mit demselben Stimulans gute Stimulationsergebnisse bieten. So ist die Zahl (n) der in die Berechnungen eingehenden Werte nicht allein von der Anzahl der durchgeführten Versuche (Borrelie: 6, LPS: 8, IFN- γ : 7), sondern auch vom Interleukin, das bei dem Versuch bestimmt wird, abhängig. Bei einigen Versuchen kann nach 4 noch nicht bei jedem, nach 8 beziehungsweise nach 24 Stunden bei jedem Versuch Interleukin bestimmt werden. So ist n auch abhängig vom Zeitpunkt der Interleukinbestimmung, es gehen nach Stimulation mit Borrelie bei Bestimmung von IL-6 nach 4 Stunden nur 5 Werte, nach 8 und 24 Stunden aber 6 Werte in die Berechnung ein.

5.2.1. Einfluß von LPS

Nach Stimulation mit LPS kommt es zu einer nicht signifikanten Steigerung der Produktion von IL-1 nach 4 Stunden um das 1.4fache, so daß hier kein Einfluß von Katecholaminen auf den Stimulationserfolg geprüft wird. Nach 8 Stunden ist die Konzentration von IL-1 2.1 mal und nach 24 Stunden 2.5 mal so groß wie die des Leerwertes. Die Konzentrationen von IL-6 sind nach Stimulation mit LPS nach 4 Stunden 2.5 mal, nach 8 Stunden 2.6 mal und nach 24 Stunden 2 mal so hoch wie die Leerwerte. Zu einer nennenswerten Produktion und auch Produktionssteigerung von IL-12 nach Stimulation mit LPS kommt es erst nach 24 Stunden. Hier sind die Stimulationswerte 6.4 mal so hoch wie die Leerwerte.

5.2.2. Einfluß von IFN- γ

Nach Stimulation mit IFN- γ kommt es zu einer leicht vermehrten Produktion an IL-1, nach 4 Stunden wird, verglichen mit dem Leerwert, 1.9 mal, nach 8 Stunden 2.1 mal und nach 24 Stunden 1.1 mal so viel IL-1 produziert. Die Steigerung nach Stimulation mit IFN- γ ist demnach viel geringer als nach Stimulation mit Borrelien, insbesondere die nach 24 Stunden ist zu vernachlässigen. Die Werte von IL-6 vermindern sich sogar nach Zugabe von IFN- γ , nach 4 Stunden vermindert sich die Produktion um das 1.5fache, nach 8 Stunden um das 2,8fache und nach 24 Stunden um das 1.9fache. Während also bezüglich der Produktion von IL-1 nach Stimulation für 24 Stunden kein Einfluß von Katecholaminen auf den Stimulationseffekt nachzuweisen ist, da es hier zu keiner signifikanten Änderung im Vergleich zum Leerwert kommt, ist dieses bezüglich der Produktion von IL-6 möglich, auch wenn hier kein Einfluß auf den stimulierenden Einfluß wie bei den anderen Versuchen, sondern ein Einfluß auf den hemmenden Effekt von IFN- γ gegeben ist. Eine Produktion von IL-12 nach Stimulation mit IFN- γ war nicht nachzuweisen, allenfalls war bei einzelnen Versuchen eine minimale Produktion von IL-12 vorhanden. Für eine statistische Auswertung waren diese Werte aber nicht geeignet.

5.2.3. Einfluß von Borrelien

Es kommt bei den Versuchen mit Stimulation mit Borrelien zu einer Steigerung des basal produzierten IL-1 um das 6.4fache nach 4 Stunden, um das 4.6fache nach 8 Stunden und um das 2.2fache nach 24 Stunden. Das basal produzierte IL-6 steigert sich nach Stimulation mit Borrelien nach 4 Stunden auf das 7.3fache, nach 8 Stunden auf das 8.3fache und die Werte nach 24 Stunden sind durchschnittlich 5fach höher. Die Leerwerte von IL-12 steigern sich nach 8 Stunden Stimulation um den Faktor 45.8, nach 24 Stunden auf das 5.4fache.

5.3. Einfluß der Katecholamine

5.3.1. Einfluß nach Stimulation mit LPS

a) LPS und IL-1

Nach Stimulation mit LPS für 8 Stunden zeigt sich tendenziell ($p < 0,1$) ein hemmender Einfluß von Noradrenalin 10^{-5} M ($87,8 \pm 16,6\%$) und Noradrenalin 10^{-9} M ($85,5 \pm 11,2\%$), nicht aber von Adrenalin. Der Einfluß ist nicht signifikant unterschiedlich. Dieser Einfluß kann nicht mit Propranolol und Urapidil antagonisiert werden. Nach 4 und 24 Stunden ist kein signifikanter Einfluß von Katecholaminen nachzuweisen.

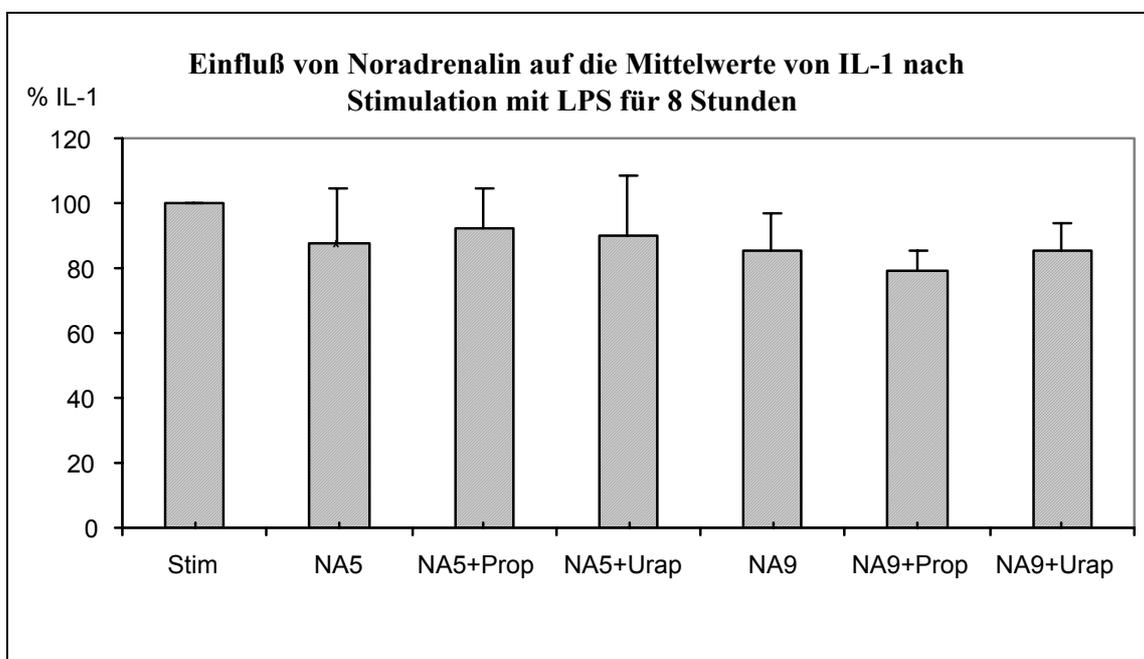


Abb. 3: Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung der Prozentwerte von IL-1 nach Stimulation mit LPS für 8 Stunden. Es wird der Stimulationswert (Stim) mit den Werten unter Behandlung mit Noradrenalin 10^{-5} M (NA5) und Noradrenalin 10^{-9} M (NA9) und den Werten unter Kombination der Katecholamine mit den Antagonisten Propranolol (Prop) und Urapidil (Urap) verglichen.

b) LPS und IL-6

Für die Werte von IL-6 nach Stimulation mit LPS für 4, 8 und 24 Stunden ist die Varianzanalyse nicht signifikant ($p > 0,05$).

c) LPS und IL-12

Erst nach 24 Stunden Stimulation mit LPS sind nennenswerte Konzentrationen an IL-12 zu messen, so daß sich hier ein Prüfen des Einflusses von Katecholaminen die Werte nach 4 und 8 Stunden erübrigt. Die Varianzanalyse ist für die Werte nach 24 Stunden signifikant ($p < 0.000$). Es zeigt sich eine signifikante Hemmung der Produktion von IL-12 mit Adrenalin 10^{-5} M ($60,5 \pm 23\%$) und Noradrenalin 10^{-5} M ($54,4 \pm 20\%$). Mit Propranolol läßt sich der Noradrenalineinfluß ($78,1 \pm 18,4\%$) signifikant, der Adrenalineinfluß tendenziell ($67,8 \pm 14,8\%$) hemmen. Mit Urapidil kommt es zu keiner Änderung

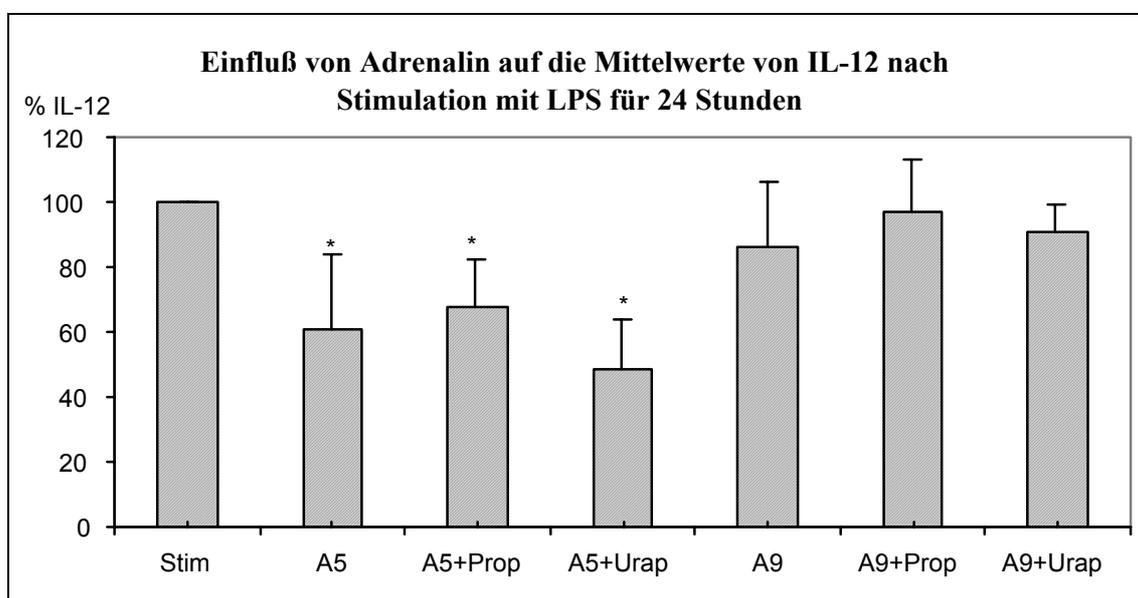


Abb. 4: Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung der Prozentwerte von IL-12 nach Stimulation mit LPS für 24 Stunden. Es wird der Stimulationswert (Stim) mit den Werten unter Behandlung mit Adrenalin 10^{-5} M (A5) und Adrenalin 10^{-9} M (A9) und den Werten unter Kombination der Katecholamine mit den Antagonisten Propranolol (Prop) und Urapidil (Urap) verglichen. Signifikant unterschiedliche Werte zum Stimulationswert sind mit einem Sternchen markiert.

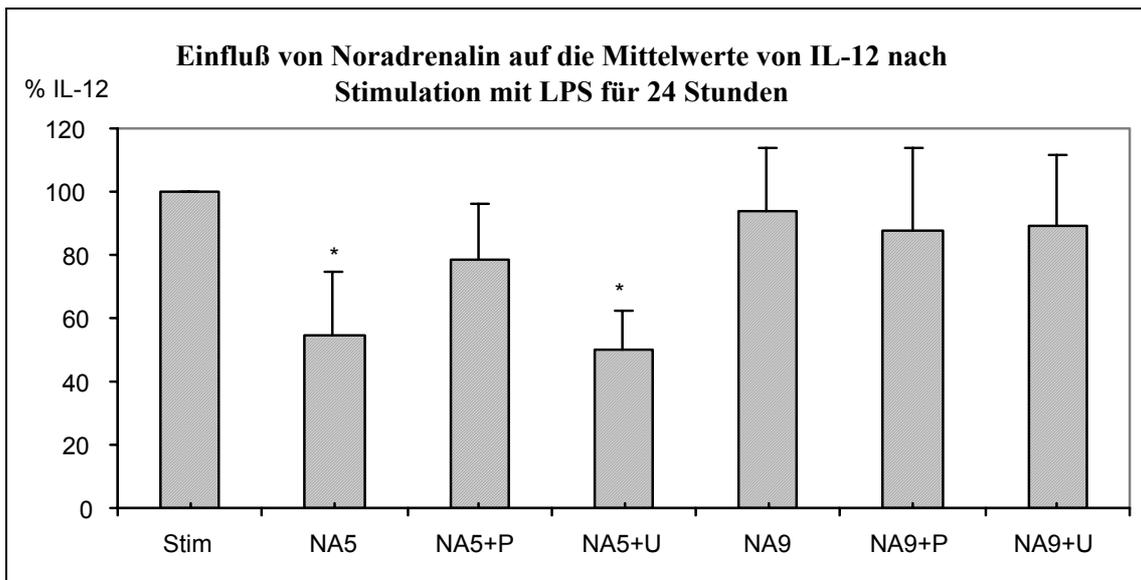


Abb. 5: Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung der Prozentwerte von IL-12 nach Stimulation mit LPS für 24 Stunden. Es wird der Stimulationswert (Stim) mit den Werten unter Behandlung mit Noradrenalin 10^{-5} M (NA5) und Noradrenalin 10^{-9} M (NA9) und den Werten unter Kombination der Katecholamine mit den Antagonisten Propranolol (Prop) und Urapidil (Urap) verglichen. Signifikant unterschiedliche Werte zum Stimulationswert sind mit einem Sternchen markiert.

d) Zusammenfassung des Einflusses von Katecholaminen nach Stimulation mit LPS

Es findet sich ein hemmender Einfluß von Noradrenalin auf die Produktion von IL-1 in hoher und niedriger Konzentration nach Stimulation mit LPS für 8 Stunden, der sich nicht signifikant antagonisieren läßt. Die Produktion von IL-6 kann nicht beeinflusst werden. Adrenalin und Noradrenalin in hohen Konzentrationen (10^{-5} M) hemmen die Produktion von IL-12 nach 24 Stunden. Der Einfluß von hochkonzentriertem Noradrenalin ist hier mit Propranolol hemmbar.

5.3.2. Einfluß nach Stimulation mit IFN- γ

IFN- γ und IL-1

Die Varianzanalyse zeigt keine Signifikanz ($p > 0,05$) für die Prozentwerte von IL-1 nach Stimulation mit IFN- γ für 4 und 8 Stunden.

Nach 24 Stunden steigerte sich die Produktion von IL-1 im Vergleich zum Leerwert nur minimal, nicht signifikant um das 1.1fache. Es läßt sich demnach kein Einfluß auf einen Stimulationserfolg feststellen. Trotzdem ist es natürlich möglich, daß sich die von der basalen nicht unterschiedlichen Produktion von IL-1 nach Aktivierung mit IFN- γ anders durch Katecholamine beeinflussen läßt. Für die Prozentwerte nach 24 Stunden Stimulation zeigt die Varianzanalyse eine Signifikanz mit einem $p=0,0001$. Im einzelnen findet sich kein signifikanter Einfluß von Adrenalin 10^{-5} M (118+/-57,7%), Adrenalin 10^{-9} M (79+/-15%) und Noradrenalin 10^{-5} M (91,4+/-15,1%). Noradrenalin 10^{-9} M führt zu einer signifikanten Hemmung der Produktion von IL-1 (74,3+/-4,7%). Propranolol (63,7+/-7,9%) und Urapidil (61,9+/-11,7%) können den Effekt von Noradrenalin 10^{-9} M nicht ändern. Obwohl Adrenalin 10^{-9} M allein die Produktion von IL-1 nicht zu hemmen vermag, wird sie durch die Kombination von Adrenalin 10^{-9} M und Propranolol beziehungsweise Urapidil signifikant vermindert (Propranolol: 67,5+/-16,5%, Urapidil: 73,8+/-15,1%). Entsprechend zeigt die Kombination von Noradrenalin 10^{-5} M und Propranolol ein signifikante Hemmung (74%+/-11%).

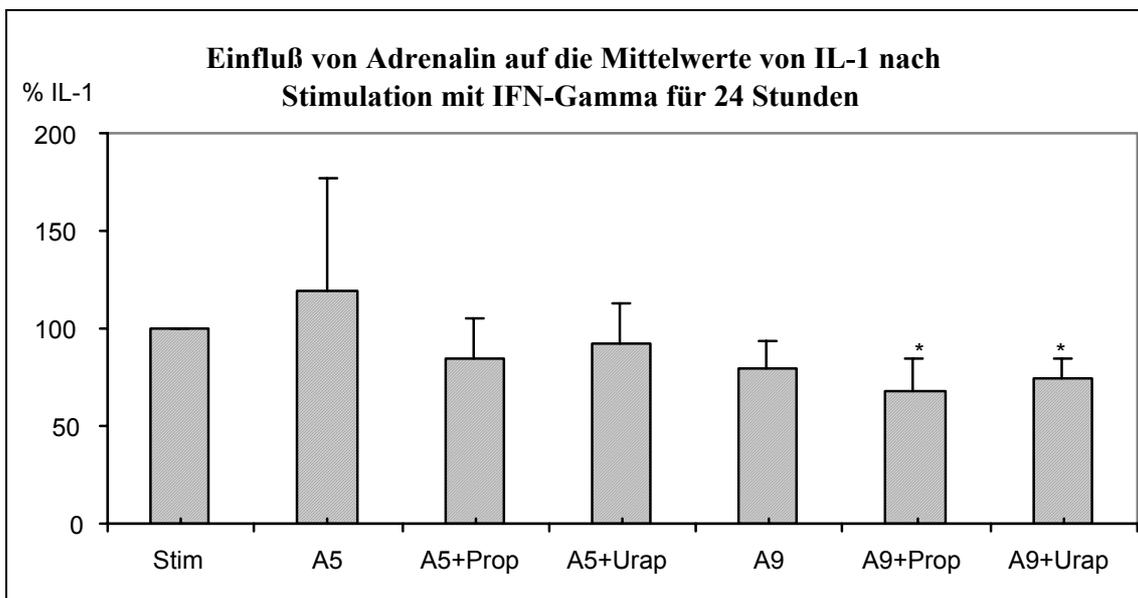


Abb. 6: Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung der Prozentwerte von IL-1 nach Stimulation mit IFN- γ für 24 Stunden. Es wird der Stimulationswert (Stim) mit den Werten unter Behandlung mit Adrenalin 10^{-5} M (A5) und Adrenalin 10^{-9} M (A9) und den Werten unter Kombination der Katecholamine mit den Antagonisten Propranolol (Prop) und Urapidil (Urap) verglichen. Signifikant unterschiedliche Werte zum Stimulationswert sind mit einem Sternchen markiert.

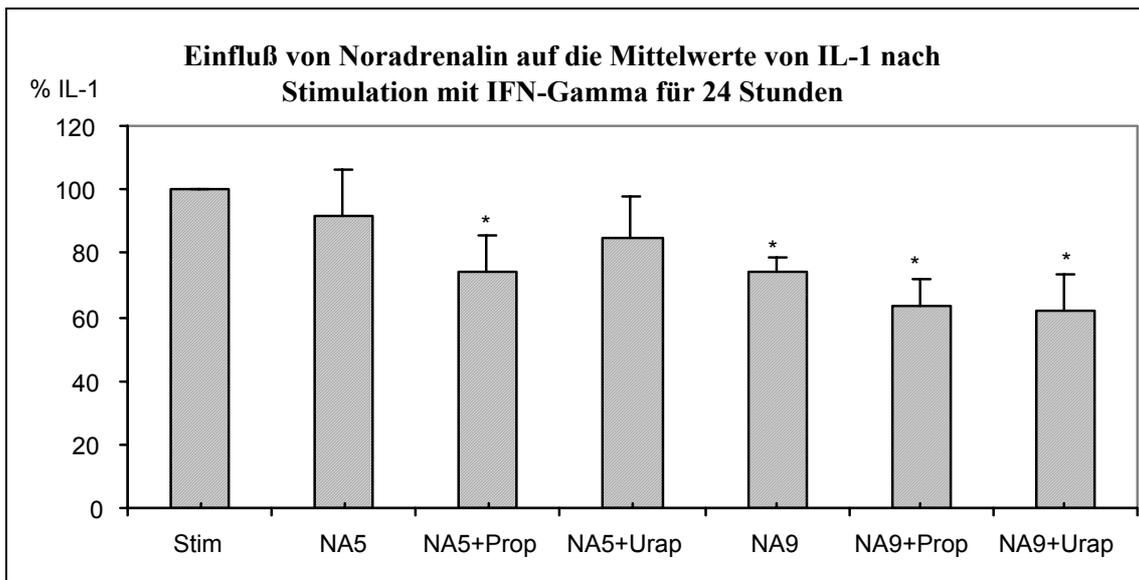


Abb. 7: Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung der Prozentwerte von IL-1 nach Stimulation mit IFN- γ für 24 Stunden. Es wird der Stimulationswert (Stim) mit den Werten unter Behandlung mit Noradrenalin 10^{-5} M (NA5) und Noradrenalin 10^{-9} M (NA9) und den Werten unter Kombination der Katecholamine mit den Antagonisten Propranolol (Prop) und Urapidil (Urap) verglichen. Signifikant unterschiedliche Werte zum Stimulationswert sind mit einem Sternchen markiert.

b) IFN- γ und IL-6

Nach Stimulation mit IFN- γ für 4 Stunden sind keine nennenswerten Konzentrationen an IL-6 meßbar. Für die Werte nach 8 Stunden zeigt sich eine Signifikanz mit einem $p < 0,02$. Adrenalin 10^{-9} M (95,8 \pm 34,8%) und Noradrenalin 10^{-9} M (85 \pm 60,2%) führen zu keiner Änderung der Produktion von IL-6 nach 8 Stunden. Mit Noradrenalin 10^{-5} M wird die Produktion von IL-6 signifikant verstärkt (163,8 \pm 73,5%). Diese Änderung läßt sich mit Propranolol (93,8 \pm 40,6%), nicht aber mit Urapidil (169,7 \pm 4,9%) hemmen. Dieser stimulierende Einfluß, der mit Propranolol reduziert werden kann, zeigt sich tendenziell auch für Adrenalin 10^{-5} M (134 \pm 18,5%). Die Kombination von Adrenalin 10^{-5} M und Urapidil führt zu einer signifikanten Verstärkung der Produktion von IL-6 (169,6 \pm 11,4%).

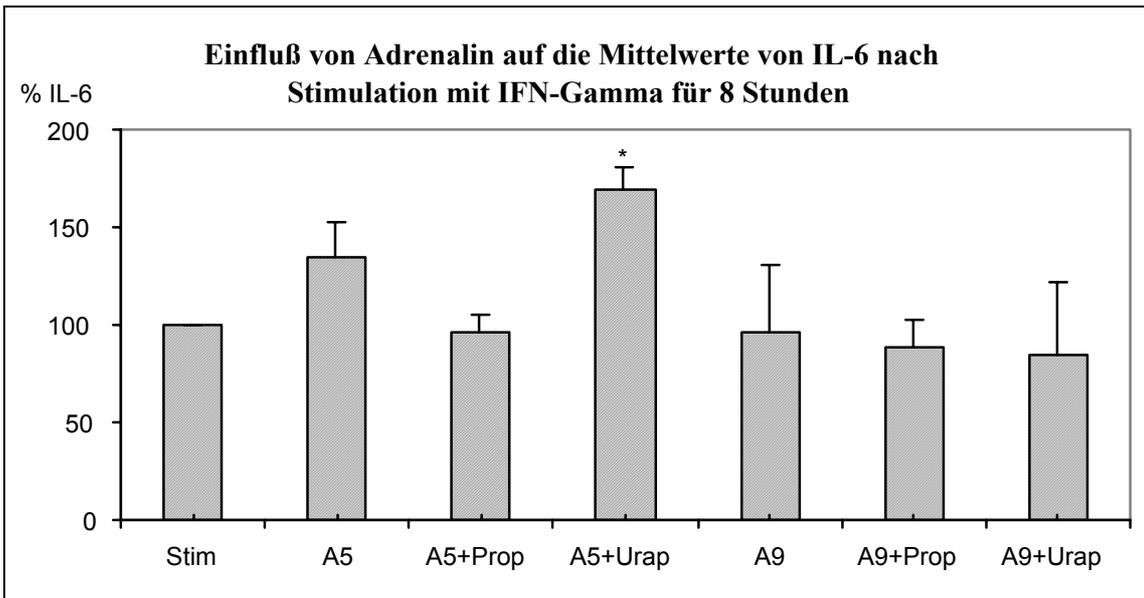


Abb. 8: Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung der Prozentwerte von IL-6 nach Stimulation mit IFN- γ für 8 Stunden. Es wird der Stimulationswert (Stim) mit den Werten unter Behandlung mit Adrenalin 10^{-5} M (A5) und Adrenalin 10^{-9} M (A9) und den Werten unter Kombination der Katecholamine mit den Antagonisten Propranolol (Prop) und Urapidil (Urap) verglichen. Signifikant unterschiedliche Werte zum Stimulationswert sind mit einem Sternchen markiert.

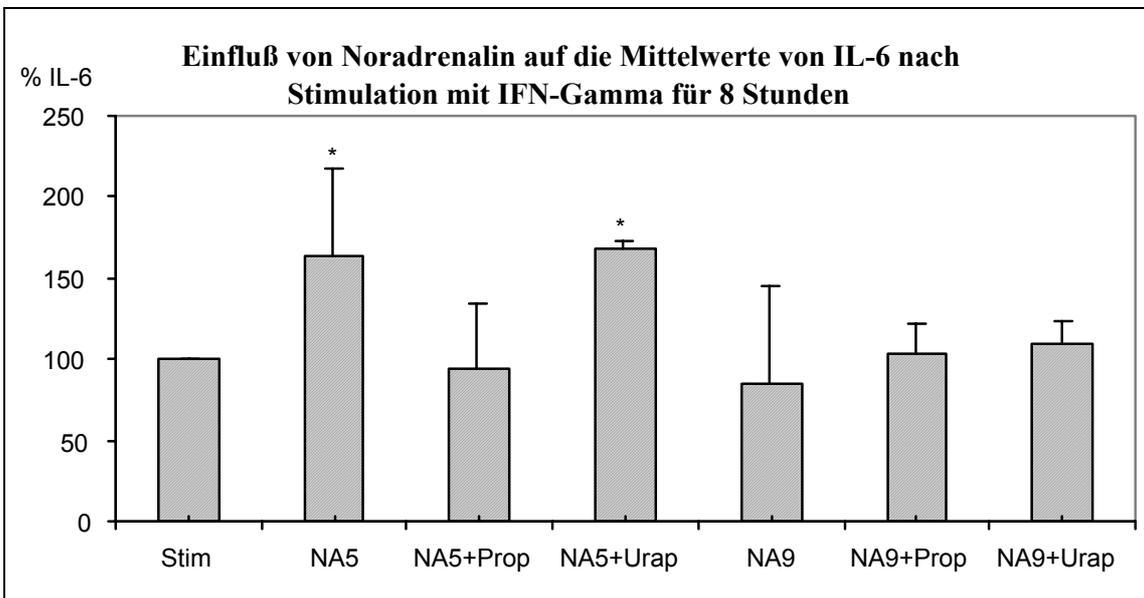


Abb. 9: Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung der Prozentwerte von IL-6 nach Stimulation mit IFN- γ für 8 Stunden. Es wird der Stimulationswert (Stim) mit den Werten unter Behandlung mit Noradrenalin 10^{-5} M (NA5) und Noradrenalin 10^{-9} M (NA9) und den Werten unter Kombination der Katecholamine mit den Antagonisten Propranolol (Prop) und Urapidil (Urap) verglichen. Signifikant unterschiedliche Werte zum Stimulationswert sind mit einem Sternchen markiert.

Die Varianzanalyse ist signifikant ($p < 0,02$) für die IL-6-Werte nach Behandlung mit IFN- γ für 24 Stunden. Adrenalin 10^{-5} M ($99,8 \pm 39,9\%$) und Noradrenalin 10^{-5} M ($68,6 \pm 28,8\%$) führen nicht zu einer Änderung der Produktion von IL-6 nach Behandlung mit IFN- γ . In den niedrigen Konzentrationen (10^{-9} M) können Adrenalin ($52,9 \pm 36,7\%$) und Noradrenalin ($46,5 \pm 19,6\%$) die Produktion von IL-6 hemmen, was weder mit Propranolol noch mit Urapidil antagonisiert werden kann. Dabei hemmen sie die Produktion von IL-6 nicht signifikant unterschiedlich. Die Kombination von Propranolol mit Adrenalin und Noradrenalin in den hohen Konzentrationen hemmt die Produktion von IL-6 (Adrenalin 10^{-5} M + Propranolol: $57,5 \pm 27,8\%$, Noradrenalin 10^{-5} M + Propranolol: $30,6 \pm 22,3\%$). Die Kombination mit Urapidil führt nicht zu einer ähnlichen Änderung (Adrenalin 10^{-5} M + Urapidil: $83,6 \pm 44\%$, Noradrenalin 10^{-5} M + Urapidil: $75,6 \pm 38\%$).

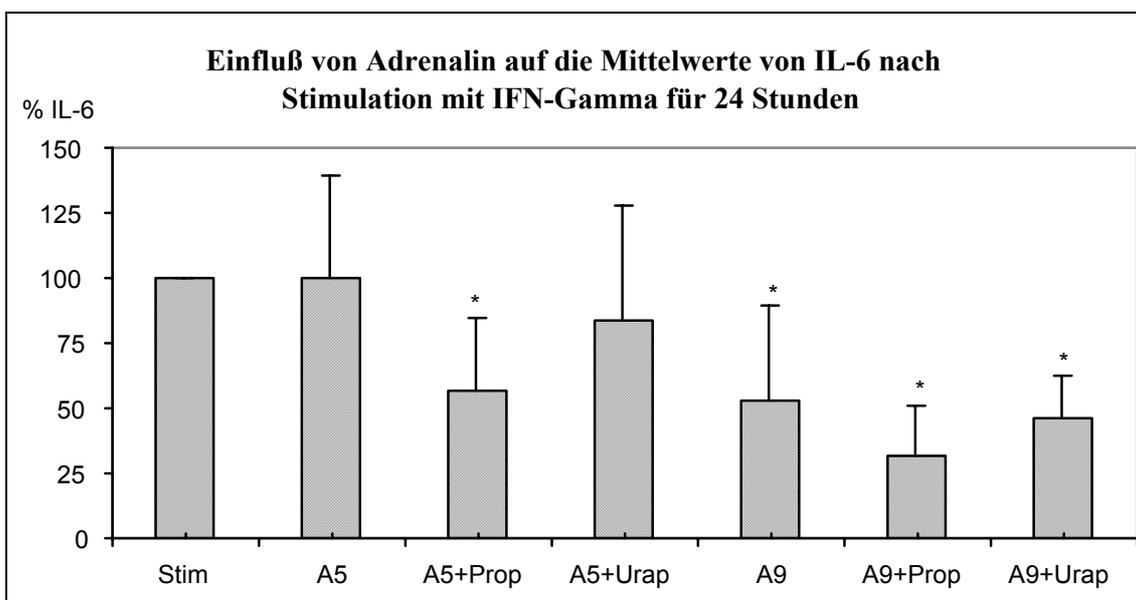


Abb. 10: Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung der Prozentwerte von IL-6 nach Stimulation mit IFN- γ für 24 Stunden. Es wird der Stimulationswert (Stim) mit den Werten unter Behandlung mit Adrenalin 10^{-5} M (A5) und Adrenalin 10^{-9} M (A9) und den Werten unter Kombination der Katecholamine mit den Antagonisten Propranolol (Prop) und Urapidil (Urap) verglichen. Signifikant unterschiedliche Werte zum Stimulationswert sind mit einem Sternchen markiert.

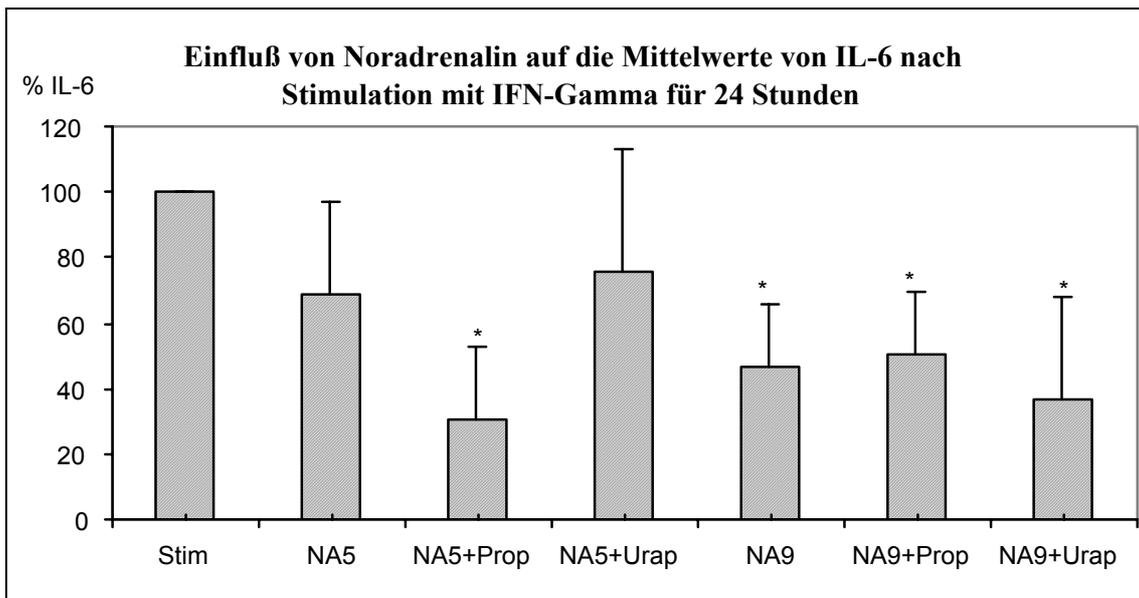


Abb. 11: Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung der Prozentwerte von IL-6 nach Stimulation mit IFN- γ für 24 Stunden. Es wird der Stimulationswert (Stim) mit den Werten unter Behandlung mit Noradrenalin 10^{-5} M (NA5) und Noradrenalin 10^{-9} M (NA9) und den Werten unter Kombination der Katecholamine mit den Antagonisten Propranolol (Prop) und Urapidil (Urap) verglichen. Signifikant unterschiedliche Werte zum Stimulationswert sind mit einem Sternchen markiert.

c) IFN- γ und IL-12

Nach Behandlung mit IFN- γ war keine Produktion von IL-12 meßbar.

d) Zusammenfassung des Einflusses von Katecholaminen nach Behandlung mit IFN- γ

Für die IL-1 Werte nach 8 Stunden Behandlung mit IFN- γ findet sich kein Einfluß durch Katecholamine. Nach 24 Stunden hemmt nur Noradrenalin 10^{-9} M die Produktion von IL-1, was weder mit Propranolol noch mit Urapidil antagonisiert werden kann. Sowohl Adrenalin 10^{-9} M in Kombination mit Propranolol beziehungsweise Urapidil als auch Noradrenalin 10^{-5} M in Kombination Propranolol führen ebenfalls zu einer Hemmung der Produktion von IL-1 nach 24 Stunden.

Die Produktion an IL-6 wird nach Behandlung mit IFN- γ für 8 Stunden durch Noradrenalin 10^{-5} M verstärkt, was sich mit Propranolol antagonisieren läßt. Adrenalin 10^{-5} M, 10^{-9} M und Noradrenalin 10^{-9} M ändern die Konzentration von IL-6 nicht. Bei

Kombination von Adrenalin 10^{-5} M und Urapidil führt zu einer verstärkten Produktion von IL-6.

Nach 24 Stunden vermindern Adrenalin 10^{-9} M und Noradrenalin 10^{-9} M die Produktion an IL-6, was nicht mit Propranolol oder Urapidil gehemmt werden kann. Die Kombination von Adrenalin 10^{-5} M beziehungsweise Noradrenalin 10^{-5} M mit Propranolol führt zu einer Hemmung der Produktion von IL-6

5.3.3. Einfluß nach Stimulation mit Borrelien

a) Borrelien und IL-1 und IL-6

Die Varianzanalyse ist weder für die IL-1-Werte noch für die IL-6-Werte nach Stimulation mit Borrelien für 4, 8 und 24 Stunden signifikant ($p > 0,1$)

b) Borrelien und IL 12

Nach 4 Stunden Stimulation mit Borrelien sind noch keine nennenswerten Konzentrationen an IL-12 zu messen.

Die Varianzanalyse der Prozentwerte von IL12 nach Stimulation mit Borrelien für 8 und 24 Stunden ergibt eine Signifikanz mit $p < 0.0001$. Die Produktion von IL-12 läßt sich nach 8 Stunden mit Adrenalin 10^{-5} M signifikant ($56,2 \pm 17\%$), und mit Noradrenalin 10^{-5} M tendenziell ($77,5 \pm 17,4\%$) vermindern. Der Einfluß von Adrenalin 10^{-5} M ist mit Propranolol zu hemmen ($97,4 \pm 24,6\%$), der Einfluß von Noradrenalin wird nicht nur gehemmt, es kommt sogar zu einer signifikant verstärkten Produktion von IL-12 ($146,9 \pm 9,8\%$). Adrenalin 10^{-9} M und Noradrenalin 10^{-9} M verstärken die Produktion von IL-12 leicht (Adrenalin: $126,4 \pm 22,5\%$; Noradrenalin $126,7 \pm 16\%$). Diese Änderung ist nicht signifikant. In Kombination mit Propranolol und Urapidil steigern aber Adrenalin 10^{-9} M und Noradrenalin 10^{-9} M die Produktion von IL-12 nach 8 Stunden (Adrenalin 10^{-9} M + Propranolol: $137,9 \pm 31,7\%$; Adrenalin 10^{-9} M + Urapidil: $143,9 \pm 36\%$; Noradrenalin 10^{-9} M + Propranolol: $130 \pm 29\%$; Noradrenalin 10^{-9} M + Urapidil: $140,6 \pm 33,6\%$).

Nach Stimulation für 24 Stunden zeigt sich eine signifikante ($p < 0,000$) Hemmung der Produktion von IL-12 mit Adrenalin 10^{-5} M ($45,8 \pm 20,1\%$) und Noradrenalin 10^{-5} M ($41,2 \pm 18,8\%$) im Vergleich zum Stimulationseffekt (100%). Der Einfluß von Adrenalin ist dabei nicht signifikant unterschiedlich zu dem von Noradrenalin. Die Änderung durch Adrenalin 10^{-5} M kann weder mit Propranolol ($61,6 \pm 29,8\%$) noch mit Urapidil ($40,7 \pm 22,8\%$) signifikant gehemmt werden. Der Einfluß von Noradrenalin kann nicht mit Urapidil ($42,6 \pm 15,1\%$), aber mit Propranolol ($83,5 \pm 29,3\%$) signifikant gehemmt werden. Adrenalin 10^{-9} M ($102,9 \pm 16,9\%$) und Noradrenalin 10^{-9} M ($91,6 \pm 20,8\%$) ändern die Produktion von IL-12 nicht.

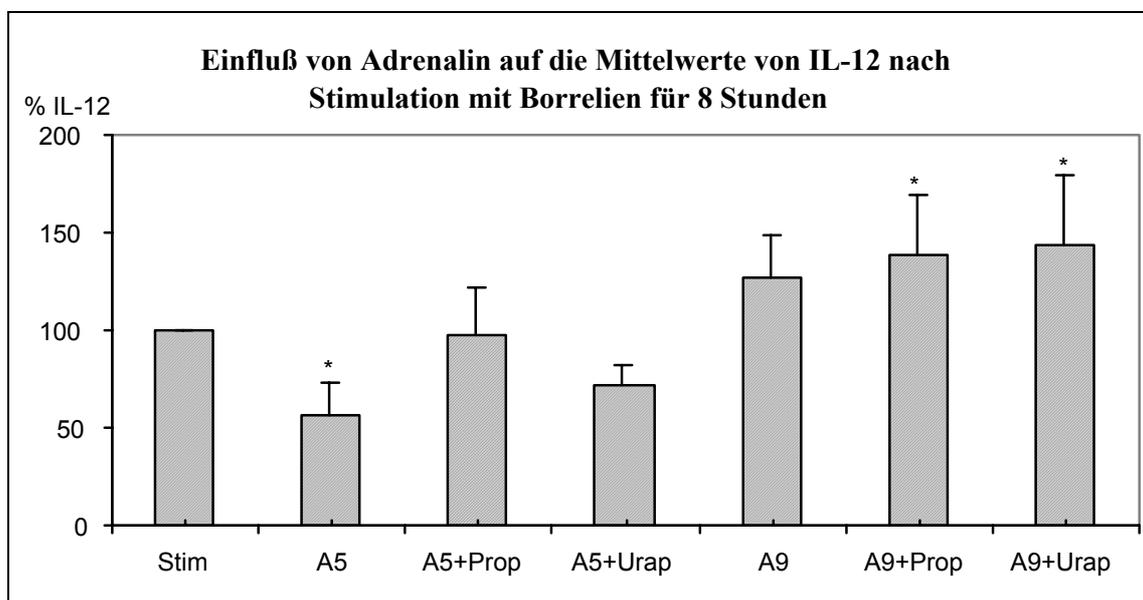


Abb. 13: Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung der Prozentwerte von IL-12 nach Stimulation mit Borrelien für 8 Stunden. Es wird der Stimulationswert (Stim) mit den Werten unter Behandlung mit Adrenalin 10^{-5} M (A5) und Adrenalin 10^{-9} M (A9) und den Werten unter Kombination der Katecholamine mit den Antagonisten Propranolol (Prop) und Urapidil (Urap) verglichen. Signifikant unterschiedliche Werte zum Stimulationswert sind mit einem Sternchen markiert.

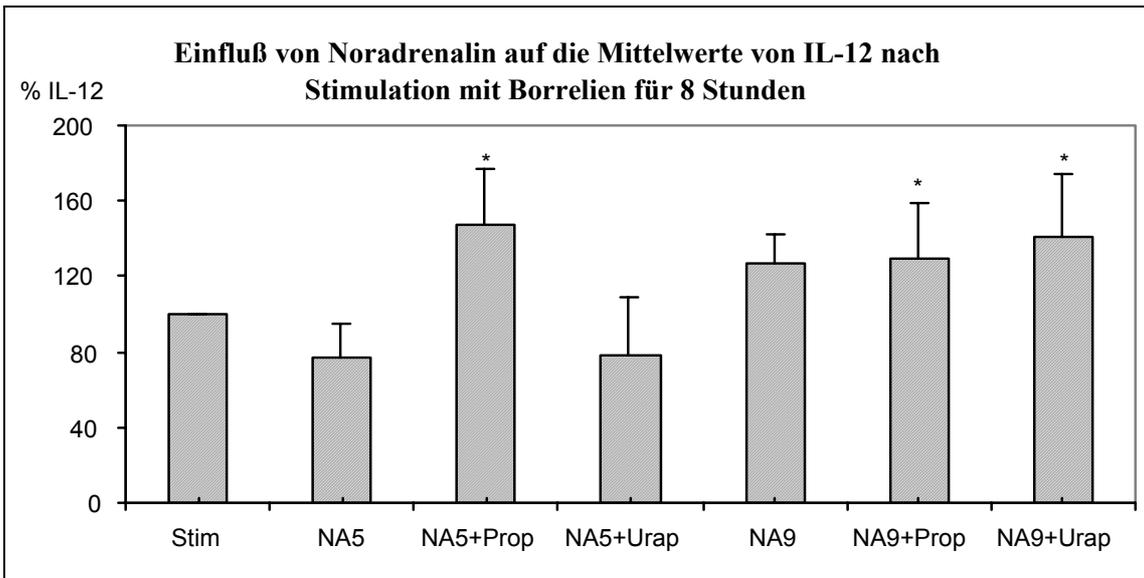


Abb 14: Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung der Prozentwerte von IL-12 nach Stimulation mit Borrelien für 8 Stunden. Es wird der Stimulationswert (Stim) mit den Werten unter Behandlung mit Noradrenalin 10^{-5} M (NA5) und Noradrenalin 10^{-9} M (NA9) und den Werten unter Kombination der Katecholamine mit den Antagonisten Propranolol (Prop) und Urapidil (Urap) verglichen. Signifikant unterschiedliche Werte zum Stimulationswert sind mit einem Sternchen markiert.

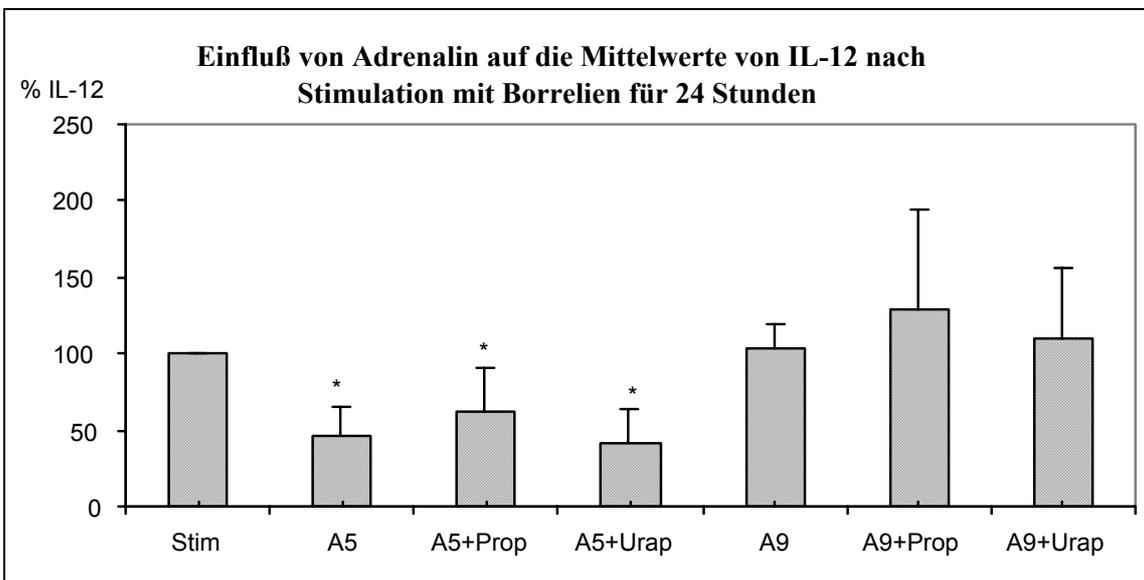


Abb 15: Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung der Prozentwerte von IL-12 nach Stimulation mit Borrelien für 24 Stunden. Es wird der Stimulationswert (Stim) mit den Werten unter Behandlung mit Adrenalin 10^{-5} M (A5) und Adrenalin 10^{-9} M (A9) und den Werten unter Kombination der Katecholamine mit den Antagonisten Propranolol (Prop) und Urapidil (Urap) verglichen. Signifikant unterschiedliche Werte zum Stimulationswert sind mit einem Sternchen markiert.

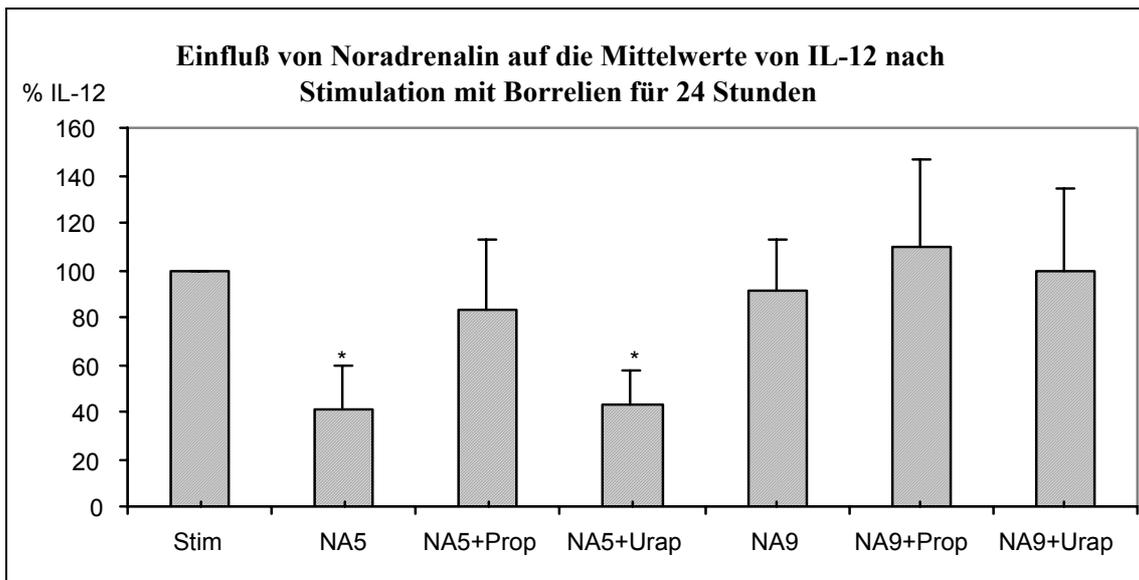


Abb. 16: Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung der Prozentwerte von IL-12 nach Stimulation mit Borrelien für 24 Stunden. Es wird der Stimulationswert (Stim) mit den Werten unter Behandlung mit Noradrenalin 10^{-5} M (NA5) und Noradrenalin 10^{-9} M (NA9) und den Werten unter Kombination der Katecholamine mit den Antagonisten Propranolol (Prop) und Urapidil (Urap) verglichen. Signifikant unterschiedliche Werte zum Stimulationswert sind mit einem Sternchen markiert.

c) Zusammenfassung des Einflusses von Katecholaminen nach Stimulation mit Borrelien

Die Produktion von IL-1 und IL-6 nach Stimulation mit Borrelien läßt sich durch Katecholamine nicht beeinflussen. Bei den IL-12 Werten nach 8stündiger Stimulation findet sich ein hemmender Einfluß von Adrenalin und Noradrenalin in hohen Konzentrationen. Der Einfluß von Adrenalin läßt sich mit Propranolol hemmen. Kombinationen von Adrenalin 10^{-9} M und Noradrenalin 10^{-9} M mit den beiden Antagonisten stimulieren die Produktion von IL-12. Bei den Werten nach 24 Stunden Stimulation zeigt sich ein hemmender Einfluß von Adrenalin 10^{-5} M und Noradrenalin 10^{-5} M, dieser ist für Adrenalin und Noradrenalin in den niedrigen Konzentrationen nicht nachzuweisen. Mit Propranolol läßt sich der Einfluß von Noradrenalin hemmen, ansonsten ist die Adrenalin- und Noradrenalinwirkung mit Propranolol und Urapidil nicht zu antagonisieren.

5.4. β -Rezeptoren

5.4.1. Anzahl an β -Rezeptoren

Parallel zu jedem Stimulationsversuch werden auf Monozyten, die aus demselben Buffy-coat stammen, die Anzahl an β -Rezeptoren bestimmt. Bei insgesamt 20 β -Rezeptorenbestimmungen finden sich durchschnittliche 1316,4 \pm 783,2 β -Rezeptoren auf den Monozyten mit einem Maximum von 2867 und einem Minimum von 444 β -Rezeptoren.

5.4.2. Korrelation zwischen β -Rezeptoren und Katecholamineinfluß

Um festzustellen, ob die Anzahl an β -Rezeptoren mit dem Einfluß der Katecholamine korreliert, wird die Rang-Korrelation nach Spearman berechnet. Neben der Anzahl an β -Rezeptoren gehen die Prozentwerte der gemessenen Interleukinkonzentrationen (bezogen auf den reinen Stimulationswert als 100 %) nach Zugabe von Adrenalin beziehungsweise Noradrenalin ein. Es zeigt sich, daß in keinem Stimulationsversuch die Anzahl an β -Rezeptoren signifikant mit den Adrenalinwerten und Noradrenalinwerten korreliert.

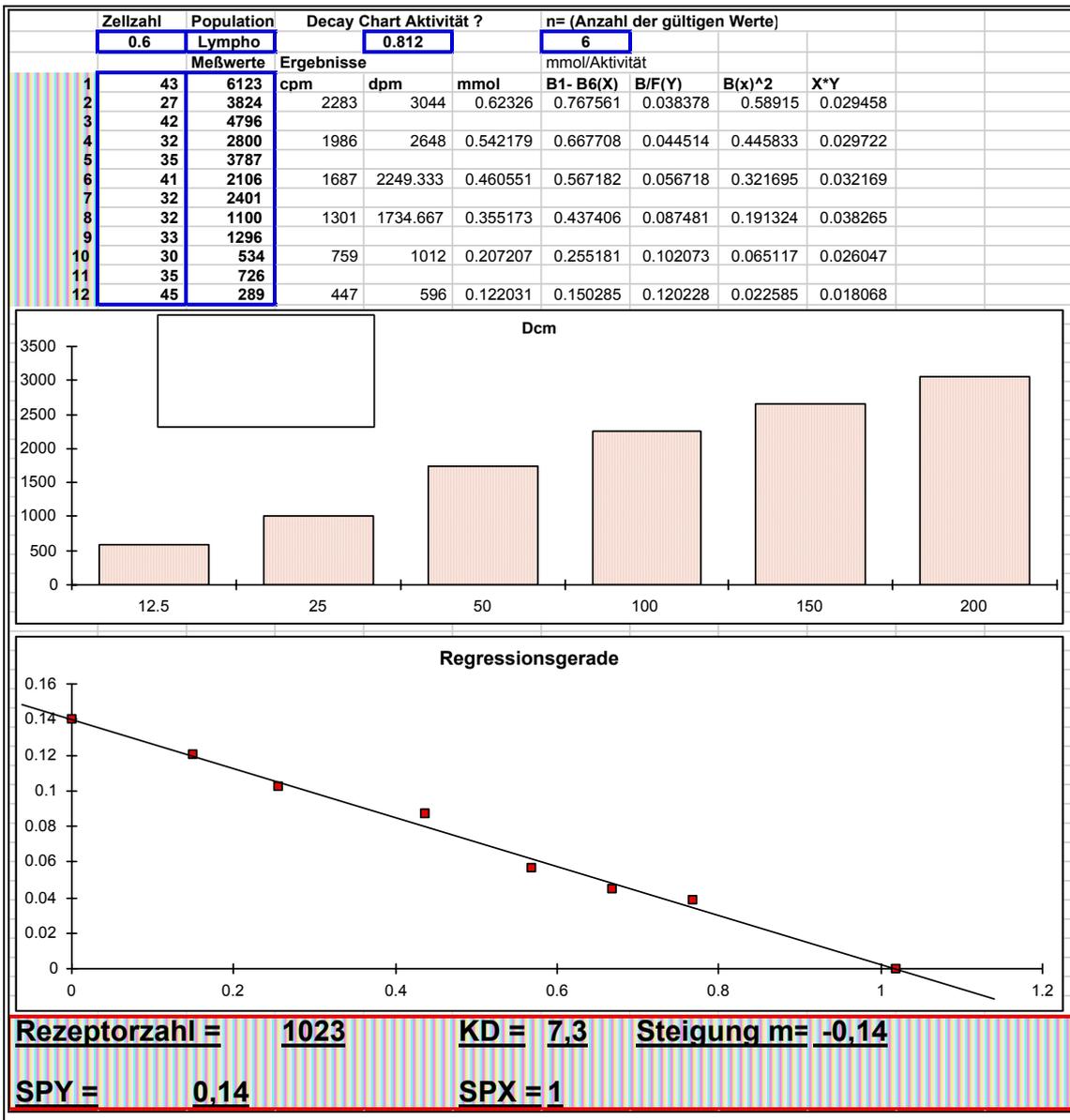


Abb. 17: Beispiel eines Scatchard-Plots zur Berechnung der β -Rezeptorenzahl. Berechnung der β -Rezeptorenzahl im 6. Borrelieversuch. Am Schnittpunkt mit der X-Achse läßt sich die β -Rezeptorenzahl (1023) ablesen, der negative Kehrwert der Steigung gibt uns die Dissoziationskonstante ($KD = 7,3$).

5.5. Ergebnisse der FACS-Analyse

Nach Trennung der Monozyten wurde die Reinheit der Zellfraktion mittels FACS überprüft. Dabei ergab sich eine Reinheit von $81,93 \pm 6,26\%$ (2.Quadrant). Die Negativanreicherung beim MACSen, bei der nur markierte Zellen an das Metallgitter binden, bringt es mit sich, daß mit der Negativfraktion nicht markierte Partikel wie Zellfragmente von durch die Separierung zerstörten Zellen oder auch durch die Isopaque-Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation nicht separierte Erythrozyten herausgewaschen werden. Dies führt zu der einer Verunreinigung der Monozytenfraktion. Bei der FACS-Analyse findet sich diese Verunreinigung in dem 3. Quadranten ($16,5 \pm 5,8\%$). Berücksichtigt man dies in der Berechnung, liegt der Anteil der Monozyten an den immunkompetenten Zellen nach Separierung mittels MACS bei $98 \pm 0,57\%$.

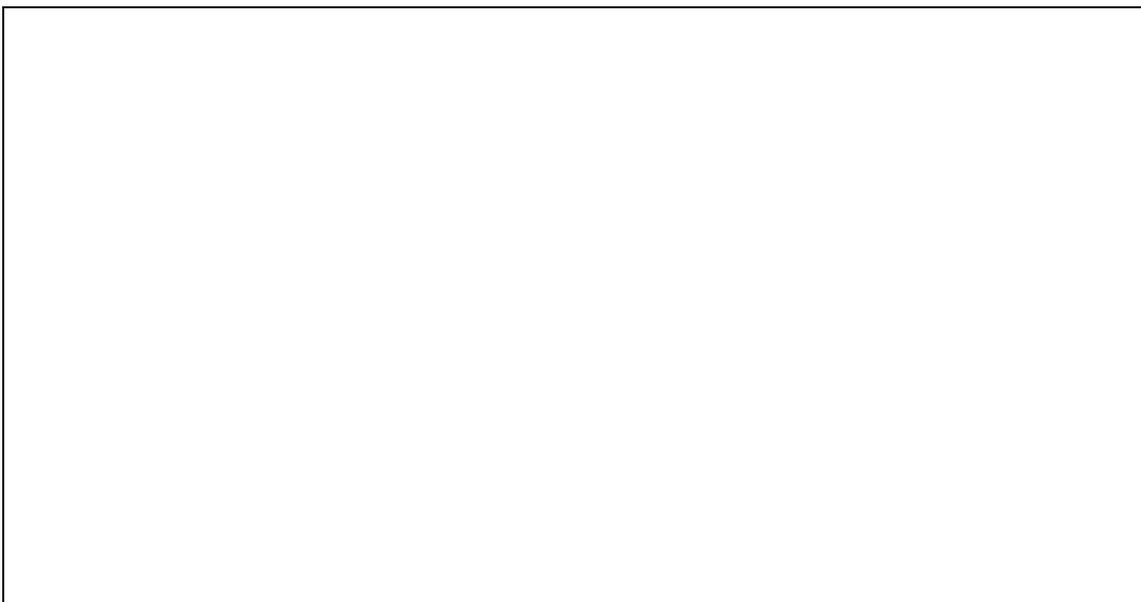


Abb.18 : Beispiel einer FACS-Analyse: Links die Analyse der Zellfraktionen vor, rechts nach Monozytenseparierung mittels MACS. Im 2. Quadranten läßt sich der Anteil der Monozyten ablesen. Während er vor Isolierung in diesem Fall bei 19,98% liegt, beträgt der Anteil nach Isolierung 84,5%. Berücksichtigt man den Anteil der Verunreinigung nach Isolierung (3. Quadrant, es finden sich hier keine immunkompetenten Zellen), liegt der Anteil an Monozyten an den immunkompetenten Zellen nach Isolierung in diesem Fall bei 98,5%.

6. Diskussion

6.1. Methodenkritik

Es gibt eine große Zahl an Einflüssen, die wie die verwendeten Stimulantien Monozyten aktivieren und die Produktion der gemessenen Interleukine anregen. Zum Teil sind das physiologische Einflußgrößen, wie vorausgegangene Streßreaktionen, die nur sehr schwer zu kontrollieren sind. Da die Blutproben von normalen Blutspendern stammten, ist gewährleistet, daß es nicht Blut von Menschen mit schwerwiegenderen Krankheiten ist, die zu einer deutlichen Beteiligung des Immunsystems führen.

Das Blut wurde nach der Blutgewinnung möglichst bald verarbeitet. Die weiteren Verarbeitungsschritte wurden, soweit es möglich war, bei 4°C durchgeführt. Es sollte so der Metabolismus der Zellen gering gehalten werden, um eine gegenseitige Beeinflussung während der Verarbeitungszeit zu minimieren.

Eine Kontamination mit Erregern kann eine Aktivierung der untersuchten Zellen und damit auch eine Beeinflussung der Produktion der gemessenen Interleukine zur Folge haben. Um dies zu verhindern, wurde unter sterilen Kautelen unter einer Sterilbank gearbeitet und dem Kulturmedium wurden Antibiotika zugesetzt.

Zur Zellgewinnung aus den „buffy-coats“ ist mit der Isopaque-Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation ein standardisiertes Verfahren angewandt worden, das eine hohe Zellgewinnung gewährleistet. Die Monozyten wurden mit der von Miltenyi entwickelten FACS-Methode separiert (Miltenyi, 1990). Da eine mögliche Aktivierung der Monozyten durch die Antikörper vermieden werden sollte, wurden sie bei der vorliegenden Arbeit nicht mit der Positivanreicherung gewonnen, bei der die gewünschten Zellen nach Markierung mit Antikörpern an ein magnetisiertes Metallgitter binden, sondern mit der neuen Methode der Negativanreicherung, bei der alle nicht gewünschten Zellen markiert und die zu separierenden Zellen als negative Fraktion aus der Säule gewaschen und gesammelt werden. Andere Methoden der Zellseparierung wie die Rosetting-Technik, das Panning, und das FACS sind nicht geeignet, um genügende Mengen an Monozyten zu gewinnen. Dies wäre mit der Plastikadhäsion zwar möglich, hier ist aber eine unspezifische Stimulation der

Monozyten beschrieben worden, die vermieden werden sollte (Ackermann, 1978; Kelley, 1987).

In der vorliegenden Arbeit sollte der direkte Einfluß von Katecholaminen auf Monozyten untersucht werden. In einer gemischten Zellkultur können Katecholamine auch indirekt über eine veränderte Interleukinproduktion anderer Zellen auf Monozyten wirken. Deshalb wurde Wert darauf gelegt, daß die Reinheit nach Separation möglichst hoch war. Kontrolliert wurde dies mit dem FACS. Es zeigte sich hier, bedingt durch die Methode der Negativanreicherung, eine hohe Verunreinigung (Zellfragmente, Erythrozyten), der Anteil an anderen immunkompetenten Zellen lag aber bei nur 1,8+/-0,57 %, der Anteil der Monozyten an den gesamten immunkompetenten Zellen damit bei 98,17+/-0,57 %.

Sowohl β -Rezeptorenbestimmung als auch Zytokinbestimmung nach Inkulturnahme und Stimulation der Zellen ist von einer sehr genauen Zellzählung abhängig. Deshalb wurden die Zellkonzentrationen der Zellsuspensionen jeweils mehrfach kontrolliert. Innerhalb eines einzelnen Versuches konnte eine große Übereinstimmung in der Zellkonzentrationen der verschiedenen Ansätze dadurch erreicht werden, daß in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte Zellen aus einer einzigen gut durchmischten Zellsuspension gegeben wurden. Die Vergleichbarkeit zwischen den Versuchen, die sich in den Zellkonzentrationen und damit auch den Absolutwerten der Interleukine eher unterschieden, wird verbessert, indem nicht die Absolutwerte der Interleukine, sondern die Prozentwerte der Interleukinkonzentrationen miteinander verglichen wurden. Damit fallen Abweichungen der Zellkonzentrationen zwischen den Versuchen weniger ins Gewicht.

Die Messung der β -Rezeptorendichte stellte sich als insgesamt recht störanfällig heraus. Wie oben beschrieben, mußte auf eine sehr genaue Zellzählung geachtet werden. Eine große Rolle spielt der radioaktiv markierte Ligand für den β -Rezeptor. Im Vergleich mit in der Vergangenheit verwendeten Liganden, wie z.B. (-)-3H-dihydroalprenolol oder ¹²⁵Iodohydroxybenzylpindolol, hat sich ¹²⁵Iodocyanopindolol (ICYP) als besonders vorteilhaft erwiesen (Brodde, 1981). Mit der Halbwertszeit von 60 Tagen von ¹²⁵Iod ist die Verwendung der Substanz allerdings auf wenige Wochen begrenzt. Deshalb wurde ICYP zeitlich sehr begrenzt verwendet, meist nur 3-4 Wochen.

Um einen Abbau der Interleukine zu verhindern, wurden die Überstände nach Abpipettieren jeweils sofort eingefroren. Aus Zeitgründen war es nicht möglich, die Interleukine sofort zu bestimmen. Sofort nach dem Wiederauftauen wurden die Interleukinkonzentrationen mit Enzym-Immunoassays bestimmt. Diese gut standardisierte und vielfach verwendete Methode ist spezifischer als der indirekte Nachweis der Interleukine über Bioassays, sehr viel einfacher und schneller durchführbar als der sehr genaue Nachweis der mRNA der Interleukine mittels PCR, und im Gegensatz zum RIA kommt sie ohne Verwendung von Radioaktivität aus.

6.2. Stimulation mit LPS, IFN- γ und Borrelien

Nach Stimulation mit LPS kommt es zu einem leichten Konzentrationsanstieg von IL-1 und IL-6 nach 4 Stunden. Deutlich ist der Konzentrationsanstieg erst nach 8 Stunden. De Bont et al. beobachten eine intrazelluläre Produktion von IL-1 nach 2 Stunden, extrazellulär kann IL-1 kurze Zeit danach gemessen werden. Einen Peak in der Produktion kann man nach 4 Stunden beobachten (de Bont, 1996).

Die Konzentration von IL-12 steigt nach Stimulation mit LPS zwar deutlich, aber erst relativ spät, nach 8 Stunden unterscheiden sich Leerwert und Stimulationswert nicht. LPS ist in der Lage sowohl IL-1 (de Bont, 1996), als auch IL-6 (Hirohashi, 1996) und IL-12 (Hayes, 1995) zu stimulieren.

IFN- γ ist bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit nicht in der Lage, zu einem deutlichem Anstieg der Konzentration von IL-1 zu führen. Die Konzentration von IL-6 vermindert sich leicht und an der Konzentration von IL-12 ändert sich überhaupt nichts.

Im allgemeinen wird IFN- γ hinsichtlich seiner stimulierenden Potenz eher eine Funktion als priming-Faktor zugesprochen, das heißt, man nimmt an, daß IFN- γ allein nicht zu einem Konzentrationsanstieg der Interleukine führt. Dieser priming-Effekt wird für IL-1 (Gerrard, 1987; Arend, 1988; Danis, 1990), IL6 (Biondillo, 1994) und IL-12 (Hayes, 1995) beschrieben.

In allen Borrelienversuchen kommt es zu einer Stimulation von IL-1, IL-6 und IL-12. Dieses wird durch zahlreiche Versuche von anderen Arbeitsgruppen ebenfalls beobachtet. Radolf et al. beschreiben daß Oberflächenmoleküle von Borrelien, wie auch von *Treponema pallidum* in der Lage sind die Produktion von IL-1 β , IL-6, IL-12 bei Monozyten und Makrophagen zu stimulieren (Radolf, 1995). Andersson et al. beobachteten nach Stimulation von Monozyten mit Borrelien eine Produktion von IL-6 und TNF- α mit einem Peak nach 2.5 Stunden (Andersson, 1990). Die Konzentration an IL-6 im Serum ist bei Menschen mit der Borreliose deutlich erhöht und korreliert mit der Aktivität der Krankheit (Weller 1991). Borrelien stimulieren vor allem die Produktion von IL-1 β , mehr als die von IL-1 α und IL-1ra. (Miller, 1992).

Für die Stimulation von IL-1 β , IL-6 durch Borrelien macht man vor allem die Oberflächen-Lipoproteine (outer surface proteins) OspA und OspB verantwortlich. Dies geschieht CD14 abhängig, aber unterschiedlich zur ebenfalls CD14 abhängigen Aktivierung mit LPS (Sellati, 1998; Giambartolomei; 1999). Wie es auch bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit der Fall ist, haben sich 10 Borrelien pro Makrophage als ausreichend für die Stimulation von Interleukinen, vor allem IL-1 herausgestellt (Beck, 1986).

Vergleicht man in unseren Versuchen die Fähigkeit von Borrelien zu Stimulation von IL-1, IL-6 und IL-12 mit der von LPS und IFN- γ , so fällt auf, daß Borrelien dazu wesentlich besser in der Lage sind. Insbesondere die Konzentration von IL-12 steigt nach Stimulation mit Borrelien weitaus schneller an, IFN- γ ist zu einer Stimulation von IL-12 nicht in der Lage. Die Konzentration von IL-6 nimmt nach Stimulation mit Borrelien deutlicher zu als die nach Zugabe von LPS. IFN- γ führt sogar zu einem geringen Konzentrationsabfall von IL-6. Die Konzentration von IL-1 steigt nach Stimulation mit Borrelien früher als die nach Stimulation mit LPS. Die Konzentrationen nach 24 Stunden sind hier miteinander vergleichbar. IFN- γ führt im Vergleich zu den anderen beiden Stimulantien nur zu einem minimalen Konzentrationsanstieg von IL-1. Ma et al. und Haupl et al. beschreiben ebenfalls eine weitaus potentere stimulierende Aktivität von Borrelien im Vergleich zu der von LPS (Ma, 1993; Haupl, 1997).

Die Kinetik, mit der die drei verschiedenen Interleukine in ihrer Produktion angeregt

werden, unterscheidet sich deutlich voneinander. Es lassen sich bei IL-1 und IL-6 schon nach 4 Stunden Konzentrationsanstiege messen, wogegen die Konzentration von IL-12 erst nach 24 Stunden stärker ansteigt, nach 8 Stunden ist allein nach Behandlung mit Borrelien, die insgesamt ja zu einem viel stärkeren Konzentrationsanstieg von IL-12 führte als die Behandlung mit LPS oder IFN- γ , ein leichter Konzentrationsanstieg zu messen. Die beobachteten Unterschiede in den Kinetiken der Interleukinproduktionen werden von den Daten anderer Arbeitsgruppen untermauert (de Bont, 1996; Hayes, 1995; Andersson, 1990).

6.3. Einfluß von Katecholaminen auf Stimulationseffekte

6.3.1. Einfluß auf die Produktion von IL-1 β

Die vorliegende Arbeit zeigt einen tendenziell hemmenden Einfluß von Noradrenalin in einer Konzentration von 10^{-5} M auf die Produktion von IL-1 nach Stimulation mit LPS. Weder β - noch α -Blocker antagonisieren dies. Bei den Versuchen mit Borrelien als Stimulans läßt sich kein Einfluß von Katecholaminen feststellen. IFN- γ stimuliert nur wenig die Produktion von IL-1, es zeigt sich aber eine signifikante Hemmung der Produktion von IL-1 mit Noradrenalin in einer Konzentration von 10^{-9} M.

Untersuchungen zum Einfluß von Katecholaminen auf die Produktion von IL-1 zeigen sehr unterschiedliche Ergebnisse. Katecholamine können einen hemmenden, stimulierenden oder auch gar keinen Einfluß haben. Abhängig ist dies vor allem davon, ob der Einfluß in vivo oder in vitro untersucht wird, und ob es die basale oder die durch ein Stimulans gesteigerte Produktion von IL-1 ist, die durch Katecholamine verändert wird.

Versuche, die wie bei der vorliegenden Arbeit den Einfluß von Katecholaminen auf die Produktion von IL-1 nach Stimulation untersuchen, bestätigen im Wesentlichen die hemmenden Eigenschaften der Katecholamine. Koff et al. zeigten 1986, daß Adrenalin und Noradrenalin in der Lage sind, die durch LPS und IFN- γ hervorgerufene Produktion von IL-1 bei peritonealen Makrophagen von Mäusen zu hemmen. Diese Hemmung scheint mit der Fähigkeit von Katecholaminen zusammen zu hängen, die

Konzentration an intrazellulärem cAMP zu erhöhen, da bei exogen zugefügtes cAMP ähnliche Effekte beobachtet werden (Koff, 1986).

Widersprüchlich sind Untersuchungen mit Substanzen, die die intrazelluläre cAMP Konzentration erhöhen, wie Prostaglandin E2, Dibutyryl-cAMP und 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin. Brandwein et al. und Hurme et al. konnten zeigen, daß sich nach Stimulation mit LPS die Produktion von IL-1 nach Behandlung mit solchen Substanzen verringert (Hurme, 1990; Brandwein, 1986), andere Untersuchungen deuten eher darauf hin, daß die durch LPS hervorgerufene Produktion von IL-1 von der intrazellulären cAMP Konzentration nicht beeinflusst wird (Baille, 1990).

Untersuchungen die in vitro ohne Verwendung eines Stimulans wie LPS an isolierten Monozyten durchgeführt wurden, geben zum Teil Hinweise auf einen stimulierenden Einfluß von Katecholaminen auf die Produktion des basal sezernierten IL-1. Katecholamine alleine sind in physiologischen Konzentrationen in der Lage die Sekretion von IL-1 durch Monozyten zu verstärken (Cannon, 1986). Durch Katecholamine kommt es zu einer Konzentrationserhöhung von intrazellulärem cAMP, so daß Ergebnisse von Serkkola eventuell ähnlich zu interpretieren sind: Eine länger andauernde Erhöhung der intrazellulären Konzentration von cAMP, die er entweder mit Dibutyryl-cAMP, oder, nachdem die Bildung von intrazellulärem cAMP mit Prostaglandin E2 angeregt wurde, durch eine Hemmung des Abbaus von cAMP mit Isobutyl-Methyl-Xanthin erreichte, führte zu einer verstärkten Produktion von IL-1, vergleichbar mit dem Effekt von LPS auf die Produktion von IL-1 (Serkkola, 1992).

Der Einfluß von Katecholaminen auf die Produktion von IL-1 unterscheidet sich bei Versuchen in vivo von dem Einfluß in vitro. In vivo können Katecholamine natürlich nicht nur Monozyten beeinflussen, sondern auch andere Zellen, die IL-1 produzieren. Über eine veränderte Zytokinausschüttung anderer Immunozyten, die ihrerseits Funktionen von Monozyten modulieren, können Katecholamine einen indirekten Einfluß auf die Monozyten haben, der sich von einem direkten unterscheiden kann. Untersuchungen in vivo von Broug-Holub zeigten daß alveolare Makrophagen von Ratten, nachdem diese mit elektrischen Schocks gestreßt und damit einem Katecholamineinfluß ausgesetzt wurden, vermehrt IL-1 β produzieren und sezernieren. Dieser Effekt ließ sich mit β -Rezeptorantagonisten, nicht aber mit α -

Rezeptorantagonisten hemmen. In vitro konnte er allerdings kein Einfluß von Katecholaminen auf die durch LPS induzierten Sekretion von Zytokinen beobachten. Das deutet daraufhin, daß der in vivo-Effekt auf die Produktion von Zytokinen durch Monozyten über andere Zellen und deren Mediatoren vermittelt beziehungsweise beeinflußt wird (Broug-Holub, 1998).

Im Gegensatz zu den Arbeiten von Broug-Holub et al. werden aber bei Versuchen in vivo auch hemmende Einflüsse von Katecholaminen beobachtet. Bei unterernährten Ratten findet man erhöhte Konzentrationen an Noradrenalin im Blut und im Thymus. Dies geht einher mit einer verminderten Produktion an IL-1 durch Makrophagen (Schlesinger, 1994). Werden Ratten mit 6-Hydroxydopamin sympathektomiert, so findet man in der Milz stark reduzierte Konzentrationen an Noradrenalin und Dopamin. Bei diesen Ratten führt LPS zu einer deutlich verstärkten Stimulation der Expression von IL-1- und IL-6-mRNA. Dies deutet ebenfalls auf einen inhibitorische Einfluß von Katecholaminen auf die Zytokin-Expression hin (De Luigi, 1998).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nach Stimulation mit IFN- γ bestätigen im wesentlichen einen inhibitorischen Einfluß von Katecholaminen auf die Produktion von IL-1. Allerdings sind sie komplexer und damit schwerer zu interpretieren. IFN- γ führt selbst nicht zu einer verstärkten Produktion von IL-1. In hohen Konzentrationen verändern Katecholamine die Produktion von IL-1 nicht. Noradrenalin in niedriger Konzentration ist in der Lage die Produktion von IL-1 zu hemmen, bei Adrenalin läßt sich ein entsprechender Effekt nur tendenziell beobachten. Fraglich ist, ob dieser Effekt über Adrenozeptoren vermittelt wird, da sowohl α - als auch β -Rezeptorantagonisten den Einfluß nicht vermindern, die Konzentration von IL-1 wird durch die Antagonisten sogar noch weiter gesenkt. Auf einen Adrenozeptor unabhängigen Einfluß von Katecholaminen deuten auch Arbeiten von Cook-Mills et al.: Concanavalin A- oder LPS-induzierte Aktivierung von Lymphozyten kann durch β -Agonisten gehemmt werden, diese Inhibierung läßt sich aber nicht mit β -Rezeptorantagonisten blocken. Cook-Mills et al. postulieren, daß die β -Agonisten über einen nicht klassischen Weg Einfluß auf die Lymphozyten haben (Cook-Mills, 1995).

Eine andere mögliche Erklärung für den synergistisch hemmenden Einfluß von

Katecholaminen und Adrenozeptorantagonisten, wäre eine intrinsische Aktivität von Propranolol und Urapidil, der normalerweise aber weder an β -Rezeptoren noch an α -Rezeptoren beobachtet wird (Palm, 1994). Der hemmende Einfluß von Katecholaminen in niedriger Konzentration bei fehlendem Einfluß von Katecholaminen in hohen Konzentrationen zeigt sich in der vorliegenden Arbeit auch für die Werte von IL-6 nach Stimulation mit IFN- γ für 24 Stunden.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß der nach Stimulation mit LPS tendenziell und nach Stimulation mit IFN- γ signifikant hemmende Einfluß von Katecholaminen, der in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden konnte, auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wird (Koff, 1986). Direkte Erhöhung der Konzentration an intrazellulärem cAMP zeigt teils ebenfalls diesen Effekt, teils kann dadurch die Konzentration an IL-1 nicht beeinflußt werden (Hurme, 1990; Brandwein, 1986; Baille, 1990). Bei Versuchen in vitro ohne Behandlung mit einem Stimulans haben Katecholamine eine die Konzentration von IL-1 erhöhende Wirkung (Cannon, 1986; Serkkola, 1992). In vivo Versuche weisen mit hemmenden aber auch stimulierenden Eigenschaften von Katecholaminen widersprüchliche Ergebnisse auf (Broug-Holub, 1998; Schlesinger, 1994; De Luigi, 1998). Die Ergebnisse nach Stimulation mit IFN- γ sind sehr komplex. Es zeigt sich ein hemmender Einfluß von Katecholaminen in niedrigen Konzentrationen, der aber nicht über Adrenozeptoren vermittelt zu sein scheint. Vielmehr führt die Kombination mit den Antagonisten zu einer verstärkten Hemmung.

6.3.2. Einfluß auf die Produktion von IL-6

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bieten keinen Anhalt auf einen Einfluß von Katecholaminen auf die Produktion von IL-6 nach Stimulation mit LPS und Borrelien. Dagegen ergeben sich aus den IFN- γ -Versuchen einige Hinweise auf solch einen Einfluß. Unter den Inkubationsbedingungen kommt es zu einem deutlichem Anstieg der Basalwerte von IL-6, der durch IFN- γ nicht stimuliert, sondern gehemmt wird. Noradrenalin ist in einer Konzentration von 10^{-5} M in der Lage, diese Hemmung nach 8 Stunden zu vermindern, das heißt es kommt hier zu einer verstärkten Produktion von IL-6. Dieser Effekt von Noradrenalin läßt sich mit Propranolol antagonisieren. Urapidil ist dazu nicht in der Lage. Vielmehr führt die Kombination von Adrenalin in einer

Konzentration von 10^{-5} mit Urapidil nach 8 Stunden ebenfalls zu einer verstärkten Produktion von IL-6, Adrenalin alleine verstärkt sie nur minimal, aber nicht signifikant. Nach 24 Stunden ist die Situation etwas anders. Während Adrenalin und Noradrenalin in hohen Konzentrationen keine Wirkung haben, verstärken sie in Konzentrationen von 10^{-9} M die Hemmung durch IFN- γ . Die Kombination von Propranolol mit Noradrenalin in hoher Konzentration vermag dies ebenfalls.

Es zeigt sich also, daß Katecholamine die hemmende Wirkung von IFN- γ nach 8 Stunden vermindern, nach 24 Stunden verstärken. Nach 8 Stunden sind Katecholamine in Konzentrationen von 10^{-5} M, nach 24 Stunden von 10^{-9} M wirksam. β -Blocker antagonisieren die Wirkung von Noradrenalin nach 8 Stunden, nach 24 Stunden wirken sie synergistisch mit Katecholaminen, wie es auch für den α -Rezeptorenblocker Urapidil nach 8 Stunden gemeinsam mit Adrenalin der Fall ist.

Die Wirkung von Katecholaminen ist in der vorliegenden Arbeit vor allem abhängig von dem verwendeten Stimulans, die Versuche mit LPS und Borrelien zeigen keinen Einfluß der Katecholamine, und abhängig von der Zeitdauer der Behandlung der Zellen mit dem Stimulans, wobei IFN- γ hier nicht als Stimulans, sondern hemmend wirkt.

Es konnten in der Literatur keine Arbeiten gefunden werden, die wie bei der vorliegenden Arbeit in vitro isoliert den Einfluß von Katecholaminen auf die Produktion von IL-6 bei Monozyten untersuchen. Liao et al untersuchten den Einfluß auf Kupffer-Zellen. Noradrenalin stimulierte β -Rezeptorvermittelt die Produktion von IL-6, sofern die Zellen mit LPS stimuliert worden waren. Auf nicht stimulierte Zellen zeigten Katecholamine kein Einfluß. Bailly et al. zeigten, daß Substanzen, die die Konzentrationen an intrazellulärem cAMP erhöhen, wie Prostaglandin E2, Dibutyryl-cAMP und 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin, die durch LPS hervorgerufene Produktion von IL-6 verstärken (Bailly, 1990). Katecholamine führen nach Bindung an β -Rezeptoren ebenfalls zu einer Konzentrationserhöhung von intrazellulärem cAMP. So ist der Einfluß von cAMP, den Billy et al. beobachten, in begrenztem Maße mit einem Einfluß von Katecholaminen vergleichbar. Die Ergebnisse ständen somit im Widerspruch zum nicht vorhandenem Einfluß von Katecholaminen nach Stimulation mit LPS in der vorliegenden Arbeit. Nach Behandlung mit IFN- γ für 8 Stunden zeigt sich allerdings

auch ein stimulierender Effekt von Katecholaminen.

Zahlreiche Versuche gibt es, die den Einfluß von Katecholaminen auf die Produktion von IL-6 bei anderen Zellen prüfen. Bei in Kultur genommenen Epithelzellen aus dem Thymus von Ratten regen Katecholamine die durch LPS hervorgerufene Produktion von IL-6 an. Dieser Effekt ist über eine Bindung von Katecholaminen an β -Rezeptoren hervorgerufen, läßt sich mit β -Rezeptorantagonisten hemmen. Substanzen, die wie auch die Katecholamine zu einem Konzentrationsanstieg an intrazellulärem cAMP führen, rufen ebenfalls eine verstärkte Freisetzung an IL-6 hervor (von Patay, 1998). Noradrenalin vermag die durch LPS induzierte Produktion von IL-6 in Leberzellen zu verstärken (Liao, 1995). Adipozyten exprimieren nach Stimulation mit Noradrenalin, dem β -Agonisten Isoproterenol, dem β_3 -Agonisten CGP-12117, Forscolin und Dibutyryl-cAMP, nicht aber mit α -Agonisten vermehrt IL-6 (Burysek, 1997). Mit LPS und IL-1 β stimulierte Produktion und Sekretion von IL-6 bei in Kultur genommenen glatten Muskelzellen von Ratten wird ebenfalls durch Katecholamine verstärkt, was mit Propranolol verhindert werden kann. Substanzen, die die intrazelluläre Konzentration von cAMP erhöhen, wie Forskolin, verstärken hier ebenfalls die durch LPS hervorgerufene IL-6 Produktion (van Assche, 1999). Astrozyten werden in ihrer LPS-induzierten Produktion von IL-6 β_2 -Rezeptor-vermittelt verstärkt (Nakamura, 1998; Maimone, 1993).

In vivo Versuche und Beobachtungen deuten wie die in vitro-Versuche auf einen vor allem die Konzentration von IL-6 erhöhenden Einfluß von Katecholaminen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind allerdings nur mit großer Vorsicht mit denen der vorliegenden Arbeit zu vergleichen, da einerseits Monozyten nicht die einzigen Produzenten von IL-6 sind, die Konzentration von IL-6 in vivo also durch den Einfluß von Katecholaminen auf viele andere Zellen verändert wird, und andererseits Katecholamine auch einen indirekten Einfluß auf die Monozyten ausüben, beispielsweise über eine veränderte Produktion von Interleukinen anderer Immunozyten, die ihrerseits die Produktion von IL-6 ändern. Trotzdem ist ein Blick auf die Wirkung von Katecholaminen in vivo interessant für die Beurteilung der Bedeutung eines beobachteten Einflusses in vivo. Bei physischem Streß zeigen Adrenalin und Noradrenalin im Plasma einen Konzentrationsanstieg mit einem Peak nach 15 min.

Parallel dazu steigt die Plasma-Konzentration von IL-6 mit ebenfalls einem Peak nach 15 min und einem weiteren nach 45 min. Das deutet darauf hin, daß in vivo die Konzentration von IL-6 durch Katecholamine gesteigert wird (Papanicolaou, 1996). Werden Menschen physischem Streß ausgesetzt, so ist der Anstieg an IL-6 besonders groß, wenn es bei der physischen Arbeit zu einer Zerstörung von Muskelzellen kommt. Unklar ist, ob dieser durch den Streß bedingte Anstieg der Konzentration an Katecholaminen oder der durch den Streß bedingte Zerfall an Muskelzellen für den erhöhten Level an IL-6 im Plasma die größere Rolle spielt (Rohde, 1997; Bruunsgaard, 1997). Durch Operationen verursachte Traumata, die mit systemischen Reaktionen wie Fieber, Leukozytose, Katabolismus und Aktivierung des Gerinnungs-Systems einhergehen, sind durch eine erhöhte Konzentration an IL-6 im Plasma charakterisiert. Parallel zu diesem Konzentrationsanstieg von IL-6, der bei der Aktivierung der Akuten-Phase-Reaktion maßgeblich beteiligt ist, beobachtet man ein Anstieg der Katecholamine im Plasma. Eine intrazelluläre Erhöhung der cAMP Konzentration bei Monozyten, wie sie durch Katecholamine hervorgerufen wird, führt zu einer verstärkten Synthese von IL-6 (Heesen, 1996). Bei Ratten ist Adrenalin in der Lage, die Konzentration an IL-6 zu erhöhen, was mit Propranolol gehemmt werden kann (van Gool, 1990).

Der selektive α_2 -Antagonist CH-38083 führt bei mit LPS stimulierten Mäusen zu einer verstärkten Produktion von IL-6, verglichen mit dem reinen LPS-Effekt. Da der selektive α_2 -Antagonist an noradrenergen Axonen zu einer verstärkten Freisetzung von Noradrenalin führt, kann der Einfluß, der zu der Konzentrationssteigerung von IL-6 führt, als ein indirekter Einfluß des α_2 -Rezeptorantagonisten über das vermehrt freigesetzte Noradrenalin erklärt werden. Konsequenterweise läßt sich demnach diese indirekte Wirkung des α_2 -Rezeptorantagonisten auch mit einem β -Rezeptorantagonisten hemmen (Hasko, 1995).

Der positive Einfluß der Kombination der Katecholamine nach 8 Stunden mit Urapidil auf die Produktion von IL-6, und der negative Einfluß der Kombination mit Propranolol nach 24 Stunden, bei fehlendem Nachweis eines Einflusses von Adrenalin 10^{-5} M nach 8 Stunden und Adrenalin 10^{-5} M und Noradrenalin 10^{-5} M nach 24 Stunden könnte man mit einer intrinsischen oder auch unspezifischen Aktivität der Antagonisten erklären. Liao et al., die den Wirkung von Katecholaminen auf Kuppfer-Zellen untersuchen,

beobachten allerdings keinen Einfluß von Propranolol allein (Liao, 1995).

Eine andere Erklärung wäre die, daß nach Antagonisieren der Wirkung an dem einen Rezeptorsubtyp sich die Wirkung über den anderen Rezeptorsubtyp verstärkt. Wenn Katecholamine über Bindung an den β -Rezeptor die Konzentration von IL-6 erhöhen, über Bindung an den α -Rezeptor aber vermindern, könnte man eine fehlende Wirkung des Katecholamins alleine über sich aufhebende Wirkungen an den Rezeptorsubtypen erklären. Das Blockieren des Einflusses von Adrenalin 10^{-5} M nach 8 Stunden am α -Rezeptor würde dann die Wirkung am β -Rezeptor verstärken, was zu einer Konzentrationssteigerung von IL-6 führt. Nach 24 Stunden zeigt sich kein Einfluß von Adrenalin und eine nicht signifikante Hemmung durch Noradrenalin auf die Produktion von IL-6. Die Kombination beider Katecholamine mit Propranolol führt zu einer signifikanten Hemmung. Wieder könnte man diesen Effekt nach Kombination mit Rezeptorantagonisten damit erklären, daß sich die Wirkung des Katecholamins am entsprechenden anderen Rezeptorsubtyp verstärkt. Adrenalin und Noradrenalin am β -Rezeptor die Konzentration von IL-6 steigern, am alpha-Rezeptor vermindern. Bindung von Katecholaminen an β -Rezeptoren führt zu einem Anstieg des intrazellulärem cAMP. Die entgegengesetzte Wirkung der Katecholamine bezüglich der Produktion von IL-6 wäre demnach gut mit einer Konzentrationsenkung von cAMP über Bindung an den Alpha-2-Rezeptor erklärbar. Urapidil ist zwar vornehmlich ein Antagonist an α_1 -Rezeptoren, aber es blockiert in geringerem Maße auch die Wirkung der Katecholamine an α_2 -Rezeptoren. Damit würden die oben aufgeführten Ergebnisse von Hasko et al. anders erklärbar werden. Nach Stimulation mit LPS führte hier die α_2 -Blockade durch CH-38083 zu einer verstärkten Produktion von IL-6. Paralell zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit käme es zu der Konzentrationssteigerung von IL-6 über die verstärkte Wirkung der Katecholamine am β -Rezeptor durch die Blockade des α -Rezeptors (Hasko, 1995).

Ähnliche entgegengesetzte Regulation eines Zytokins über α_2 -Rezeptor und β -Rezeptor ist für TNF- α . Während hier Katecholamine die Produktion von TNF- α bei Makrophagen über Bindung an β -Rezeptoren senken, wird sie α_2 -Rezeptorvermittelt stimuliert (Spengler, 1990; Liao, 1995).

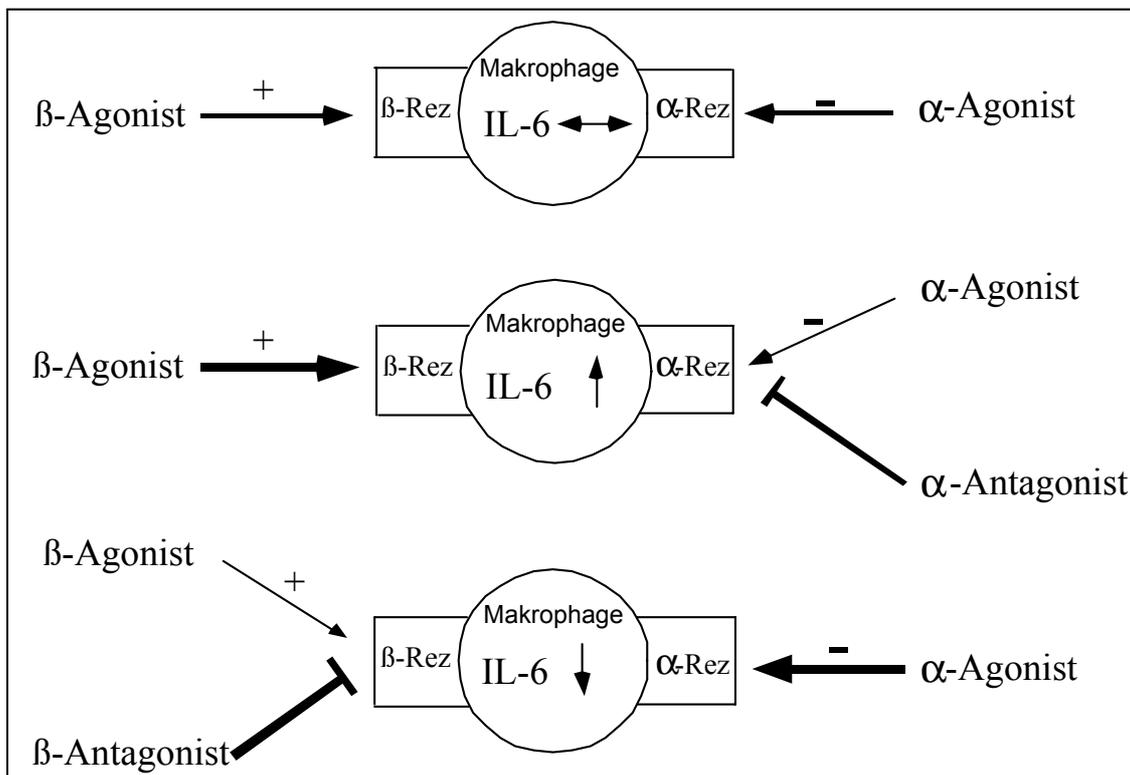


Abb. 19: Schematische Darstellung der Wirkung von Katecholaminen auf die Produktion von IL-6. α -Agonisten hemmen, β -Agonisten steigern diese (oben). Der Einfluß der β -Agonisten wird durch Hemmung des Einflusses der α -Agonisten vermehrt, dadurch kommt es zu einer Steigerung der Produktion von IL-6 (mitte). Entsprechend wird die Produktion nach Hemmung des Einflusses der β -Agonisten gesenkt.

Mit Adrenalin und Noradrenalin in geringen Konzentrationen (10^{-9} M) kommt es bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit zu einer Hemmung der Produktion von IL-6 nach Stimulation für 24 Stunden, die für die hohen Konzentrationen nicht beobachtet wird. Eine mögliche Erklärung wäre ein dosisabhängig unterschiedlich starker Einfluß bezüglich der Produktion von IL-6 über α_2 - und β -Rezeptoren, ein stärkerer Einfluß von Katecholaminen in niedrigen Konzentrationen über α_2 -Rezeptoren und ein genauso starker über α - und β -Rezeptor bei Katecholaminen in hohen Konzentrationen.

Hinweise für einen solchen unterschiedlich starken Einfluß von Katecholaminen über die Adrenozeptor-Subtypen bei verschiedenen Katecholaminkonzentrationen ließ sich in der Literatur allerdings nicht finden.

Die Tatsache, daß Noradrenalin allein und Adrenalin in Kombination mit Urapidil nach 8 Stunden zu einer Konzentrationserhöhung von IL-6 führen, nach 24 Stunden die Produktion von IL-6 aber von beiden Katecholaminen in Kombination mit Propranolol gehemmt wird, könnte damit erklärt werden, daß sich unter Katecholamineinfluß die Adrenozeptordichte auf Monozyten verändert. Nach einem kurzen Anstieg der Anzahl an β -Rezeptoren wird sie unter Katecholamineinfluß vermindert (Tomeh, 1980). Die Anzahl an α -Rezeptoren kann zwar auch abnehmen, es gibt aber auch Zellen, bei denen Katecholamine keinen Einfluß haben, beispielsweise ändert sich α_2 -Rezeptordichte auf Thrombozyten unter Behandlung mit α -Agonisten nicht (Sato, 1990). Sollte auch bei Monozyten die Verminderung der Anzahl an α_2 -Rezeptoren nicht in dem Maße geschehen, wie es bei den β -Rezeptoren bekannt ist, so wäre ein mit der Zeit stärker werdender Einfluß von Katecholaminen über Bindung an α_2 -Rezeptoren erklärbar.

Eine andere Erklärung, für die Hemmung der Produktion von IL-6 nach 24 Stunden, wäre ein zunehmender inhibierender Einfluß über eine vermehrte Produktion an IL-10. IL-10 (Qiu, 1999) senkt die Produktion von IL-6. Die Konzentration von IL-10 wird durch Katecholamine gesteigert (van der Poll, 1997). IL-10 ist ein Interleukin, das im Rahmen einer Immunantwort erst relativ spät auftritt, weshalb es zu der zeitlich verzögert zunehmenden Hemmung der Produktion von IL-6 kommen kann.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß Katecholamine abhängig vom Zelltyp und der Einwirkdauer der Stimulantien die Produktion von IL-6 beeinflussen. Während die meisten Zellen sowohl in vivo als auch in vitro die basale als auch durch ein Stimulans hervorgerufene Produktion von IL-6 verstärken, was in der vorliegenden Arbeit nach Stimulation mit IFN- γ für 8 Stunden ebenfalls gezeigt werden konnte, hemmen Katecholamine nach 24 Stunden die Produktion von IL-6. Die Daten der vorliegenden Arbeit deuten außerdem auf einen antagonistischen Einfluß von Katecholaminen auf die IL-6 Produktion über α -Rezeptoren (hemmend) und β -Rezeptoren (stimulierend) hin.

6.3.3. Einfluß auf die Produktion von IL-12

Die Versuche der vorliegenden Arbeit zeigen, daß nach Stimulation mit LPS für 24 Stunden die Konzentration von IL-12 mit Adrenalin 10^{-5} M und Noradrenalin 10^{-5} M gesenkt werden kann. Nach Stimulation mit Borrelien für 8 Stunden vermindert Adrenalin 10^{-5} M, nach 24 Stunden Adrenalin 10^{-5} M und Noradrenalin 10^{-5} M die Konzentration von IL-12. Adrenalin und Noradrenalin sind dabei nicht unterschiedlich potent in ihrer hemmenden Eigenschaft. Propranolol hemmt den Noradrenalineinfluß nach Stimulation mit LPS, den Adrenalineinfluß nach Stimulation mit Borrelien für 8 Stunden und den Noradrenalineinfluß nach 24 Stunden. Urapidil hat keinen Einfluß. Bei den Versuchen mit IFN- γ ist kein hemmender Einfluß von Katecholaminen zu verzeichnen.

In der Literatur findet man zahlreiche Hinweise für einen hemmenden Einfluß von Katecholaminen auf die Produktion von IL-12, vor allem nach Stimulation mit LPS. Panina-Bordignon et al. stimulierten menschliche Monozyten für 24 Stunden mit LPS nach einem Priming mit IFN- γ für 16 Stunden. Salbutamol hemmte in einer Konzentration von 30 nM die durch LPS hervorgerufene Produktion von IL-12 zu 50%. Salbutamol hatte ähnliche Effekte, wenn die Monozyten nicht separiert wurden, sondern die Zellen im gesamten Blutpool stimuliert wurden. Der Einfluß des β_2 -Agonisten konnte mit dem β_2 -Antagonisten Oxprenolol komplett aufgehoben werden (Panina-Bordignon, 1997). Elenkov et al. untersuchten ebenfalls den Einfluß von Katecholaminen auf die Konzentration von IL-12 im gesamten Blut, sie wurde nach Stimulation mit LPS durch Adrenalin und Noradrenalin gesenkt. Dieser Katecholamineinfluß konnte mit Propranolol gehemmt werden (Elenkov, 1996). Da Aktivierung von β -Rezeptoren zu einer erhöhten Konzentration von cAMP führt, ist es nicht verwunderlich, daß die hemmende Wirkung von Salbutamol sehr gut mit der Konzentration an intrazellulärem cAMP korreliert, eine Beobachtung die schon van der Pouw Kraan et al nach Stimulation mit Prostaglandin E2 gemacht haben, das ebenfalls über eine Erhöhung der cAMP-Konzentration hemmend auf die Produktion von IL-12 wirkt. Andere Substanzen, die die cAMP-Konzentration erhöhen, wie Forskolin oder dbcAMP, sind auch in der Lage, die Stimulation durch LPS abzuschwächen. Messungen

der mRNA von IL-12p40 und IL-12p35 zeigten daß die Produktion beider mRNAs gehemmt wird (van der Pouw Kraan, 1995).

Untersuchungen in vivo zeigen einen hemmenden Einfluß von Katecholaminen nach Stimulation mit LPS. Der β -Rezeptoragonist Isoproterenol ist in der Lage die durch LPS hervorgerufene Produktion von IL-12 bei Mäusen zu supprimieren (Hasko, 1998). Propranolol alleine verstärkt die durch LPS stimulierte Produktion von IL-12, was darauf hinweist, daß die endogenen Katecholamine selbst einen hemmenden Einfluß haben.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß Katecholamine nach Stimulation mit LPS und Borrelien in der Lage sind, die Konzentration von IL-12 zu senken, was nach Stimulation mit LPS in anderen Arbeiten sowohl in vitro (van der Pouw Kraan, 1995; Elenkov, 1996; Panina-Bordignon, 1997) als auch in vivo (Hasko, 1998) ebenfalls beschrieben wird. Dieser Effekt ist β_2 -Rezeptoren-vermittelt.

6.3.4. Einfluß auf Th₁- und Th₂-Antworten

Die Beeinflussbarkeit der durch LPS und Borrelien stimulierten Produktion von IL-12 deutet darauf hin, daß Katecholamine in der Lage sind Th₁-Antworten zu hemmen, da IL-12 das wichtigste Zytokin für die Induktion der Differenzierung von Th₀-Zellen zu Th₁-Zellen ist. Es gibt eine Reihe an Untersuchungen, die diese Beobachtung unterstützen.

Eine Mitogen-induzierte Differenzierung von CD4⁺ Th-Zellen zeigt bei Behandlung mit Salbutamol eine deutliche Hemmung der Entwicklung der Zellen zu IFN- γ produzierenden Zellen, das heißt zu Th₁-Zellen. IL-4 produzierende Th₂-Zellen entwickelten sich dagegen gut. Auch in vivo konnte ein inhibitorischer Effekt von Salbutamol in therapeutischen Konzentrationen auf die Produktion von IL-12 und damit verbunden die Differenzierung von Th₁-Zellen beobachtet werden (Panina-Bordignon, 1997).

Einen ähnlichen Einfluß von Katecholaminen auf Lymphozyten beschreibt Elenkov, auch hier wird die durch LPS hervorgerufene Produktion von IL-12 durch

Katecholamine gehemmt, die Produktion von IL-10 dagegen gesteigert, die Th₁/Th₂-Balance wird wieder in die Richtung einer Th₂-Antwort gelenkt (Elenkov, 1996).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Katecholamine in der Lage sind die Produktion von IL-6 zu steigern. IL-6 ist ein Interleukin, das Th₂-Antworten verstärken kann (Rincon, 1997). Anguita et al. konnten zeigen, daß an Borreliose erkrankte IL-6-defiziente Mäuse abgeschwächte Th₂-Antworten entwickeln (Anguita, 1998). Auch über den Einfluß auf die Produktion von IL-6 würden Katecholamine also einen Shift von Th₁- zu Th₂-Antwort bewirken.

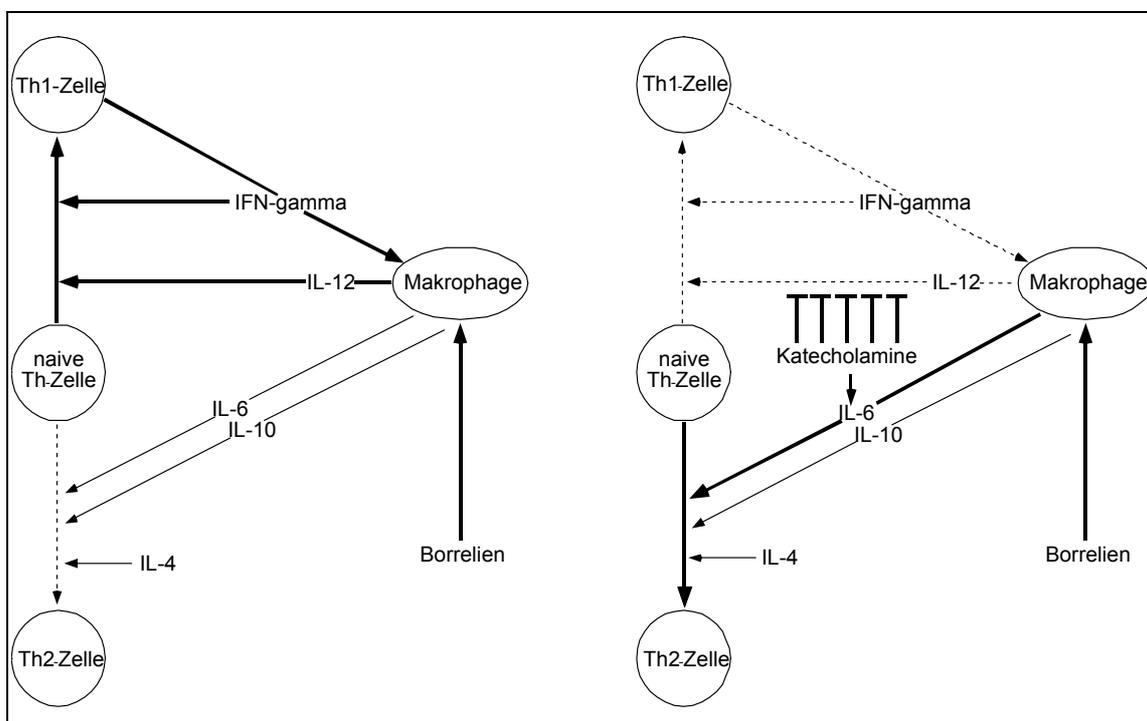


Abb. 20: Schematische Darstellung des Einflusses von Katecholaminen auf eine durch Borrelien induzierte Th₁-Antwort. Katecholamine hemmen die Produktion des für Th₁-Antworten besonders wichtigen Interleukins IL-12 und stimulieren die Produktion von IL-6, das Th₂-Antworten verstärken kann. Auf diesem Wege können Katecholamine zu einem Shift von Th₁ zu Th₂-Antworten führen.

Neben den Monozyten und Makrophagen, die die wichtigsten Produzenten von IL-12 sind, können natürlich auch die Th₁- und Th₂-Zellen direkt beeinflusst werden. Interessant in diesem Zusammenhang sind Untersuchungen, die die Reaktionen von Th₁- und Th₂-Zellenklonen von Mäusen auf β_2 -Rezeptoragonisten differenzieren. Es zeigt sich hier, daß der β_2 -Rezeptoragonist Terbutalin bei Th₁-Zellen nicht aber bei Th₂-

Zellen in der Lage ist die Konzentration an cAMP zu erhöhen. Die IFN- γ Produktion ruhender Th₁-Zellen wird durch Terbutalin gehemmt, die Produktion von IL-4 durch Th₂-Zellen kann dagegen mit dem β -Rezeptoragonisten nicht beeinflusst werden. Die Beobachtung der unterschiedlichen Reaktion auf β_2 -Rezeptoragonisten wird mit Radioligandenstudien unterstützt, nur auf Th₁-Zellen können β_2 -Rezeptoren nachgewiesen werden (Sanders, 1997).

Nach Stimulation mit anti-CD3 wird die Produktion von IL-2 durch Th₁-Zellen, nicht aber die Zytokin-Produktion der Th₂-Zellen durch β -Rezeptoragonisten gehemmt (Ramer-Quinn, 1997). Prostaglandin E₂, das immunsuppressiv über eine Erhöhung der cAMP Konzentration wirkt, zeigt ebenfalls diesen Th₁ selektiven Einfluß, es inhibiert die Produktion von IL-2 und IFN- γ , die Produktion von IL-4 und IL-5 wird nicht beeinflusst (Betz, 1991).

6.3.5. Zusammenhänge zwischen Th₁-/Th₂-Antworten und Krankheiten

Wenn man nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit annimmt, daß Katecholamine nach Stimulation durch Borrelien über eine verminderte Produktion von IL-12 Th₁-Antworten hemmen, wäre es interessant zu sehen, ob Th₁-Antworten in vivo bei der Borreliose eine Rolle spielen, und wie Katecholamine Krankheiten beeinflussen, die durch eine ausgeprägte Th₁- oder Th₂-Antwort geprägt sind.

Kelleher beobachtete im Frühstadium nach Infektion mit Borrelien im Herzgewebe von Mäusen vor allem IL-1 β , aber auch die von TNF- α und INF- γ , Interleukine, die besonders eine Th₁-Antwort verstärken. IL-4, ein Interleukin das für die Th₂-Antwort von Bedeutung ist, war nicht vorhanden (Kelleher, 1998). Der Eindruck, daß Borrelien vor allem eine Th₁-Antwort hervorrufen, wird durch die Tatsache gestützt, daß es vor allem zu einer Konzentrationserhöhung von IL-12 kommt, ein Interleukin das in besonderem Maße in der Lage ist, eine Th₁-Antwort zu unterstützen. Untersuchungen stehen noch aus, ob in vivo erhöhte Katecholamine durch eine Hemmung der Produktion von IL-12 den Krankheitsverlauf der Borreliose beeinflussen, z. B. zu einer Chronifizierung führen.

Beobachtungen bezüglich anderer Krankheiten, bei denen eine Th₁-Antwort ebenfalls eine große Rolle spielen, deuten aber auf einen die Th₁-Antwort schwächenden Einfluß von Katecholaminen hin. Eine solche Krankheit ist die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE). Wie bei der multiplen Sklerose, für die sie eine Modellkrankheit darstellt, sind für das Auftreten der Krankheitssymptome dieser Autoimmunkrankheit Th₁-Antworten besonders wichtig. Bei Ratten konnte gezeigt werden, daß β -Agonisten in der Lage sind, die Symptome der EAE abzuschwächen (Wiegmann, 1995). Katecholamine können also nicht nur in vitro, wie es die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit andeuten, sondern auch in vivo Th₁-Antworten schwächen.

Eine Rolle scheinen β -Rezeptoren auch bei der Multiplen Sklerose zu spielen. Bei Patienten mit Multipler Sklerose ist die Anzahl von β -Rezeptoren auf Lymphozyten erhöht, die Sezernierung an IFN- γ ist vermehrt. Sowohl die Anzahl der β_2 -Rezeptoren auf Lymphozyten als auch die Produktion an IFN- γ kann durch eine Behandlung mit β -Rezeptoragonisten vermindert werden. (Muthyala, 1995). Auch hier gewinnt man den Eindruck, daß Katecholamine wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, die Fähigkeit haben, Th₁-Antworten zu hemmen, und dies nicht nur in vitro, sondern auch in vivo. Weitere Hinweise für die Bedeutung veränderter β -Rezeptorenzahlen für die Pathogenese von Krankheiten liefern Ergebnisse von Wahle et al. und Baerwald et al., die bei Patienten mit rheumatoider Arthritis nicht nur eine geringere Anzahl an β_2 -Rezeptoren, sondern auch einen geringeren suppressiven Einfluß von Katecholaminen auf die Proliferation von Lymphozyten beobachteten. Bei Patienten mit hoher Krankheitsaktivität sahen sie einen Shift von β -Rezeptor- zu α_2 -Rezeptor-vermitteltem Einfluß von Katecholaminen auf Lymphozyten, was auf eine mögliche Relevanz in vivo der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Bedeutung der α_2 -Rezeptoren hindeutet (Wahle, 1999; Baerwald, 1997 und 1999).

Die Bedeutung des hemmenden Einflusses von Katecholaminen auf die Produktion von IL-12 liegt also insbesondere in der dadurch abgeschwächten Th₁-Antwort (Elenkov, 1996; Panina-Bordignon 1997). Katecholamine schwächen Th₁-Antworten nicht nur über ihren Einfluß auf die Produktion von IL-12, sondern über direkten hemmenden Einfluß auf Th₁-Zellen (Sanders, 1997; Ramer-Quinn, 1997) und über einen Shift zu Th₂-Antworten durch Verstärkung der Produktion von IL-6, die auch in der

vorliegenden Arbeit beobachtet wurde (Anguita 1998). Katecholamine sind über die Schwächung von Th₁-Antwort und Stärkung von Th₂-Antwort in der Lage Krankheiten zu beeinflussen, bei denen diese Antworten eine große Rolle spielen (Wiegmann 1995; Kelleher 1998; Muthyala, 1995; Wahle, 1999; Baerwald, 1997 und 1999).

6.4. Adrenozeptoren

Es konnte keine Korrelation zwischen β -Rezeptordichte und Katecholamineffekten festgestellt werden. Es läßt sich also von der Anzahl der β -Rezeptoren nicht auf das Ausmaß eines Einflusses von Katecholaminen schließen. Die Zahl der β -Rezeptoren ist allerdings auch nicht die einzig mögliche Erklärung für die Stärke eines Katecholamineinflusses. Die Rezeptoren können sich in ihrer Affinität sehr unterscheiden, nach Bindung eines Katecholamins kann unterschiedlich viel second-messenger in der Zelle freigesetzt werden und schließlich kann bei unterschiedlichem Aktivierungszustand der Zelle die gleiche Konzentration an second-messenger verschieden viel bewirken.

In der vorliegenden Arbeit liegt die durchschnittliche β -Rezeptorenzahl bei 1316,4 \pm 783,2 pro Monozyt, mit einem Maximum von 2867 und einem Minimum von 444 β -Rezeptoren. Damit liegt sie im Bereich von β -Rezeptordichten, die von anderen Arbeitsgruppen beschrieben werden. Angaben bezüglich der Zahl der β -Rezeptoren auf Monozyten variieren zwischen 1174 \pm 233 und 3278 \pm 690 (Landmann, 1984 und 1992; Tits, 1990).

Die Versuche der vorliegenden Arbeit deuten zum größten Teil auf einen Einfluß der Katecholamine über β -Rezeptoren. Die stimulierende Wirkung von Noradrenalin auf die Produktion von IL-6 und die hemmende von Adrenalin und Noradrenalin auf die Produktion von IL-12 läßt sich mit Propranolol hemmen. Es ergeben sich allerdings wie oben aufgeführt indirekte Hinweise für einen hemmenden Einfluß von Katecholaminen auf die Produktion von IL-6 über α -Rezeptoren.

Eine Reihe an Untersuchungen bestätigen, daß der hemmende Einfluß von Katecholaminen auf die Produktion von IL-1 und IL-12 über β -Rezeptoren vermittelt

wird, daß in der Lage ist den Katecholamineinfluß zu hemmen (Elenkov, 1996; Panina-Bordignon, 1997; Hasko, 1998; Broug-Holub, 1998; Koff, 1986).

Die stimulierenden Eigenschaften von Adrenalin und Noradrenalin auf die Produktion von IL-6 kommen in den meisten Arbeiten ebenfalls über Bindung an β -Rezeptoren zustande (Nakamura, 1998; Maimone, 1993; Burysek, 1997; Liao, 1995; von Patay, 1998).

Der fragliche inhibitorische Einfluß von Katecholaminen auf die Produktion von IL-6 über α -Rezeptoren wird in keiner Arbeit direkt beschrieben. Indirekte Hinweise dafür finden sich bei Hasko et al., ein solcher Einfluß über α_2 -Rezeptoren wird allerdings auf die Produktion von TNF- α beschrieben (Hasko, 1995; Spengler, 1990; Liao, 1995).

Propranolol ist nicht in der Lage, den Katecholamineinfluß komplett zu hemmen. Das ist ein Hinweis dafür, daß Katecholamine ihren Einfluß auf Monozyten eventuell nicht nur über Adrenozeptoren vermitteln, sondern auch über bisher nicht näher charakterisierte Aktivierungswege.

Darauf deuten auch Arbeiten von Cook-Mills et al.: Concanavalin A- oder LPS-induzierte Aktivierung von Lymphozyten kann durch β -Agonisten gehemmt werden, diese Inhibierung läßt sich aber nicht mit β -Rezeptorantagonisten blocken. Cook-Mills et al. postulieren, daß die β -Agonisten über einen nicht klassischen Weg Einfluß auf die Lymphozyten haben (Cook-Mills, 1995).

Es ist keine Korrelation zwischen β -Rezeptordichte und Katecholamineinfluß festzustellen. Der beobachtete Einfluß auf die Produktion der Interleukine wird über β -Rezeptoren, bezüglich der Produktion von IL-6 eventuell auch über α -Rezeptoren vermittelt. Im übrigen gibt es Hinweise dafür, daß Katecholamine zusätzlich nicht näher charakterisierte Aktivierungswege verwenden.

7. Zusammenfassung

In den letzten beiden Jahrzehnten wurde verstärkt Augenmerk auf Interaktionen zwischen Immunsystem und autonomen Nervensystem gerichtet. Es wurde deutlich, daß das autonome Nervensystem mit den Neurotransmittern Adrenalin und Noradrenalin durch differenzierte Beeinflussung von Immunozyten das Immunsystem in seinen Funktionen modulieren kann.

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluß von Adrenalin und Noradrenalin auf die durch LPS, Borrelien und IFN- γ induzierte Produktion von IL-1, IL-6 und IL-12 untersucht. Durch Hinzugabe von α - und β -Blockern wird differenziert, ob der Katecholamineinfluß über Bindung an α - oder β -Rezeptor erfolgt. Zusätzlich wird die Dichte der β -Rezeptoren auf den Monozyten bestimmt, um zu sehen, ob es eine Korrelation zwischen Katecholamineinfluß und β -Rezeptordichte gibt.

Nach Isolierung der Monozyten mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation und magnetischer Zellsortierung (MACS), werden die Zellen in Kultur genommen und mit Borrelien, LPS und IFN- γ stimuliert. Nach Zugabe der Katecholamine in den Konzentrationen 10^{-5} und 10^{-9} M und der Rezeptorantagonisten Propranolol und Urapidil werden nach 4, 8 und 24 Stunden die Konzentrationen von IL-1, IL-6 und IL-12 mit Enzym-Immunoassays bestimmt. Die β -Rezeptordichte wird über Radioligandenbindungsstudien mit 125 Iodocyanopindolol gemessen.

Während Borrelien und LPS die Produktion aller drei Interleukine stimulieren, erhöht sich durch IFN- γ die Konzentration von IL-1 sehr wenig, die Produktion von IL-6 wird gehemmt und eine Produktion von IL-12 ist nicht zu messen.

Nach Stimulation mit LPS und Borrelien hemmen Katecholamine die Produktion von IL-12, nach Stimulation mit IFN- γ die Produktion von IL-1. Die Produktion von IL-6 kann nach Behandlung mit IFN- γ sowohl gesteigert (10^{-5} M) als auch gehemmt (10^{-9} M) werden. Nach 4 Stunden ist in keinem Versuch ein Einfluß von Katecholaminen zu sehen, nach 8 Stunden verändern Katecholamine die Produktion von IL-6 und IL-12 und erst nach 24 Stunden wird die Produktion von IL-1 gehemmt.

Für die Versuche, bei denen sich ein Katecholamineinfluß zeigt, kann keine Korrelation zwischen diesem und der Anzahl an β -Rezeptoren auf den Monozyten festgestellt werden. Der beobachtete Einfluß von Noradrenalin auf die Produktion von IL-12 wird über Bindung der Katecholamine an β -Rezeptoren hervorgerufen, er kann mit Propranolol gehemmt werden. Die Produktion von IL-6 nach Behandlung mit IFN- γ wird über β -Rezeptoren gesteigert, über α -Rezeptoren gesenkt.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, daß Adrenalin und Noradrenalin in der Lage sind, Monozyten in der Produktion von Interleukinen zu beeinflussen. Dieser Einfluß ist abhängig von der Katecholaminkonzentration, von dem verwendeten Stimulans und der Stimulationsdauer. Katecholamine hemmen die Produktion von IL-1 und IL-12 nach Behandlung mit Borrelien, LPS und IFN- γ über Bindung an β -Rezeptoren. Die Produktion von IL-6 können Katecholamine nach Behandlung mit IFN- γ β -rezeptorvermittelt steigern, über den α -Rezeptor auch senken. Der beobachtete Katecholamineinfluß läßt sich mit den Antagonisten nicht vollständig aufheben, was ein Indiz für einen Einfluß über nicht klassifizierte Aktivierungswege sein könnte.

Da insbesondere IL-12 ein entscheidendes Interleukin bei der Induktion der Th₁-Antwort ist, kann man annehmen, daß Katecholamine auf diesem Wege Th₁-Antworten hemmen, damit den Verlauf von Immunantworten und Autoimmunkrankheiten durch eine geschwächte Th₁-Antwort und ein relatives Überwiegen der Th₂-Antwort beeinflussen.

In vitro werden Immunantworten durch Stimulantien in unterschiedliche Richtungen „geschifft“. Dieser „Shift“ kann durch Katecholamine moduliert werden, wobei weitere Studien erforderlich sind, um auch in vivo entsprechende Effekte zu demonstrieren, und um die Bedeutung dieses in vitro beobachteten Einflusses von Katecholaminen für Krankheiten wie die Borreliose abschätzen zu können.

8. Literaturverzeichnis

Aarons D., Nies A.S., Gall J., Hegstrand L.R., (1980): Elevation of beta-adrenergic receptor density in human lymphocytes after propranolol administration. *J. Clin. Invest.* 65: 949-957

Aarons D., Nies A.S., Gerber J.G., Molinoff P.B., (1982): Decreased beta adrenergic receptor density on human lymphocytes after chronic treatment with agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 224: 1-6

Abel E.A., Di Cicco L. M., Orenberg E.K., Fraki J.E., Farber E.M. (1986): Drugs in exacerbation of psoriasis. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 15: 1007-1022

Ackermann K.D., Bellinger D.L., Felten S.Y., Felten D.L., (1991): Ontogeny and senescence of noradrenergic innervation of the rodent thymus and spleen. In: *Psychoneuroimmunology*, Hrsg: Ader R., Felten D.L., Cohen N., San Diego, CA: Academic, Vol. 2, 71-125

Agius M.A., Checinski M.E., Richman D.P., Chelmicka-Schorr E., (1987): Sympathectomy enhances the severity of experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG). *J. Neuroimmunol.*, 16: 11-12

Ahlquist R.P., (1948): A study of the adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.*, 153: 586-600

Andersson J.P., Andersson U.G., (1990): Human intravenous immunoglobulin modulates monokine production in vitro. *Immunology*, 71(3): 372-376

Anguita J., Samanta S., Barthold S.W., Fikrig E., (1997): Ablation of interleukin-12 exacerbates Lyme arthritis in SCID-mice. *Infect. Immun.*, 65(10): 4334-4336

Anguita J., Rincon M., Samanta S., Barthold S.W., Flavell R.A., Fikrig E., (1998): *Borrelia burgdorferi*-infected, interleukin-6-deficient mice have decreased Th2 responses and increased lyme arthritis. *J. Infect. Dis.*, 178(5): 1512-1515

Arend W.P., D'Angelo S., Joslin F.G., (1988): Regulation of interleukin 1 production in human monocytes. 1. Effects of gamma-interferon and cyloheximide. Clin. Exp. Immunol., 74(3): 377-381

Aschoff L., (1924): Das retikulo-endotheliale System. Ergebnisse der inneren Medizin und Kinderheilkunde. Springer Verlag, 26: 1-117

Assche G. van, Barbara G., Deng Y., Lovato P., Gauldie J., Collins S.M., (1999): Neurotransmitters modulate cytokine-stimulated interleukin 6 secretion in rat intestinal smooth muscle cells. Gastroenterology, 116(2): 346-353

Baerwald C., Graeffe C., Muhl C., von Wichert P., Krause A., (1992a): Beta2-adrenergic receptors on peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatic diseases. Eur. J. Clin. Invest., 22(1): 42-46

Baerwald C., Graeffe C., von Wichert P., Krause A., (1992b): Decreased density of β -adrenergic receptors on peripheral blood mononuclear cells in patients with reumatoid arthritis. J. Rheumatology, 19: 204-210

Baerwald C., Laufenberg M., Specht T., von Wichert P., Burmester G.R., Krause A., (1997): Impaired sympathetic influence on the immun response in patients with rheumatoid arthritis due to lymphocyte subset-specific modulation of beta 2-adrenergic receptors. Br. J. Rheumatol., 36(12): 1262-1269

Baerwald C., Wahle M., Ulrichs T., Jonas D., von Bierbrauer A., von Wichert P., Burmester G.R., Krause A., (1999): Reduced catecholamine response of lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. Immunobiology, 200(1): 77-91

Bailly S., Ferrua B., Fay M., Gougerot-Pocidallo M.A., (1990): Differential regulation of IL 6, IL 1 A, IL 1 beta and TNF alpha production in LPS-stimulated human monocytes: role of cyclic AMP. Cytokine, 2(3): 205-210.

Barnes P.J., (1995): Beta adrenergic receptors and their regulation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, Vol. 125. 838-860

Beck G., Benach J.L., Habicht G.S., (1989): Isolation of interleukin 1 from joint fluids of patients with Lyme disease. *J. Rheumatol.*, 16(6): 800-806

Beck G., Habicht G.S., Benach J.L., Coleman J.L., Lysik R.M., O'Brien R.F., (1986): A role for interleukin-1 in the pathogenesis of Lyme disease. *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. (A)*, 263(1-2): 133-136

Beckner, W.L. Farrar, (1988), Potentiation of lymphokine-activated killer cell differentiation and lymphocyte proliferation by stimulation of protein kinase C or inhibition of adenylate cyclase. *J. Immunol.* 140: 208-214

Beekhuizen H., van Furth R., (1993): Monocyte adherence to human vascular endothelium. *J. Leukoc. Biol.*, 54:363

Berquist J., Tarkowski A., Ekman R., Ewing A., (1994): Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91(26): 12912-12916

Berthelsen S., Pettinger W.P., (1977): A functional basis for classification of adrenergic receptors. *Life Sci.*, 21: 595-606

Besedovsky H.O., del Rey A. E., Sorkin E., Da Prada M., Keller H.H., (1979): Immunoregulation mediated by the sympathetic nervous system. *Cell. Immunol.* 48: 346-355

Besedovsky H.O., Del Rey A.E., Sorkin E., Da Prada M., Burri R., Honneger C., (1983): The immun response evokes changes in brain noradrenergic neurons. *Science Wash. DC*, 221: 564-565

Besedovsky H.O., Del Rey A., (1996): Immun-neuro-endocrine interactions: Facts and hypotheses. *Endocrine Reviews*, Vol. 17, No 1: 64-102

Betz M., Fox B.S., (1991): Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J. Immunol.*, 146(1): 108-113

Biondillo D.E., Konicek S.A., Iwamoto G.K., (1994): Interferone-gamma regulation of interleukin 6 in monocytic cells. *Am. J. Physiol.*, 267: L564-L568

Blalock J.E., (1994): The syntax of immun-neuroendocrine communication, *Immunology Today*, Vol 15, Nr 11, 504-511

Bont E.S. de, Niemarkt A.E., Tamminga R.Y., Kimpen J.L., Kamps W.A., de Leij L.H., (1996): Lipopolysaccharide-induced cytokine production in peripheral blood mononuclear cells: intracellular localisation in tumor necrosis factor alpha and in interleukin 1 beta detected with a three-color immunfluorescence technique. *Histochem. Cell Biol.*, 106(6): 593-598

Bourne HR, Lichtenstein LM, Melmon KL, Henney CS, Weinstein Y, Shearer GM. (1974): Modulation of inflammation and immunity by cyclic AMP. *Science*, 184(132):19-28.

Böyum A., (1968): Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 21(97): 77-89

Brandwein S.R., (1986): Regulation of interleukin 1 production by mouse peritoneal macrophages. Effects of arachidonic acid metabolites, cyclic nucleotides, and interferones. *J. Biol. Chem.*, 261(19): 8624-8632

Brodde E., Engel G., Hoyer D., Block K.D., Weber F., (1981): The β -adrenergic receptor in human lymphocytes-subclassification by the use of a new radioligand (+/-) [125 Iodo]cyanopindolol. *Life science*, 29: 2189-2198

Broug-Holub E., Persoons J.H., Schornagel K., Mastbergen S.C., Kraal G., (1998): Effects of stress on alveolar macrophages: a role for the sympathetic nervous system. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 19(5): 842-848

Brown E.J., (1991): Complement receptors and phagocytosis. *Curr. Opin. Immunol.*, 3:76

Bruunsgaard H., Galbo H., Halkjaer-Kristensen J., Johansen T.L., MacLean D.A., Pedersen B.K., (1997): Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. *J. Physiol.*, 499(Pt3): 833-841

Burysek L., Houstek J., (1997): beta-Adrenergic stimulation of interleukin-1alpha and interleukin-6 expression in mouse brown adipocytes. *FEBS Lett.*, 411(1): 83-86

Cannon J.G., Evans W.J., Hughes V.A., Meredith C.N., Dinarello C.A., (1986): Physiological mechanisms contributing to increased interleukin-1 secretion. *J. Appl. Physiol.*, 61(5): 1869-1874

Cannon J.G., Fielding R.A.,Fiatarone M.A., (1989): *Am. J. Physiol.* 26, R451-R455

Carlson S.L., Felten D.L., Livnat S., Felten S.Y., (1987): Alterations of monoamines in specific central autonomic nuclei following immunization in mice. *Brain Behav. Immun.*, 1: 52-63

Carlson SL, Brooks WH, Roszman TL. (1991):Neurotransmitter-lymphocyte interactions: dual receptor modulation of lymphocyte proliferation and cAMP production. *J Neuroimmunol.*, (1-2):155-62.

Caron M.G., Lefkowitz R.J., (1991): Structure-function relationships. In: *The Beta-Adrenergic Receptors*. Hrsg: Perkins J. P.,The Human Press Inc., 41-72

Cavaillon JM. (1994): Cytokines and macrophages. *Biomed. Pharmacother.*, 48(10):445-53

Chen L., Suzuki Y., Wheelock E.F., (1987): Interferon gamma synergizes with tumor necrosis factor and with interleukin 1 and requires the presence of both monokines to induce antitumor cytotoxic activity in macrophages. *J. Immunol.*, 139: 4096-4101

Cohen L., David B., Cavaillon J.M., (1991): Interleukin-3 enhances cytokine production by LPS-stimulated macrophages. *Immunol. Lett.*, 28(2): 121-126

Cohen N.R., Ader R, Felten D.L., (1994): Psychoneuroimmunology. In *Immunology and inflammation basic mechanisms and clinical consequences*, Hrsg: Sigal L.H., Ron Y., New York: McGraw-Hill, 465-494

Cook-Mills J.M., Cohen R.L., Perlman R.L., Chambers D.A., (1995): Inhibition of lymphocyte activation by catecholamines: evidence for a non-classical mechanism of catecholamine action. *Immunology*, 85(4): 544-549

Danis V.A., Kulesz A.J., Nelson D.S., Brooks P.M., (1990): Cytokine regulation of human monocytes interleukin-1 (IL-1) production in vitro, Enhancement of IL-1 production by interferon (IFN) gamma, tumor necrosis factor-alpha, IL-2 and IL-1, and inhibition by IFN-alpha. *Clin. Exp. Immunol.*, 80(3): 435-443

Davis A.O., Lefkowitz E.J., (1984): Regulation of β -adrenergic receptors by steroid hormones. *Ann. Rev. Physiol.*, 46: 119-130

Dent G.M., Giembycz M.A., Rabe K.F., Evans M., Barnes P.J., (1994): Suppression of respiratory burst in human eosinophils by phosphodiesterase inhibitors: interaction with the β -receptor agonist albuterol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 271: 1167-1174

Depelchin A., Latesson J.J., (1981): Adrenaline influence on the immune response- Accelerating or suppressor effects according to the time of application. *Immunol. Lett.*, 3: 199-205

Diehl G. E., Holtmann S., (1989): Lyme borreliosis and its significance for the ENT physician. *Laryngorhinootologie*, 68(2): 81-87

Donnelly R.P., Fenton M.J., Kaufman J.D., Gerrard T.L., (1991): IL-1 expression in human monocytes is transcriptionally and posttranscriptionally regulated by IL-4. *J. Immunol.*, 146(10): 3431-3436

Elenkov J., Papanicolaou D.A., Wilder R.L., Chrousos G.P., (1996): Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications; *Proc. Assoc. Am. Physicians.* 108:374-381

Elsbach P., Weiss J., (1983): A reevaluation of the roles of the O₂-dependent and O₂-independent microbicidal systems of phagocytes. *Rev. Infect. Dis.*, 5: 843

Ernström U., Sandberg G., (1973): Effects of alpha- and beta-receptor stimulation on the release of lymphocytes and granulocytes from the spleen. *Scan. J. Haematol.*, 11: 275-286

Espersen G.T., Elbaek A., Ernst A., (1990): *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 98, 395-400

Evans W. J., Meredith C.N., Cannon J.G., (1986): *J. Appl. Physiol.* 61, 1864-1868

Felten S.Y., Carlson S.L., Bellinger D.L., Felten D.L., (1986): An overview of the efferent autonomic nervous system. In: *Neuroregulation of Autonomic, Endocrine and Immun Systems.* Hrsg: Frederickson R.C.A., Hingtgen H.J.N., Aprison M.H. Boston: Martinus Nijhoff; 109-126

Felten D.L., Felten S.Y., Bellinger D.L., Carlson S.L., Ackermann K. D., Madden K. S., Olschowka J. A., Livnat S., (1987a): Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immun system: Structure and function. *Immunol. Rev.* 100: 225-260

Felten S.Y., Olschowka J., (1987b): Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen: 2. Tyrosine hydroxylase (TH)-positive nerve terminals from synapticlike contacts on lymphocytes in the splenic white pulpa; *J. Neuroscience Research*, 18: 37-48

Felten D.L., Cohen N., Ader R., Felten S.Y., Carlson S.L., Roszmann T.L., (1991a): Central neural circuits involved in neural-immune interactions. In: Psychoneuroimmunology, Hrsg: Ader R., Felten D.L., Cohen N., San Diego, CA: Academic, 3-25

Felten S.Y., Felten D.L., (1991b): Innervation of lymphoid tissue. In: Psychoneuroimmunology, Hrsg: Ader R., Felten D.L., Cohen N., San Diego, CA: Academic, 27-68

Felten D.L., Felten S.Y., Bellinger D.L., Lorton D., (1992a): Noradrenergic and peptidergic innervation of secondary lymphoid organs: role in experimental rheumatoid arthritis. Eur. J. Clin. Invest. 22: 37-41

Felten S.Y., Felten D.L., Bellinger D.L., Olschowka J.A., (1992b): Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid organs, In: Chemical Immunology: Neuroimmunoendocrinology, Hrsg: Blalock J.E., Basel: Karger, 25-48

Fiorentino D.F., Zlotnik A., Mosmann T.R., Howard M., O'Garra A., (1991): IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J. Immunol., 147(11): 3815-3822

Frendl G., Fenton M.J., Beller D.I., (1990): Regulation of macrophage activation by IL-3. 2. IL-3 and lipopolysaccharide act synergistically in the regulation of IL-1 expression. J Immunol., 144(9): 3400-3410

Fuchs B.A., Albright J.W., Albright J.F., (1988): β -adrenergic receptors on murine lymphocytes: density varies with cell maturity and lymphocyte subtype and is decreased after antigen administration. Cell. Immunol. 114: 231-245

Gader A.M.A., (1974): The effects of beta adrenergic blockage on the response of leukocyte counts to intravenous epinephrine in man. Scan. J. Haematol., 13: 11-16

Gately M.K., Desai B.B., Wolitzky A.G., Quinn P.M., Dwyer C.M., Podlaski F.J., Familletti P.C., Sinigaglia F., Chizzonite R., Gubler U.,(1991): Regulation of human

lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). *J. Immunol.*, 147(3): 874-82

Germain R.N. (1994): MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T-lymphocyte activation. *Cell*, 76: 287

Germann T., Gately M.K., Schoenhaut D.S., Lohoff M., Mattner F., Fischer S., Jin S.C., Schmitt E., Rude E., (1993): Interleukin-12/T cell stimulating factor, a cytokine with multiple effects on T helper type 1 (Th1) but not on Th2 cells. *Eur. J. Immunol.*, 23 (8): 1762-1770

Gerrard T.L., Siegel J.P., Dyer D.R., Zoon K.C., (1987): Differential effects of interferon-alpha and interferon-gamma on interleukin 1 secretion by monocytes. *J. Immunol.*, 138(8): 2535-2540

Gery I., Gershon R.K., Waksman B.H., (1972): Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. *J. Exp. Med.*, 136: 128-138

Giambartolomei G.H., Dennis V.A., Lasater B.L., Philipp M.T., (1999): Induction of pro- and anti-inflammatory cytokines by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins in monocytes is mediated by CD14. *Infect. Immun.*, 67(19): 140-147

Gibson-Berry KL, Whitin JC, Cohen HJ. (1993): Modulation of the respiratory burst in human neutrophils by isoproterenol and dibutyryl cyclic AMP. *J Neuroimmunol.*, 43(1-2):59-68.

Giron L.T., Crutscher K.A., Davis J.N., (1980): Lymph nodes- a possible site for sympathetic neuronal regulation of immune responses. *Ann. Neurol.*, 8: 520-522

Goin C., Sterin-Borda L., Borda E.S., Finiasz M., Fernandez J., de Bracco M.M.E., (1991): Active alpha₂ and beta adrenoceptors in lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia, *Int. J. Can.*, 49: 178-181

Gool J. van, Vugt H. van, Helle M., Aarden L.A., (1990): The relation among stress, adrenalin, interleukin 6 and acute phase proteins in the rat. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 57(2): 200-210

Hadden W., Hadden E.M., Middleton E., (1970): Lymphocyte blast transformation- 1. Demonstration of adrenergic receptors in human peripheral lymphocytes. *Cell. Immunol.* 1: 583-595

Hasko G., Elenkov I.J., Kvetan V., Vizi E.S., (1995): Differential effect of selective block of alpha 2-adrenoceptors on plasma levels of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6 and corticosterone induced by bacterial lipopolysaccharide in mice. *J. Endocrinol.*, 144(3): 457-462

Hasko G., Szabo C., Nemeth Z.H., Salzman A.L., Vizi E.S., (1998): Stimulation of beta-adrenoceptors inhibits endotoxin-induced IL-12 production in normal and IL-10 deficient mice. *J. Neuroimmunol.*, 88(1-2): 57-61

Haupt T., Landgraf S., Netusil P., Capiou C., Desmons P., Hauser P., Burmester G.R., (1997): Activation of monocytes by three OspA vaccine candidates: lipoprotein OspA is a potent stimulator of monokines. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 19(1): 15-23

Hayes M.P., Wang J., Norcross M.A., (1995): Regulation of interleukin-12 expression in human monocytes: selective priming by interferone-gamma of lipopolysaccharide-inducible p35 and p40 genes. *Blood*, 86(2): 646-650

Heesen M., Deinsberger W., Dietrich G.V., Detsch O., Boldt J., Hempelmann G., (1996): Increase of interleukin-6 plasma levels after elective craniotomy: influence of interleukin-10 and catecholamines. *Acta. Neurochir.*, 138(1): 77-80

Hellstrand K., Hermodsson S., Strannegard O., (1985): Evidence for a beta-adrenoceptor-mediated regulation of human natural killer cells. *J. Immunol.*, 134(6):4095-4099.

Hirohashi N., Morrison D.C., (1996): Low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment of mouse macrophages modulates LPS-dependent interleukin-6 production in vitro. *Infect. Immun.*, 64(3): 1011-1015

Hiskox S., Jiang W.G., (1997): Interleukin-12, an emerging anti-tumour cytokine. *In Vivo*, 11(2): 125-132

Hoffmann-Goetz L., Pedersen B.K., (1994): Exercise and the immun system: A model of the stress response? *Immunology Today*, Vol. 15, No. 8,382-387

Hu X.X., Goldmuntz E.A., Brosnan C.F., (1991): The effect of norepinephrine on endotoxin-mediated macrophage activation. *J. Neuroimmunol.*, 31(1): 35-42

Hurme M., (1990): Modulation of interleukin-1 Produktion by cyclic AMP in human monocytes. *FEBS Lett.*, 263(1): 35-37

Infante-Duarte C., Kamradt T., (1997): Lipopeptides of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins induce Th1 phenotype development in alphabeta T-cell receptor transgenic mice. *Infect. Immun.*, 65(10): 4094-4099

Irimajiri N., Bloom E.T., Makinodan T., (1985): Suppression of murine natural killer cell activity by adherent cells from aging mice. *Mech. Ageing Dev.*, 31(2):155-162.

Isler P., de Rochemonteix B.G., Songeon F., Boehringer N., Nicod L.P., (1999): Interleukin-12 production by human alveolar macrophages is controlled by the autocrine production of interleukin-10. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*; 20(2): 270-278.

Johnson L., Ashmore R.C., Gordon M.A., (1981): Effects of β -adrenergic agents on the murine lymphocyte response to mitogen stimulation. *J. Immunopharmacology*, 3, 205

Kammer G.M., Boehm C.A., Rudolph S.A., Schultz L.A., (1988): Mobility of the human T lymphocyte surface molecules CD3, CD4, and CD8: regulation by a cAMP-dependent pathway. *Proc .Natl. Acad. Sci. U S A.*, 85(3):792-796.

Kappes D., Strominger, J.L. (1988): Human class 2 major histocompatibility complex genes and proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 57: 991

Kato T., Inoue T., Yamamoto K., Tamura T., Nariuchi H.,(1992): Induction of IL-2 receptor expression and proliferation of T cell clones by a novel cytokine(s). *Cell Immunol.*, 142(1): 79-93.

Katz P., Zaytoun A.M., Fauci A.S., (1982): Mechanisms of human cell-mediated cytotoxicity. I. Modulation of natural killer cell activity by cyclic nucleotides. *J. Immunol.*, 129(1):287-296

Kelleher Doyle M., Telford S.R. 3rd, Criscione L., Lin S. R., Spielman A., Gravallesse E.M., (1998): Cytokines in murine lyme carditis: Th1 cytokine expression follows expression of proinflammatory cytokines in a susceptible mouse strain. *J. Infect. Dis.*, 177(1): 242-246

Keller S.E., Schleifer S.J., Demetrikopoulos M.K., (1991): Stress induced changes in immune function in animals: hypothalamo-pituitary- adrenal influences. In: *Psychoneuroimmunology*, ed. Ader R., Felten D.L., Cohen N., San Diego, CA: Academic 771-787

Kelley J.L., Rozek M.M., Suenram C.A., Schwartz C.J., (1987): Activation of human blood monocytes by adherence to tissue culture plastic surfaces. *Exp. Mol. Pathol.*, 46(3):266-78

Kiecolt-Glaser J.K., Glaser R., (1991): Stress and immun function in humans. *Psychoneuroimmunology-2*, San Diego: Academic, pp. 847-867

Kirchner H., Kruse A., Neustock P., Rink L., (1993): *Cytokine und Interferone*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford, 48

Kishimoto T., (1996): Interleukin 6 receptor. In: *Encyclopedia of Immunology*. 2nd ed., Hrsg: Delves P.J., Roitt I.M., San Diego: Academic Press., 1429-1461

Klein J., (1991): Lymphokine und ihre Rezeptoren. In: Immunologie ed. Klein J., VCH, 237-255

Koff W.C., Dunegan M.A., (1985): Modulation of macrophage-mediated tumoricidal activity by neuropeptides and neurohormones. J. Immunol., 135(1): 350-354

Koff W.C., Fann A.V., Dunegan M.A., Lachmann L.B., (1986): Catecholamine-induced suppression of interleukin-1 production. Lymphokine Res., 5(4): 239-247

Kouassi E., Li Y.S., Boukhris W., Millet I., Revillard J.-P., (1988): Opposite effects of the catecholamines dopamine and norepinephrine on murine polyclonal B-cell activation, Immunopharmacology, 16: 125-137

Krakauer T., Oppenheim J.J., (1996): Interleukin 1 and its receptor. In: Encyclopedia of Immunology. 2nd ed., Hrsg: Delves P.J., Roitt I. M. San Diego: Academic Press., 1429-1461

Krause A., Henrich A., Beckh K.H., von Wichert P., Baerwald C., (1992): Correlation between density of β 2-adrenergic receptors on peripheral blood mononuclear cells and serum levels of soluble IL-2 receptors in patients with chronic inflammatory diseases. Eur. J. Clin. Invest. 22(1): 47-51

Krause A., Steitz A., von Wichert P., Baerwald C., (1995): Influence of cytokines on the density of beta 2-adrenergic receptors on peripheral blood mononuclear cells in vitro. Cytokine, 7(3): 273-276

Landmann R., Bürgisser E., West M., Bühler F.R., (1984): Beta-adrenergic receptors are different in subpopulations of human circulating lymphocytes. J. Recept. Res., 4(1-6): 37-50

Landmann R., (1992): Beta-adrenergic receptors in human leukocyte subpopulations. Eur. J. Clin. Invest., 22(1): 30-36

Lands A.M., Arnold A., McAuliff J.P., Luduena F.P., Brown T.G., (1967): Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature*, 214: 597-598

Langer S.Z., (1974): Presynaptic regulation of catecholamine release. *Br. J. Pharmacol.*, 60: 481-497

Lea T., Vartdal F., Davis C., Ugelstad J., (1985): Magnetic monosized particles for fast and specific fractionation of human mononuclear cells. *Scand. J. Immunol.*, 22(2): 207-216

Lefkowitz R.J., Caron M.G., (1987): Molecular and regulatory properties of adrenergic receptors. *Recent. Prog. Horm. Res.* , 43:469-497

Lemaire I., (1988): Neurotensin enhances IL-1 production by activated alveolar macrophages. *J. Immunol.*, 140(9): 2983-2988

Levine J.D., Dardick S.J., Roizen M.F., Helms C., Basbaum A.L., (1986): Contribution of sensory afferents and sympathetic efferents to joint injury in experimental arthritis. *J. Neurosci.*, 6: 3423-3429

Liao J., Keiser J.A., Scales W.E., Kunkel S.L., Kluger M.J., (1995): Role of epinephrine in TNF and IL-6 production from isolated perfused rat liver. *Am. J. Physiol.*, 268: R896-901

Lichtenstein, Margolis S., (1968): Histamine release in vitro: inhibition by catecholamines and methylxanthenes. *Science*. 161:902-903

Lichtenstein LM, Margolis S. (1968): Histamine release in vitro: inhibition by catecholamines and methylxanthenes. *Science*, 30;161(844):902-903

Loeper M., Crouzon O., (1904): L'action de l'adrénalin sur le sang. *Arch. Med. Exp. Anat. Pathol.*, 16: 83-108

Lorton D., Bellinger D.L., Duclos M., Felten S.Y., Felten D.L., (1996): Application of 6-hydroxytryptamin into the fatpads surrounding the draining lymph nodes exacerbates adjuvant-induced arthritis, *J. Neuroimmunology*, 64, 103-113

De Luigi A., Terreni L., Sironi M., De Simoni M.G., (1998): The sympathetic nervous system tonically inhibits peripheral interleukin-1beta and interleukin-6 induction by central lipopolysaccharide. *Neuroscience*, 83(4): 1245-1250

Lysle D.T., Cunnick J.E., Fowler H., Rabin B.S., (1988): Pavlovian conditioning of shock-induced suppression of lymphocyte reactivity: acquisition, extinction and preexposure effects. *Life Sci.*, 42: 2185-2194

Lysle D.T., Cunnick J.E., Kucinski B.J., Fowler H., Rabin B.S., (1990): Characterization of immun alteration induced by a conditioned aversive stimulus. *Psychobiology*, 18: 220-226

Lysle D.T., Cunnick J.E., Maslonek K.A., (1991): Pharmacological manipulation of immun alterations induced by a conditioned aversive stimulus Evidence for a β -adrenergic receptor-mediated Pavlovian conditioning process. *Behav. Neurosci.*, 105: 443-449

Ma Y., Weis J.J., (1993): *Borrelia burgdorferi* outer surface lipoproteins OspA and OspB possess B-cell mitogenic and cytokine-stimulatory properties. *Infect. Immun.*, 61(9): 3843-3853

Madden K.S., Felten S.Y., Felten D.L., Sundaresan P.R., Livnat S., (1989): Sympathetic neural modulation of the immun system. 1. Depression of T-cell immunity in vivo and in vitro following chemical sympathectomy. *Brain Behav. Immunol.*, 3: 72-89

Madden K.S., Felten S.Y., Felten D.L., Hardy C.A., Livnat S., (1994a): Sympathetic nervous system modulation of the immun system. 2. Induction of lymphocyte proliferation and migration in vivo by chemical sympathectomy. *J. Neuroimmunol.*, 49: 67-75

Madden K.S., Moynihan J.A., Brenner G.J., Felten S.Y., Felten D.L., Livnat S., (1994b): Sympathetic nervous system modulation of the immun system. 3. Alterations in T and B cell proliferation and differentiation in vitro following chemical sympathectomy. *J. Neuroimmunol.*, 49: 77-87

Mahé Y., Oppenheim J.J., (1992): Interleukin 1. In: *Encyclopedia of Immunology Vol 2.*, Hrsg: Roitt I.M., Delves P.J., San Diego: Academic Press, 897-901

Maimone D.C., Cioni C., Rosa S., Macchia G., Aloisi F., Annunziata P., (1993): Norepinephrine and vasoactive intestinal peptide induce IL-6 secretion by astrocytes: synergism with IL-1 β and TNF- α . *J. Neuroimmunol.*, 47: 73-81

Mäki T. (1989): Density and functioning of human lymphocytic β -adrenergic receptors during prolonged physical exercise. *Acta Physiol. Scand.*, 136: 569-574

Melmon K.L., Bourne H.R., Weinstein Y., Shearer G.M., Kram J., Bauminger S., (1992): Hemolytic plaque formation by leukocytes in vitro. Control by vasoactive hormones. *J Clin. Invest.*, 53(1):13-21

Miller L.C., Isa S., Vannier E., Georgilis K., Steere A.C., Dinarello C.A., (1992): Live *Borrelia burgdorferi* preferentially activate interleukin-1 beta gene expression and protein synthesis over the interleukin-1 receptor antagonist. *J. Clin. Invest.*, 90(3): 906-912

Miller L.C., Lynch E.A., Isa S., Logan J.W., Dinarello C.A., Steere A.C., (1993): Balance of synovial fluid IL-1 β and IL-1 receptor antagonist and recovery from Lyme arthritis. *Lancet*, 341(8838): 146-148

Mitenyi S., Müller W., Weichel W., Radbruch A., (1990): High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*, 11: 231

Mora J.M., Amtmann L.E., Hoffmann S.L., (1927): Effect of mental and emotional states on the leukocyte count. *J. Am. Med. Assoc.*, 86: 945-946

Motulsky J., Cunningham E.M.S., Deblasi A., Insel P.A., (1986): Desensitization and redistribution of β -adrenergic receptors on human mononuclear leukocytes. *Am. J. Physiol.*, 250. E583-E590

Moulder J.W., (1985): Comparative biology of intracellular parasitism. *Microbiol. Rev.*, 49: 298

Munoz M.N., Vita A.J., Neely S.P., McAllister K., Spaethe S.M., White S.M., Leff A.R., (1994): Beta adrenergic modulation of formyl-methionin-leucin-phenylalanin stimulates secretion of eosinophile peroxidase and leukotriene C4. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 268: 1339-1343

Musso N.R., Brenci S., Setti M., Indiveri F., Lotti G., (1996): Catecholamine content and in vitro catecholamine synthesis in peripheral human lymphocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 81(10): 3553-3557

Muthyala S., Wiegmann K., Kim D.H., Arnason B.G., Chelmicka-Schorr E., (1995): Experimental allergic encephalomyelitis, beta-adrenergic receptors and interferon gamma-secreting cells in beta-adrenergic agonist-treated rats; *Int. J. Immunopharmacol.*, 17 (11): 895-901.

Nakamura A., Johns E.J., Imaizumi A., Abe T., Kohsaka T., (1998): Regulation of tumor necrosis factor and interleukin-6 gene transcription by beta2-adrenoceptor in rat astrocytes. *J. Neuroimmunol.*, 88 (1-2): 144-153

Nathan C.F., (1987): Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* 79: 319-326

Nicola N.A., Metcalf D., (1986): Specificity of action of colony-stimulating factors in the differentiation of granulocytes and macrophages, *Biochemistry of Macrophages*, Ciba Foundation Symposium 118, Pitman, London, 7

Nielson, (1987): β -adrenergic modulation of the polymorphonuclear leukocyte respiratory burst is dependent upon the mechanism of cell activation. *J. Immunol.* 139: 2392-2397

Nielson CP., (1987): Beta-adrenergic modulation of the polymorphonuclear leukocyte respiratory burst is dependent upon the mechanism of cell activation. *J Immunol.*, 139(7):2392-2397

Northoff H., Berg A., (1991) Immunologic mediators as parameters of the reaction to strenuous exercise. *Int J Sports Med.*, 12 Suppl 1:S9-15.

Pace J.L., Russell S.W., Torres B.A., Johnson H.M., Gray P.W., (1983): Recombinant mouse gamma interferon induces the priming step in macrophage activation for tumor cell killing. *J. Immunol.*, 130 (5): 2011-2013

Palm D., Hellenbrecht D., Quiring K., (1994): Pharmakologie noradrenerger und adrenerger Systeme. In: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Hrsg: Forth W., Henschler D., Rummel W., Starke K, Heidelberg Berlin Oxford : Spektrum Akademischer Verlag, 148-179

Panina-Bordignon P., Mazzeo D., Lucia P.D., D`Ambrosio D., Lang R., Fabbri L., Self C., Sinigaglia F., (1997): Beta2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. *J. Clin. Invest.*, 100(6): 1513-1519

Papanicolaou D.A., Petrides J.S., Tsigos C., Bina S., Kalogeras K.T., Wilder R., Gold P.W., Deuster P.A., Chrousos G.P., (1996): Exercise stimulates interleukin-6 secretion: inhibition by glucocorticoids and correlation with catecholamines. *Am. J. Physiol.*, 271(3Pt1): E601-605

Patay B. von, Loppnow H., Feindt J., Kurz B., Mentlein R., (1998): Catecholamines and lipopolysaccharide synergistically induce the release of interleukin-6 from thymic epithelial cells. *J. Neurimmunol.*, 86(2): 182-189

Paul W.E., (1999): Cytokines and interferons and their receptors. In: *Fundamental Immunology*, 4 ed. Hrsg: Paul W.E., New York: Raven Press Ltd., 751-758

Paul-Eugene N., Kolb J.P., Damais C., Abadie A., Mencia-Huerten J.M., Braquet P., Bousquet J., Dugas B., (1994): Beta 2-adrenoceptor agonists regulate the IL-4-induced phenotypical changes and IgE-dependent functions in normal human monocytes. *J. Leukoc. Biol.*, 55(3): 313-320

Poll T. van der, lowry S.F., (1997): Lipopolysaccharide- induced interleukin 8 production by human whole blood is enhanced by epinephrine and inhibited by hydrocortisone. *Infect. Immun.*, 65(6): 2378-2381

Pouw Kraan T.C. van der, Boeije L.C., Smeenk R.J., Wijdenes J., Aarden L.A., (1995): Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *J. Exp. Med.*, 181(2): 775-779

Qiu H.B., Chen D.C., Pan J.Q., Liu D.W., Ma S., (1999): Inhibitory effects of nitric oxide and interleukin-10 on production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 in mouse alveolar macrophages. *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao*, 20(3):271-5

Rabin B.S., Cohen S., Ganguli R., Lysle D.T., Cunnick J.E., (1989): Bidirectional interaction between the central nervous system and the immun system., *Critical Reviews in Immunology*. Vol 9, No 4: 279-312

Radojic T., Baird S., Darko D., Smith D, Bulloch K., (1991): Changes in β -Adrenergic Receptor Distribution on Immunocytes During Differentiation: An Analysis of T Cells and Macrophages. *J. Neuroscience Research* 30:328-335

Radolf J.D., Arndt L.L., Akins D.R., Curetty L.L., Levi M.E., Shen Y., Davis L.S., Nogard M. V., (1995): *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and synthetic lipopeptides activate monocytes/macrophages. *J. Immunol.*, 154(6): 2866-2877

Ramer-Quinn D.S., Baker R.A., Sanders V.M., (1997): Activated T helper 1 and T helper 2 cells differentially express the beta-2-adrenergic receptor: a mechanism for

selective modulation of T helper 1 cell cytokine production. *J. Immunol.*, 159(10): 4857-4867

Rincon M., Anguita J., Nakamura T., Fikrig E., Flavell R.A. (1997): Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.*, 185(3):461-469

Rivkin I., Rosenblatt J., Becker E.L., (1975): The role of cyclic AMP in the chemotactic responsiveness and spontaneous motility of rabbit peritoneal neutrophils. The inhibition of neutrophil movement and the elevation of cyclic AMP levels by catecholamines, prostaglandins, theophylline and cholera toxin. *J. Immunol.*, 115(4):1126-34.

Roberts W.K., Vasil A., (1982): Evidence for the identity of murine gamma interferon and macrophage activating factor. *J. Interferon Res.*, 2: 519-532

Rohde T., MacLean D.A., Richter E.A., Kiens B., Pedersen B.K., (1997): Prolonged submaximal eccentric exercise is associated with increased levels of plasma IL-6. *Am. J. Physiol.*, 273: E85-91

Rugiero V., Tavernier J., Fiers W., Baglioni C., (1986): Induction of the synthesis of TNF receptors by IFN-gamma. *J. Immunol.*, 136: 2445-2450

Sanders V.M., Baker R.A., Ramer-Quinn D.S., Kasprowicz D.J., Fuchs B.A., Street N.E., (1997): Differential expression of the beta2-adrenergic receptor by Th1 and Th2 clones: implication for cytokine production and B cell help. *J. Immunol.*, 158(9): 4200-4210

Sato T., Bewtra A.K., Hopp R.J., Nair N., Townley R.G., (1990): Alpha- and beta-adrenergic-receptor systems in bronchial asthma and in subjects without asthma: reduced mononuclear cell beta-receptors in bronchial asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 86: 839-850

Schelmicka-Schorr E., Checinski M., Arnason B.G.W., (1988): Chemical sympathectomy augments the severity of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 17: 347-350

Schelmicka-Schorr E., Kwasniewski M.N., Thomas B.E., Arnason B.G.W., (1989): The β -adrenergic agonist isoproterenol suppresses experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *J. Neuroimmunol.* 25: 203-207

Schlesinger L., Munoz C., Arevalo M., Lopez M., Simon V., Hernandez A., Carreno P., Belmar J., (1994): Depressed immun response in malnourished rats correlates with increased thymic noradrenalin level. *Int. J. Neurosci.*, 77(3-4): 229-236

Seldon P.M., Barnes P.J., Giembycz M.A., (1998): Interleukin-10 does not mediate the inhibitory effect of PDE-4 inhibitors and other cAMP-elevating drugs on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α generation from human peripheral blood monocytes. *Cell Biochem. Biophys.*, 29(1-2):179-201

Sellati T.J., Bouis D.A., Kitchens R.L., Darveau R.P., Pugin J., Ulevitch R.J., Gangloff S.C., Goyert S.M., Nogard M.V., Radolf J.D., (1998): *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and synthetic lipopeptides activate monocytic cells via a CD14-dependent pathway distinct from that used by lipopolysaccharide. *J. Immunol.*, 160(11): 5455-5464

Serkkola E., Hurme M., Palkama T., (1992): Prolonged elevation of intracellular cyclic AMP activates interleukin-1 production in human peripheral blood monocytes. *Scand. J. Immunol.*, 35(2): 203-208

Severn, Rapson N.T., Hunter C.A., Liew F.Y., (1992): Regulation of tumor necrosis factor production by adrenalin and β -adrenergic agonists. *J. Immunol.* 148: 3441-3445

Severn A., Rapson N.T., Hunter C.A., Liew F.Y., (1992): Regulation of tumor necrosis factor production by adrenaline and beta-adrenergic agonists. *J. Immunol.*, 148(11):3441-3445.

Sibley D.R., Benovic J.L., Caron M.G., Lefkowitz R.J., (1987): Regulation of transmembrane signalling by receptor phosphorylation. *Cell*, 48: 913-922

Sims J.E., Giri J.E., Dower S.K., (1994): The two interleukin-1 receptors play different roles in IL-1 actions. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 72: 9-14

Singh U., Millson D.S., Smith P.A., Owen J.J.T., (1979): Identification of beta-adrenergic adrenoceptors during thymocyte ontogeny in mice. *Eur. J. Immunol.* 9: 31-35

Sone S., Orino E., Mizuno K., Yano S., Nishioka Y., Haku T., Nii A., Ogura T., (1994): Production of IL-1 And its receptor antagonist is regulated differently by IFN-gamma and IL-4 in human monocytes and alveolar macrophages. *Eur. Respir. J.*, 7(4): 657-663

Spengler R.N., Chensue S.W., Giacherio D.A., Blenk N., Kunkel S.L., (1994): Endogenous norepinephrine regulates tumor necrosis factor-alpha production from macrophages in vitro. *J. Immunol.*, 152(6):3024-3031

Stahl P.D., (1992): The mannose receptor and other macrophage lectins, *Curr. Opin. Immunol.*, 4:49

Strasser R.H., Ihl-Vahl R., Marquetant R., (1992): Molecular Review, Molecular biology of adrenergic receptors. *J. Hypertens.*, 10:501-506

Suberville S., Bellocq A., Fouqueray B., Philippe C., Lantz O., Perez J., Baud L., (1996): Regulation of interleukin-10 production by beta-adrenergic agonists. *Eur. J. Immunol.*, 26(11): 2601-2605

Titinchi S., Clark B., (1984): Alpha 2-adrenoceptors in human lymphocytes: direct characterisation by [3H]yohimbine binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 31;121(1): 1-7

Tits J.H. van, Michel M.C., Grosse-Wilde H., Happel F.W., Eigler A., Soliman A., Brodde O.-E., (1990): Catecholamins increase lymphocyte β 2-adrenergic receptors via a β 2-adrenergic, spleen-dependent process. *Am. J. Physiol.* 258(1Pt1): E191-E202

Tomeh J.F., Cryer P.E., (1980): Biphasic adrenergic modulation of β -adrenergic receptors in man. *J. Clin. Invest.*, 65: 836-840

Trinchieri G., Gerosa F., (1996): Immunregulation by interleukin-12. *J. Leukoc. Biol.*, 59(4): 505-511

Unkeless J.C., Scigliano E., Freedman V.H., (1988): Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Ann. Rev. Immunol.*, 6: 251

Waal Malefyt R. de, Abrams J., Bennett B., Figdor C.G., de Vries J.E., (1991): Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.*, 174(5):1209-1220

Wahle M., Krause A., Ulrichs T., Jonas D., von Wichert P., Burmester G.R., Baerwald C., (1999): Disease activity related catecholamine reponse of lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 22; 876: 287-296

Weller M., Stevens A., Sommer N., Wietholter H., Dichgans J., (1991): Cerebrospinal fluid interleukins, immunoglobulins, and fibronectin in neuroborreliosis. *Arch. Neurol.*, 48(8): 837-841

Wiegmann K., Muthyala S., Kim D.K., Arnason B.G.W., (1995): Beta-adrenergic agonists suppress chronic/relapsing experimental allergic encephalomyelitis (CREAE) in Lewis rats. *J. Neuroimmunol.*, 56: 201-206

Williams J.M., Peterson R.G., Shea P.A., Schmedtje J.F., Bauer D.C., Felten D.L., (1981): Sympathetic innervation of murine thymus and spleen: evidence for a functional link between the nervous and immune systems. *Brain Res. Bull.*, 6: 83-94

Wittkower E., (1929): Über affektiv-somatische Veränderungen. Die Affektleukocytose. *Klin. Wochenschr.*, 8: 1082

Wolfe B.B., Harden T.K., Molinoff P.B., (1977): In vitro study of beta-adrenergic receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 17: 575-604

Woloski B.M. N.R.J., Smith E. M., Meyer W.J., Fuller G.M., Blalock J.E., (1985): Corticotropin-releasing activity of monokines. *Science Wash. DC* 230: 1035-1037

Wysocki L.J., Sato V.L., (1978): "Panning" for lymphocytes: a method for cell selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 75(6): 2844-2848.

Xiaojing M., Chow J.M., Gri G., Carra G., Gerosa F., Wolf S.F., Dzialo R., Trinchieri G., (1996): The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon-gamma in monocytic cells. *J. Exp. Med.*, 183(1): 147-157

Yukawa, Ukena D., Kroegel C., Chanez P., Dent G., (1990): Beta2-adrenergic receptors on eosinophils, *Am. Rev. Respir. Dis.* 141: 1446-1452

Zembala M., Uracz W., Ruggiero I., Lemmel E.M.,(1982): Isolation of human monocytes by rosetting with antibody coated human erythrocytes and isopycnic gradient centrifugation. *Clin. Immunol.*, 49(1):225-229

Zhong W.W., Burke P.A., Hand A.T., Walsh M.J., Hughes L.A., Forse R.A., (1993): Regulation of cytokine mRNA expression in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages. *Arch. Surg.*, 128(2): 158-163

Zurier R.B., Weissmann G., Hoffstein S., Kammerman S., Tai H.H., (1974): Mechanisms of lysosomal enzyme release from human leukocytes. II. Effects of cAMP and cGMP, autonomic agonists, and agents which affect microtubule function. *J. Clin. Invest.*, 53(1):297-309

9. Anhang

9.1. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A	Adrenalin
ACTH	Adrenocortikotropisches Hormon
ATP	Adenosin Triphosphat
cAMP	Cyclisches Adenosin 3`5`Monophosphat
CD	Cluster of differentiation
cpm	Counts per minute
CRH	Cortikotropin releasing Hormon
DAG	Diacylglycerol
dpm	Desintegrations per minute
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
ELISA	Enzyme-Linked-Immunesorbent-Assay
FACS	Fluorescens-activated-cell-sorting
FSC	Forward scatter
FSS	Ficoll-Separating-Solution
G-Protein	Guanin-Nucleotid-bindendes Protein
GDP	Guanosin Diphosphat
Gn-RH	Gonadotropin releasing Hormon
GTP	Guanosin Triphosphat
HSS	Hanks-Salt-Solution
ICYP	¹²⁵ Iodocyanopindolol
IFN-γ	Interferon-γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
LAF	Lymphozyten-aktivierender-Faktor
LH	Luteinisierendes Hormon
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnetic activated cell sorting
MHC	major histocompatibility complex
NA	Noradrenalin

NK-Zellen	Natürlichen-Killer-Zellen
Osp	Outer surface proteins
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
Prop	Propranolol
RIA	Radioimmunoassay
SSC	Side scatter
Stdabw	Standardabweichung
TGF- β	Transforming growth factor- β
Th-Lymphozyten	Helfer-T-Lymphozyten
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
Urap	Urapidil
ZNS	Zentrales Nervensystem

9.2. Mittelwerte, Standardabweichungen und Anzahl der Messungen

Katecholamineinfluß auf die IL-1-Werte nach Stimulation mit LPS für 4 Stunden.

Adrenalin:	Stim	A5	A5+Prop	A5+Urap	A9	A9+Prop	A9+Urap
Mittelwert%	100	104,9	101,5	119,9	106,3	105	105,4
Standardabw	0	36,4	25,6	38	45,6	33,6	31,5
n	8	8	8	8	8	8	8
Noradrenalin	Stim	NA5	NA5+Prop	NA5+Urap	NA9	NA9+Prop	NA9+Urap
Mittelwert%	100	118,6	119,1	96,5	115,8	128,6	100,7
Standardabw	0	27,3	29,8	33,5	18,6	47	24,7
n	8	8	8	8	8	8	8

Katecholamineinfluß auf die IL-1-Werte nach Stimulation mit LPS für 8 Stunden.

Adrenalin:	Stim	A5	A5+Prop	A5+Urap	A9	A9+Prop	A9+Urap
Mittelwert%	100	95	100,4	93,2	88,1	90,7	90,7
Standardabw	0	14,5	12,2	11,6	12,7	7,6	16
n	8	8	8	8	8	8	8
Noradrenalin	Stim	NA5	NA5+Prop	NA5+Urap	NA9	NA9+Prop	NA9+Urap
Mittelwert%	100	87,8	92,5	90,2	85,5	79,6	85,7
Standardabw	0	16,6	12,5	18,3	11,2	6	8,4
n	8	8	8	8	8	8	8

Katecholamineinfluß auf die IL-1-Werte nach Stimulation mit LPS für 24 Stunden.

Adrenalin:	Stim	A5	A5+Prop	A5+Urap	A9	A9+Prop	A9+Urap
Mittelwert%	100	104,1	102,5	98,4	98,4	92,1	96,8
Standardabw	0	22	37,2	50,3	41,9	32,3	50,4
n	8	8	8	8	8	8	8
Noradrenalin	Stim	NA5	NA5+Prop	NA5+Urap	NA9	NA9+Prop	NA9+Urap
Mittelwert%	100	94,5	97,5	83,5	86,6	75,9	71,8
Standarnabw	0	39,4	35,8	20,6	33,8	33	27,7
n	8	8	8	8	8	8	8

Katecholamineinfluß auf die IL-6-Werte nach Stimulation mit LPS für 4 Stunden.

Adrenalin:	Stim	A5	A5+Prop	A5+Urap	A9	A9+Prop	A9+Urap
Mittelwert%	100	86,5	91,3	79,2	87,4	60,7	91,5
Standardabw	0	18,3	34,7	22,3	9,4	14,8	36,9
n	4	3	4	4	4	4	4
Noradrenalin	Stim	NA5	NA5+Prop	NA5+Urap	NA9	NA9+Prop	NA9+Urap
Mittelwert%	100	121,9	139,8	81,4	123,9	106,6	103,1
Standardabw	0	34	63	52	54,4	8,7	30,4
n	4	4	3	4	4	4	4

Katecholamineinfluß auf die IL-6-Werte nach Stimulation mit LPS für 8 Stunden.

Adrenalin:	Stim	A5	A5+Prop	A5+Urap	A9	A9+Prop	A9+Urap
Mittelwert%	100	76	98,5	77,4	79,7	74,2	97,6
Standardabw	0	23,7	52,2	24,1	19,8	8	51,7
n	7	7	7	7	7	7	7
Noradrenalin	Stim	NA5	NA5+Prop	NA5+Urap	NA9	NA9+Prop	NA9+Urap
Mittelwert%	100	88,2	84,3	76,5	106	70,7	74,5
Standardabw	0	26,8	21	20,2	25,8	30,1	20,5
n	7	7	7	7	7	7	7

Katecholamineinfluß auf die IL-6-Werte nach Stimulation mit LPS für 24 Stunden.

Adrenalin:	Stim	A5	A5+Prop	A5+Urap	A9	A9+Prop	A9+Urap
Mittelwert%	100	98,5	100,8	123,1	81,1	69	76,8
Standardabw	0	33,6	73,9	110,7	34,1	27,6	57,5
n	7	7	7	7	7	7	7
Noradrenalin	Stim	NA5	NA5+Prop	NA5+Urap	NA9	NA9+Prop	NA9+Urap
Mittelwert%	100	100,7	72,9	64,9	81,2	55,8	54,1
Standardabw	0	60,1	33,7	18,9	36	14,6	11,4
n	7	7	7	7	7	7	7

Katecholamineinfluß auf die IL-12-Werte nach Stimulation mit LPS für 24 Stunden.

Adrenalin:	Stim	A5	A5+Prop	A5+Urap	A9	A9+Prop	A9+Urap
Mittelwert%	100	60,5	67,8	48,4	86,5	96,7	91,1
Standardabw	0	23	14,8	15,2	19,9	16,7	7,7
n	5	5	5	5	5	5	5
Noradrenalin	Stim	NA5	NA5+Prop	NA5+Urap	NA9	NA9+Prop	NA9+Urap
Mittelwert%	100	54,4	78,1	50,2	93,8	87,5	89,1
Standardabw	0	20	18,4	12,3	19,9	26,2	22,8
n	5	5	5	5	5	5	5

Katecholamineinfluß auf die IL-1-Werte nach Stimulation mit IFN- γ für 4 Stunden.

Adrenalin:	Stim	A5	A5+Prop	A5+Urap	A9	A9+Prop	A9+Urap
Mittelwert%	100	122,1	98,3	115,7	103,5	103,7	106,5
Standardabw	0	43,4	49,6	45,1	46,8	34,3	12
n	7	7	7	7	7	7	7
Noradrenalin	Stim	NA5	NA5+Prop	NA5+Urap	NA9	NA9+Prop	NA9+Urap
Mittelwert%	100	97	115,8	92,5	125,6	108,7	99
Standardabw	0	35,1	38,7	19,6	54,4	20,2	29,4
n	7	7	7	7	7	7	7

Katecholamineinfluß auf die IL-1-Werte nach Stimulation mit IFN- γ für 8 Stunden.

Adrenalin:	Stim	A5	A5+Prop	A5+Urap	A9	A9+Prop	A9+Urap
Mittelwert%	100	105,9	103,2	97,2	109,4	107	95,3
Standardabw	0	14,8	28,4	18,3	17	14,9	11,4
n	7	7	7	7	7	7	7
Noradrenalin	Stim	NA5	NA5+Prop	NA5+Urap	NA9	NA9+Prop	NA9+Urap
Mittelwert%	100	100,9	88,8	94,2	94,4	83,6	88,1
Standardabw	0	18,8	15,7	11,3	10,6	14,7	12,3
n	7	7	7	7	7	7	7

Katecholamineinfluß auf die IL-1-Werte nach Stimulation mit IFN- γ für 24 Stunden.

Adrenalin:	Stim	A5	A5+Prop	A5+Urap	A9	A9+Prop	A9+Urap
Mittelwert%	100	119	85	91,8	79	67,5	73,8
Standardabw	0	57,7	20	20,8	15	16,5	11,2
n	7	7	7	7	7	7	7
Noradrenalin	Stim	NA5	NA5+Prop	NA5+Urap	NA9	NA9+Prop	NA9+Urap
Mittelwert%	100	91,4	74	84,8	74,3	63,7	61,9
Standardabw	0	15,1	11	12,9	4,7	7,9	11,7
n	7	7	7	7	7	7	7

Katecholamineinfluß auf die IL-6-Werte nach Stimulation mit IFN- γ für 8 Stunden.

Adrenalin:	Stim	A5	A5+Prop	A5+Urap	A9	A9+Prop	A9+Urap
Mittelwert%	100	134	95,9	169,6	95,8	88,7	84,7
Standardabw	0	19	9,3	11,4	34,8	14,5	37
n	3	3	3	3	3	3	3
Noradrenalin	Stim	NA5	NA5+Prop	NA5+Urap	NA9	NA9+Prop	NA9+Urap
Mittelwert%	100	164	93,8	168,7	85	103,8	109,4
Standardabw	0	73	40,6	4,9	60,2	18,5	13,6
n	3	3	3	3	3	3	3

Katecholamineinfluß auf die IL-6-Werte nach Stimulation mit IFN- γ für 24 Stunden.

Adrenalin:	Stim	A5	A5+Prop	A5+Urap	A9	A9+Prop	A9+Urap
Mittelwert%	100	100	57,1	83,6	52,9	32	46,2
Standardabw	0	40	27,8	44	36,7	18,6	16,7
n	4	4	4	4	4	4	4
Noradrenalin	Stim	NA5	NA5+Prop	NA5+Urap	NA9	NA9+Prop	NA9+Urap
Mittelwert%	100	69	30,6	75,6	46,5	50,7	36,9
Standardabw	0	29	22,3	37,9	19,6	18,9	31,2
n	4	4	4	4	4	3	4

Katecholamineinfluß auf die IL-1-Werte nach Stimulation mit Borrelien für 4 Stunden.

Adrenalin:	Stim	A5	A5+Prop	A5+Urap	A9	A9+Prop	A9+Urap
Mittelwert%	100	119,4	150,9	132,6	111,2	153,4	125,1
Standardabw	0	43,7	47,4	54	45,8	66,3	55,2
Noradrenalin	Stim	NA5	NA5+Prop	NA5+Urap	NA9	NA9+Prop	NA9+Urap
Mittelwert%	100	142,1	174,5	148,4	148,4	247	216,1
Standardabw	0	54,2	89	78,4	53,3	179,2	174,9
n	6	6	6	6	6	6	6

Katecholamineinfluß auf die IL-1-Werte nach Stimulation mit Borrelien für 8 Stunden.

Adrenalin:	Stim	A5	A5+Prop	A5+Urap	A9	A9+Prop	A9+Urap
Mittelwert%	100	89,2	111,6	91,7	90,6	133,8	97,8
Standardabw	0	19,6	16,5	34,6	27,2	27,4	27,9
n	8	8	8	8	8	8	8
Noradrenalin	Stim	NA5	NA5+Prop	NA5+Urap	NA9	NA9+Prop	NA9+Urap
Mittelwert%	100	98,3	136,7	126,3	107,4	123,8	118,2
Standardabw	0	15,5	37,3	31,1	21,1	33,8	31,1
n	6	6	6	6	6	6	6

Katecholamineinfluß auf die IL-1-Werte nach Stimulation mit Borrelien für 24 Stunden.

Adrenalin:	Stim	A5	A5+Prop	A5+Urap	A9	A9+Prop	A9+Urap
Mittelwert%	100	106,1	120,4	98,3	95,7	114,4	98,3
Standardabw	0	25,3	35,3	35,2	95,7	114,8	98,3
n	6	6	6	6	6	6	6
Noradrenalin	Stim	NA5	NA5+Prop	NA5+Urap	NA9	NA9+Prop	NA9+Urap
Mittelwert%	100	98,9	114,3	108,1	97,9	104	83,1
Standardabw	0	22,7	25,7	25	26,5	38,3	24,8
n	6	6	6	6	6	6	6

Katecholamineinfluß auf die IL-6-Werte nach Stimulation mit Borrelien für 4 Stunden.

Adrenalin:	Stim	A5	A5+Prop	A5+Urap	A9	A9+Prop	A9+Urap
Mittelwert%	100	119,6	96,6	98,7	67,5	183,4	144,7
Standardabw	0	32,6	42,5	31,3	55,7	173,3	122,3
n	6	5	5	4	5	5	5
Noradrenalin	Stim	NA5	NA5+Prop	NA5+Urap	NA9	NA9+Prop	NA9+Urap
Mittelwert%	100	161,6	107,9	100,9	204,1	219	118
Standardabw	0	78,9	58,5	43,6	198,3	212	64,5
n	6	5	5	5	5	5	5

Katecholamineinfluß auf die IL-6-Werte nach Stimulation mit Borrelien für 8 Stunden.

Adrenalin:	Stim	A5	A5+Prop	A5+Urap	A9	A9+Prop	A9+Urap
Mittelwert%	100	68	108,8	74,8	84,3	96,6	80,2
Standardabw	0	24,8	45	29,5	21,2	26,3	24,3
n	6	6	6	6	6	6	6
Noradrenalin	Stim	NA5	NA5+Prop	NA5+Urap	NA9	NA9+Prop	NA9+Urap
Mittelwert%	100	89,5	104,6	104,5	113	03,2	98,3
Standardabw	0	17,6	24,3	22,8	36	29	28,9
n	6	6	6	6	6	6	6

Katecholamineinfluß auf die IL-6-Werte nach Stimulation mit Borrelien für 24 Stunden.

Adrenalin:	Stim	A5	A5+Prop	A5+Urap	A9	A9+Prop	A9+Urap
Mittelwert%	100	96,4	94,8	80,6	76,9	85,4	80,4
Standardabw	0	31,5	26,4	15,9	19,2	19,5	16
n	6	6	6	6	6	6	6
Noradrenalin	Stim	NA5	NA5+Prop	NA5+Urap	NA9	NA9+Prop	NA9+Urap
Mittelwert%	100	115,8	96,4	102,8	92,1	102,5	93,2
Standardabw	0	26	34	42,9	13,8	35,4	26,9
n	8	8	8	8	8	8	8

Katecholamineinfluß auf die IL-12-Werte nach Stimulation mit Borrelien für 8 Stunden.

Adrenalin:	Stim	A5	A5+Prop	A5+Urap	A9	A9+Prop	A9+Urap
Mittelwert%	100	56,2	97,4	71,8	126,4	137,9	143,9
Standardabw	0	17	24,6	10,5	22,5	31,7	36,1
n	6	6	6	6	6	6	6
Noradrenalin	Stim	NA5	NA5+Prop	NA5+Urap	NA9	NA9+Prop	NA9+Urap
Mittelwert%	100	77,5	146,9	78,1	126,7	130	140,6
Standardabw	0	17,4	29,8	30,8	16	29	33,6
n	6	6	6	6	6	6	6

Katecholamineinfluß auf die IL-12-Werte nach Stimulation mit Borrelien für 24 Stunden.

Adrenalin:	Stim	A5	A5+Prop	A5+Urap	A9	A9+Prop	A9+Urap
Mittelwert%	100	45,8	61,6	41	103	130	109
Standardabw	0	20,1	29,8	23	16,9	65,1	47,2
n	6	6	6	6	6	6	6
Noradrenalin	Stim	NA5	NA5+Prop	NA5+Urap	NA9	NA9+Prop	NA9+Urap
Mittelwert%	100	41,2	83,5	43	91,6	110	99,8
Standardabw	0	18,8	29,3	15	20,8	36,9	34,2
n	6	6	6	6	6	6	6

9.3. Anzahl der gemessenen β -Rezeptoren bei den einzelnen Versuchen

Versuche:	β -Rez-Anzahl:
LPS 2	2867
LPS 3	1995
LPS 5	463
LPS 6	838
LPS 7	744
LPS 8	569
LPS 9	444
LPS 10	1154
Borrelien 1	1421
Borrelien 2	2645
Borrelien 3	2182
Borrelien 4	1104
Borrelien 5	1414
Borrelien 6	1023

Versuche:	β -Rez-Anzahl:
IFN- γ 3	2810
IFN- γ 5	1546
IFN- γ 6	723
IFN- γ 7	951
IFN- γ 8	775
IFN- γ 9	660

Mittelwert	1316,4
Median	1063,5
Min	444
Max	2867
Stdabw.	783
n	20

9.4. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Jakob Baron v. Engelhardt
Geboren am: 11.12.1972 in Heidelberg
Familienstand: ledig
Wohnhaft: Brückenstr.45, 69120 Heidelberg

Schulausbildung:

08.79-07.83 Mönchhof-Grundschule in Heidelberg
08.83-02.84 St. Raphael Gymnasium in Heidelberg
02.84-07.92 Freie Waldorfschule in Lübeck

Studium:

04.93-11.99 Humanmedizin an der Philipps-Universität in Marburg
03.96 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09.-10.97 Famulatur in der Neurologischen Klinik der Columbia University in New York
08.98 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10.98-09.99 Praktisches Jahr am Klinikum der Philipps-Universität Marburg,
Wahlfach: Neurologie
11.99 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktikum:

08.-09.94 Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg bei Professor Dr. Monyer und Professor Dr. Seeburg, Thema: Quantifizierung von Glutamats-Rezeptor-Subtypen im Gehirn von sich entwickelnden Ratten.

Arzt im Praktikum:

- 02.00 Arzt im Praktikum an der Neurologischen Klinik der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Forschungsschwerpunkt: Visualisierung und Charakterisierung von GABAergen und cholinergen Interneuronen im Hippokampus der Maus.

9.5. Die akademischen Lehrer

Amon, Arnold, Aumüller, Aurich, Barth, Basler, Bauer, Baum, Baumgaertel, Beato, Berger, Bertalanffy, Bien, Blankenburg, Braasch, Brilla, Daume, Daut, Doss, Drenckhahn, Effendy, Egbring, Eichborn, Eisele, Elsässer, Eschenbach, Feddersen, Feuser, Fruhsdorfer, Fuhrmann, Ganz, Garten, Geks, Gemsa, Geus, Gieler, Göke, Golenhofen, Gotzen, Gressner, Griss, Happle, Hartmann, Havemann, Herzum, Hesse, Hildebrandt, Hilgermann, Himmelmann, Höffken, Hofmann, Huffmann, Jonas, Joseph, Jungclas, Kaffarnik, Katschinski, Kern, Klein, Kleine, Kleinsasser, Klenk, Klose, Klotter, Knaepler, Koecke, Koolmann, Koop, v. Kraft, Kraus, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuni, Kußmann, Küster, Lang, Lange, Lauer, Lernberg, Lennartz, Leppek, Lill, Loberth, Lorenz, Lütcke, Maisch, Mannheim, Mannherz, Massarat, Mennel, Moll, Moog, Moosdorf, Mueller, Mutters, Netter, Neubauer, Neumann, Neurath, Nies, Noll, Oepen, Oertel, Orth, Peter, Petermann, Pfab, Podszus, Radsak, Rager, Remschmidt, Renz, Richter, Riedmiller, Rinze, Rieger, Rodeck, Rothmund, Rüschoff, Schachtschabel, Schäfer, Schlenzka, Schmidt, Schmidt-Rhode, Schmitz-Moormann, Schneider, Schnorpfeil, Schüffel, Schu, Schuler, Schulz, Schulze, Schwarz, Schwerek, Seyberth, Siegrist, Slenczka, Sprenger, Steiniger, Steinmetz, Stiletto, Straub, Strauer, Stempel, Sturm, Thomas, Unsicker, Vohland, Voigt, Wagner, Walthers, Welcke, Weihe, Werner, Westermann, v. Wichert, Willenbockel, Wolf, Zwiorek

9.6. Danksagung

Herrn Professor Dr. P. von Wichert danke ich für die Überlassung des Themas dieser Dissertation und für Anregungen bei ihrer Durchführung.

Herrn Professor Dr. C. Baerwald sei sehr herzlich für die methodische Anleitung, freundliche Betreuung sowie zahlreiche Gespräche Dank gesagt.

Für seine Hilfsbereitschaft bei der Lösung von praktischen Problemen und der Hilfe bei der Durchführung der FACS-Analyse danke ich sehr Herrn Dr. M. Wahle.

Mein Dank gilt außerdem den Mitarbeitern des Rheumalabors der Universität Marburg und meinem Mitdoktoranden R. Neumann für die außerordentlich freundliche Arbeitsatmosphäre. Herrn M. Schmuck und Herrn R. Neumann bin ich außerdem sehr zum Dank verpflichtet für die Hilfe bei allen wichtigen Lebensfragen.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern für ihre Unterstützung, für ein ausgesprochen sorgfältiges Korrekturlesen und für die Hilfe bei stilistischen Fragen danken.

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel “Der Einfluß von Katecholaminen auf die Interleukinproduktion von Monozyten in vitro” im Med. Zentrum für Innere Medizin unter der Leitung von Herrn Professor Dr. P. v. Wichert ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischem Medizinischem Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.