Einfluss der Monozytentransmigration über pulmonales Kapillarendothel und Alveolarepithel in vitro auf die monozytäre Zytokinproduktion

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Thomas Fischer
aus Laubach

Gießen 2008

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Sonderforschungsbereich 547 „Kardiopulmonales Gefäßsystem“

Leiter:

Prof. Dr. W. Seeger

Gutachter : Prof. Dr. J. Lohmeyer

Gutachter : Prof. Dr. Dr. h.c. W. Gerlich

Tag der Disputation : 14.09.2009

1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis 1

2 Abkürzungen 3

3 Einführung 5

3.1 Fragestellung 9

4 Methoden 10

4.1 Monozytenisolierung 10

4.1.1 Dichtegradientenzentrifugation 10

4.1.2 Monozytenelutriation 11

4.1.3 Monozytennachbehandlung 11

4.2 Zellkultur 12

4.2.1 Kultivierung der Typ II - Alveolarepithelzellen (A549) 12

4.2.2 Kultivierung der Kapillarendothelzellen (HMVEC-L) 13

4.2.3 Vorstimulation der Endo- und Epithelzellen 13

4.3 Transmigrationsexperimente 14

4.3.1 Versuchsablauf der Monozytentransmigration 14

4.3.2 Monozyteninkubation im Bilayersystem 17

4.3.3 Monozytenadhärenz 17

4.4 Nachweisverfahren 18

4.4.1 Zytokinquantifizierung mittels ELISA 18

4.4.2 Duchflusszytometrie 21

4.4.3 Apoptosemessung 22

4.4.4 Intrazelluläre Zytokinmessung 24

4.5 Statistik 25

5 Ergebnisse 26

5.1 Etablierung eines endo-/epithelialen Transmigrationssystems für Monozyten in vitro 26

5.1.1 Transmigrationsrate 26

5.1.2 Einfluss der Migration auf die Monozytenvitalität und Apoptoserate 27

5.2 Einfluss der Transmigration und Adhärenz auf die monozytäre Zytokinsynthese 35

5.2.1 Transmigration 35

5.2.2 Adhärenz 44

5.2.3 Intrazelluläre IL-1β - Konzentration in Monozyten nach Transmigration und Adhärenz 47

6 Diskussion 50

7 Zusammenfassung ____ *56*

8 Abstract ____ *59*

9 Literatur ____ *61*

10 Erklärung ____ *77*

11 Danksagung ____ *78*

12 Lebenslauf ____ *79*

2 Abkürzungen

ABTS	Diammoniumsalz der Diammonium-2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
Aqua dest.	Aqua destillata
AU	Arbitrary units (willkürliche Einheiten)
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL	CC-Chemokine ligand (z.B. CCL2, CCL5 s.u.)
CD	Cluster of differentiation
EAF	Endothelial activating factor
EGF	Epidermal growth factor
ELAM	Endothelial-leukocyte adhesion molecule 1
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FSC	Forward scatter (Vorwärtsstreulicht) s. Durchflusszytometrie
HMVEC-L	Human microvascular endothelial cells (humane pulmonal-mikrovaskuläre Endothelzellen)
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells (humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen)
HSA	Humanes Serumalbumin
HRP-Streptavidin	Horseradish peroxidase conjugated streptavidin (Meerrettichperoxidase konjugiertes Streptavidin)
ICAM	Intercellular adhesion molecule (z.B. ICAM-1)
IFN	Interferon (z.B. IFN-γ)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin (z.B.IL-1β, IL-6, IL-8)

LC	Low cluster
MCP-1 = CCL2	Monocyte chemoattractant protein-1
MFI	Mean fluorescence intensity
MRP	Multidrug resistance-related Proteine
OD	Optical density (Optische Dichte)
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells (periphere mononukleäre Blutzellen)
PBS	Phosphate-buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PE	Phycoerythrin
PS	Phosphatidylserin
RANTES = CCL5	Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler bzw. Fehler des Mittelwertes)
SFM	Serumfreies Medium
SSC	Side scatter (Seitwärtsstreulicht) s. Durchflusszytometrie
TMB	3,3´-5,5´-Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha (Tumornekrosefaktor α)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan oder Trometamol
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VLA	Very late antigen
ZVK	Zentraler Venenkatheter

3 Einführung

Inflammatorische Prozesse in der Lunge sind charakterisiert durch vielfach noch nicht verstandene Interaktionen zwischen ortsständigen Gewebszellen und mobilen Entzündungszellen (Granulozyten, mononukleäre Phagozyten, Lymphozyten) [86, 94]. Seit langem bekannt ist die rasche Invasion von neutrophilen Granulozyten des pulmonalen Kapillarraumes via endo- und epitheliale Barriere in das alveoläre Kompartiment [30], dessen zelluläre Zusammensetzung unter nicht-inflammatorischen Bedinungen zu >90 % aus residenten Alveolarmakrophagen besteht. Auch innerhalb des Monozyten-/Makrophagen-Systems mit zentralen Funktionen in der Phagozytose, Zytokinsekretion und Antigenpräsentation erfolgt ein Austausch des Lungen-residenten Makrophagenpools (Alveolarmakrophagen, interstitielle Makrophagen) durch Migration von zirkulierenden Monozyten aus dem Gefäßbett ins Gewebe, unter Homöostasebedingungen mit sehr langsamer und unter Entzündungsbedingungen mit sehr rascher Kinetik [20, 33, 74].

Die Entzündungsgetriebene Transmigration der Monozyten aus dem pulmonalen Gefäßsystem über das Kapillarendothel, die interstitielle Matrix und die Alveolarepithelzellbarriere in den Alveolarraum wird überwiegend durch das Chemokin CCL2/MCP-1 vermittelt [33, 61, 101, 102] und erfordert eine Vielzahl an Zell-Zell Interaktionen zwischen endo-/epithelialer Barriere und mobilen Entzündungszellen [43, 57, 98, 115]. Lösliche Faktoren wie sezernierte Zytokine/ Chemokine und ihre Rezeptoren sind dabei ebenso maßgeblich beteiligt wie auf der Zellmembran lokalisierte Adhäsionsmoleküle [1, 17, 28, 55, 79, 112].

Die im Blutgefäßsystem zirkulierenden Monozyten stellen mit 4-10% prozentual nur eine Minoritätsfraktion der zirkulierenden Leukozyten dar. Monozyten sind langlebige Zellen mit breitem Differenzierungspotential, deren mittlere Verweildauer in der Zirkulation jedoch nur 12 bis 72 Stunden beträgt bevor sie ins Gewebe auswandern und in Makrophagen mit spezifischen Funktionen entsprechend ihrer Gewebslokalisation ausdifferenzieren. So findet man spezialisierte Gewebsmakrophagen in Knochen, in Leber-, Lungen-, Lymphknoten-, Milzgewebe, im Peritoneum, der Pleura, der Synovia, im perivaskulären Bindegewebe sowie im zentralen Nervensystem. Ihre Fähigkeit zur Erkennung von mikrobiellen Strukturmotiven durch Keimbahn-kodierte „Pattern Recognition“ Rezeptoren, zur Phagozytose und zur Feisetzung inflammatorischer Mediatoren charakterisieren sie einerseits als unspezifische

primäre Abwehrzellen der angeborenen Immunität [107]. Andererseits fungieren sie durch ihre Kapazität zur Antigenprozessierung und -präsentation gegenüber T-Lymphozyten als wichtige Initiatoren adaptiver Immunreaktionen und sind vielfältig in die Abwehr pathogener Erreger wie Viren, Bakterien und Parasiten, insbesondere Mycobacterium tuberculosis, Listeria monocytogenes und Leishmania involviert. Darüber hinaus tragen sie zur Abtötung von Tumorzellen bei [20, 86].

In der Lunge stehen die Organ-residenten Alveolarmakrophagen in direktem Kontakt zu jenen Partikeln und pathogenen Keimen, welche durch den Luftstrom in die Alveole gelangen und vorgeschaltete mechanische Barrieren wie den mucoziliären Apparat sowie den Hustenreflex überwinden [95, 111]. Allerdings existieren eine Reihe von Kontrollmechanismen, unter anderem vermittelt durch Wechselwirkungen mit Alveolarepithelzellen, die eine inadäquate Aktivierung dieser alveolären Wächterzellen verhindern [104].

Zirkulierende Monozyten wandern unter zwei Konstellationen ins Lungengewebe:

1. Konstitutiv zur Regeneration des Organ-residenten Phagozytenpools
2. Entzündungsgetrieben bei pulmonaler Inflammation/Infektion

Insbesondere aufgrund ihrer langsamen Kinetik ist die Monozytenmigration in den Alveolarraum unter Homöostasebedingungen bislang wenig untersucht und die beteiligten Chemokine und Transmigrationswege sind weitgehend unbekannt. Möglicherweise spielt die Fraktalkine/Fraktalkinerezeptor Interaktion hierbei eine Rolle [60]. Eine entscheidende Rolle für die gerichtete Transmigration dieser Zellen über die pulmonale endo-/epitheliale Barriere spielen die CC-Chemokine CCL2/MCP-1 und CCL5/RANTES sowie Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1, die β1-Integrine (VLA-4, -5, -6)- und β2-Integrine (CD11a, CD11b, CD11c, CD18), Selektine, CD47 und MRP 8/14 [18, 21, 27, 33, 37, 74, 78, 92]. Die Beteiligung der oben genannten Moleküle am Migrationsprozess wurde durch entsprechende funktionsblockierende Antikörper oder gendeletierte Tiere bzw. Zellen nachgewiesen. Während der Prozess der endothelialen Leukozytenadhäsion und Chemoattraktion recht gut untersucht ist, ist der Transmigrationsprozess durch die endotheliale Schicht und die darunter liegende Basalmembran noch weitgehend unverstanden [109]. Gleiches gilt für den Einfluss des Transmigrationsvorganges durch die spezielle anatomische Einheit pulmonalkapilläres Endothel/alveoläres Epithel auf den Phänotyp und die Funktion der wandernden Monozyten und die hieran beteiligten molekularen Wechselwirkungen und Signalwege.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, ein in vitro Modell [99] der endo-/epithelialen Schranke der Lunge mit physiologischer Orientierung der Barrierestrukturen zu etablieren, das es erlaubt, die durch den Transmigrationsprozess ausgelösten Veränderungen der

Monozytenfunktion näher zu charakterisieren. Entscheidendes neues, über bisherige in vitro Migrationssysteme in Transwellansätzen hinausgehendes Zielkriterium war hierbei ein präparatives Format, das es ermöglicht die transmigrierten Zellen intakt und in ausreichender Menge zur differenzierten Funktionsanalytik zurückzugewinnen. Die gerichtete Monozytenmigration durch die endo-/epitheliale Barriere wurde in dem in vitro Modell durch einen chemotaktisch wirksamen Gradienten des Chemokins CCL2/MCP-1 induziert, der auch in vivo zentral zur Entzündungs-getriebenen alveolären Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut zur Expansion des ortsständigen alveolären Makrophagenpools beiträgt [9, 62, 72, 73, 84, 117].

Bei pulmonaler Inflammation verändert sich der Phänotyp der endo-/epithelialen Barrierestrukturen insbesondere durch die verstärkte Expression und Funktionsmodulation von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche tiefgreifend [24, 109]. Die Etablierung des in vitro Transmigrationsmodells wurde deshalb so konzipiert, dass Endo- bzw. Epithelzellschichten selektiv mit inflammatorischen Zytokinen vorbehandelt werden konnten, um eine Transmigration von Monozyten unter Entzündungsbedingungen in vitro zu simulieren. Als zentraler Funktionsparameter des inflammatorischen Potenzials von Monozyten wurde die monozytäre Zytokinsynthese, insbesondere die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine Interleukin 1β (IL-1β) und Tumornekrosefaktor α (TNF-α) ausgewählt und hinsichtlich ihrer Veränderung im Rahmen des Transmigrationsprozesses evaluiert. Im Rahmen der pulmonalen Wirtsantwort auf Pathogenbestandteile wie z.B. Endotoxin sind diese beiden Zytokine von zentraler Bedeutung für die Aktivierung der lokalen und systemischen Entzündungreaktion [23, 36]. Auch IL-6 und IL-8 sind integrale Komponenten dieser Zytokinantwort im Rahmen der angeborenen („innate“) Immunantwort und wurden deshalb in ausgewählten Ansätzen ebenfalls quantifiziert [65, 105]. Für neutrophile Granulozyten wurde gezeigt, dass ihre Rekrutierung aus der Zirkulation in die Lunge antiapoptotische Signalwege induziert, die das Überleben dieser Entzündungszellen im Lungengewebe verlängert [15]. Ähnliche Befunde wurden auch in vitro für die Transmigration von neutrophilen Granulozyten durch humane Nabelschnurvenen-Endothelzell-Monolayer und pulmonal endo-/epitheliale Bilayer erhoben [47, 54, 75]. Vor diesem Hintergrund wurde in dem hier untersuchten in vitro Transmigrationsmodell zusätzlich der Einfluss der transendo-/epithelialen Migration auf die Vitalität und Apoptoserate der Monozyten analysiert. Um den Einfluss verschiedener Phasen der Monozyteninteraktion mit der endo-/epithelialen Schranke auf die Zytokininduktion [48, 74, 93, 111] zu diskriminieren, wurde die monozytäre Zytokinproduktion sowohl nach

Monozytenadhärenz an primäre humane pulmonal-mikrovaskuläre Endothelzellen (HMVEC-L) bzw. an die Alveolarepithelzellinie A549 [34, 64] als auch nach transendothelialer, transepithelialer und transendo-/epithelialer Monozytentransmigration erfasst [76, 89]. Die Adenokarzinomzellinie A549 besitzt zentrale Charakteristika von Typ II Lungenalveolarepithelzellen und wurde deshalb wie in zahlreichen anderen Studien als Modellzelle für die alveolarepitheliale Barriere genutzt [16, 29, 56, 96].

3.1 Fragestellung

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit adressierten folgende Fragestellungen:

Welche Transmigrationsrate zeigen Monozyten durch endo-/epitheliale Monolayer- und Bilayersysteme in vitro?

Welchen Einfluss nimmt die Transmigration auf das Apoptoseverhalten sowie die Vitalität der Monozyten?

Welchen Einfluss nehmen Transmigration bzw. Adhärenz auf die monozytäre Synthese der proinflammatorischen Zytokine IL-1β und TNF-α (in einigen Ansätzen auch IL-6, IL-8)?

Beeinflusst die inflammatorische Vorstimulation der Endo-/Epithelzellschichten mit Interleukin 1β die Adhäsions-/Transmigrations-assoziierten Veränderungen der monozytären Zytokinproduktion?

4 Methoden

4.1 Monozytenisolierung

Die in den Experimenten verwendeten Monozyten wurden aus den von Spenderblut nach Separation (Plasma, Erythrozyten-, Thrombozytenkonzentrat) verbliebenen Resten, den sogenannten Buffy coats isoliert, die als nicht mehr für transfusionsmedizinische Indikationen geeigneter Verwurf entsorgt werden und für unsere Arbeitsgruppe vom Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Ein entsprechendes Votum der Ethik-Kommission zur Verwendung dieser Materialien zu Forschungszwecken liegt dem Sonderforschungsbereich 547 „Kardiopulmonales Gefäßsystem“ vor.

4.1.1 Dichtegradientenzentrifugation

Zur Isolierung mononukleärer Zellen (PBMCs) aus den Buffy coats wurden zunächst je 25 ml der Zellsuspension über 25 ml Ficoll-Paque® (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) in 50 ml-Polypropylenröhrchen (Falcon®- nonpyrogenic, Becton Dickinson Labware, Neylan Cedex, Frankreich) geschichtet. Die Auftrennung der Zellfraktionen nach der jeweiligen Sedimentationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Zelldichte erfolgte durch 40-minütige Zentrifugation bei 25 °C und 300 g, ohne die Zentrifuge (Heraeus, Hanau, Deutschland) anschließend aktiv abzubremsen. Durch diesen Vorgang bildet sich eine Interphase, welche die PBMCs enthält [10]. Nach vorsichtigem Abpipettieren der Interphase und Pelletieren der Zellen durch erneute Zentrifugation in Waschpuffer (900 ml Aqua dest. (Baxter S.A., Unterschleißheim, Deutschland), 100 ml $PBS^{-/-}$ (10x), 2 ml Glucose (50%), 10 ml Pyruvat (PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich), 5 ml HSA 20% (Baxter)) erfolgte die durchflusszytometrische Evaluation der Zellen im FACScan® (Becton Dickinson Labware, Kalifornien, USA). Für die weitere Separation wurden Isolate mit geringem Granulozytenanteil sowie hohem Monozytengehalt vorselektiert.

4.1.2 Monozytenelutriation

Die zuvor durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen Zellen wurden nun durch Gegenstromzentrifugation weiter separiert (Elutriator: Beckman Instruments Inc., Palo Alto, USA). Bei dieser Methode wird mittels einer Pumpe ein der Zentripetalkraft der Zentrifuge entgegengesetzter Flüssigkeitsstrom erzeugt, der die in das System zuvor eingebrachte Zellsuspension in einer Kammer sammelt und somit ein Fließgleichgewicht entstehen lässt. Eine schrittweise Erhöhung der Pumpenleistung bzw. des Flusses ermöglicht die fraktionierte Ausschwemmung der Zellen nach der jeweiligen Sedimentationsgeschwindigkeit und damit schließlich die selektive Anreicherung der Monozytenfraktion. Nach Auffangen der Sedimentationsfraktionen in ca. 15 Polypropylenröhrchen (Falcon®- nonpyrogenic, Becton Dickinson Labware, Neylan Cedex, Frankreich) à 50 ml wurden diese Fraktionen durchflusszytometrisch analysiert und die Fraktionen mit den höchsten Anteilen an Monozyten zusammengeführt. Der Monozytenanteil der zusammengeführten und für die Experimente verwendeten Zellsuspension wurde im FACScan® abschließend nochmals bestimmt. Der Monozytenanteil variierte zwischen 87% und 92%.

4.1.3 Monozytennachbehandlung

Nach der Isolierung wurde die Zellsuspension nochmals gewaschen und anschließend in RPMI 1640® – Medium (Invitrogen (ehem.Gibco) GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in einer Konzentration von 5-10 x 10^6 Zellen/ml aufgenommen. Anschließend erfolgte eine vierstündige Inkubation im Brutschrank bei 37°C unter einem CO_2-Gehalt von 5%, um den Einfluss der Isolationsprozedur auf die nachfolgenden Experimente zu reduzieren.

4.2 Zellkultur

Vor Einsatz der Endo- und Epithelzellen in den Versuchen wurden die Kulturansätze hinsichtlich ihrer Zelldichte (geschlossene Monolayerschicht am Boden der Wells) sowie eventueller mikrobieller Kontamination lichtmikroskopisch evaluiert. Das Vorliegen eines physiologischen pH-Wertes wurde mittels eines in den kommerziellen Nährmedien (s.u.) bereits standardmäßig enthaltenen Farbindikators (Phenolrot) kontrolliert.

4.2.1 Kultivierung der Typ II - Alveolarepithelzellen (A549)

Die A549-Zellen (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) wurden in einer Konzentration von 1 x 10^5 Zellen in 3 ml HAM's F12 - Nährmedium (Nutrient Mixture F-12®, Invitrogen (ehem.Gibco) GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in Anwesenheit einer 1% Penicillin-, Streptomycin- und Amphotericin B Lösung sowie 4 mM Glutamin und 10% FCS (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) auf 6-well- (Ultra low cluster, Costar®, Corning Incorporated, Corning, NY, USA), 6-transwell-Kulturplatten (Falcon® - Becton Dickinson Labware, Kalifornien, USA) bzw. in einer Konzentration von 2 x 10^4 Zellen auf 24-well-Kulturplatten (Cellstar®, Greiner Labortechnik GmbH, Solingen, Deutschland) nach vorheriger Trypsinbehandlung (Trypsin, Invitrogen GmbH) aufgetragen.
Die Kulturzeit im Brutschrank unter 37°C und 5% CO_2 betrug 7 bis 8 Tage. Innerhalb dieser Zeit bildeten sich konfluente Einzelzellschichten.

4.2.2 Kultivierung der Kapillarendothelzellen (HMVEC-L)

1 x 10^5 humane pulmonal-mikrovaskuläre Endothelzellen (Clonetics®, BioWhittaker Europe, Apen, Deutschland) wurden auf mit Attachment factor (TEBU GmbH, Offenbach, Deutschland) behandelte 6-well-Kulturplatten in 3 ml serumfreiem Kulturmedium (Human Endothelial-SFM®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) aufgetragen und einen Tag kultiviert.

Die aus Polycarbonatmembranen bestehenden Transwells bzw. Inserts, deren Porengröße 8 µm betrug, erhielten eine Fibronektinbeschichtung (800 µl (10 µg/ml), über 2 h bei 37°C) und wurden mit 3 x 10^5 HMVEC-L - Zellen 24 h in oben genanntem Kulturmedium, welchem 3% FCS zugesetzt wurde, kultiviert. Dabei betrug die Mediummenge in den Wells 2 ml, in den Inserts 1 ml. Dem Medium wurden jeweils die Wachstumsfaktoren EGF (10 ng/ml) und bFGF (20 ng/ml, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) sowie jeweils 1% Penicillin, Streptomycin und Amphotericin B zugesetzt.

4.2.3 Vorstimulation der Endo- und Epithelzellen

Die Vorstimulation der HMVEC-L und A549-Zellen mit IL-1β (Recombinant human IL-1β, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) diente in einigen Versuchsansätzen der Simulation inflammatorisch aktivierter Endo- bzw. Epithelbarrieren. Je nach Versuchskonstellation wurde die Stimulation 4 Stunden vor Beginn der Experimente durchgeführt. IL-1β kam in einer Konzentration von 10 ng/ml zum Einsatz. Kurze Zeit vor Einsetzen der Monozyten wurden die Endo- und Epithelzellen gewaschen.

4.3 Transmigrationsexperimente

4.3.1 Versuchsablauf der Monozytentransmigration

Die Monozytentransmigration erfolgte bei diesem in vitro Modell [99] über physiologisch ausgerichtete kombinierte Endothel- und Epithelzellschichten, im folgenden Bilayer genannt, sowie über Endo- bzw- Epithelzell - Monolayer. Zunächst wurden die mit der jeweiligen Zellart bedeckten Transwells zweimalig mit vorgewärmtem (37°C) Medium (RPMI Medium 1640®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gespült, um Reste des Kulturmediums zu entfernen. Um eine hinreichende Menge transmigrierter Monozyten analysieren zu können wurde ein für Monozyten chemotaktisch wirksamer CCL2/MCP-1-Gradient [61] aufgebaut, da die spontane Transmigration nur gering ausgeprägt war. Hierzu wurde dem Medium im alveolären (d.h. unteren bzw. epithelialen) Kompartiment CCL2/MCP-1 in einer Konzentration von 10 ng/ml zugesetzt. Diese Konzentration ergab sich aus hier nicht dargestellten Vorversuchen und lag innerhalb der durch andere Gruppen verwendeten Konzentrationen (1-100 ng/ml) [66, 72, 94, 106]. Rosseau et al. zeigten einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Transmigrationsraten in einem vergleichbaren epithelialen Transmigrationssystem, in dem CCL2/MCP-1 - Konzentrationen von 0, 1, 10 und 100 ng/ml eingesetzt wurden [94].

Mittels eines unter sterilen Bedingungen eingebrachten Katheters (Cavafix® Certo®, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) konnte die verbleibende Luft des umgedrehten, die Alveolarepithelzellen enthaltenden Transwells abgesaugt werden, sodass eine vollständige, luftblasenfreie Füllung des unteren Kompartimentes mit Medium erreicht wurde (s. Abb. 1).

Nach dem Auftragen der Monozyten-Zellsuspension in das obere Transwell erfolgte die Transmigration über vier Stunden im Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 37°C unter einem CO_2-Gehalt von 5%.

Danach wurden die zuvor transmigrierten Monozyten aus dem unteren Kompartiment entnommen, in der Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) ausgezählt und die Transmigrationsrate aus dem Verhältnis transmigrierter zu eingesetzten Monozyten berechnet.

Die Monozyten wurden anschließend mit Waschpuffer (s. Dichtegradientenzentrifugation) gewaschen und über einen Zeitraum von 16 Stunden im Brutschrank in RPMI Medium 1640®, welches 10% FCS enthielt in 24-well-Kulturplatten kultiviert. Um eine quantitative Aussage bezüglich der anschließenden Messung der monozytär liberierten Zytokinmengen aus den Kulturüberständen mittels ELISA zu ermöglichen, wurde zur Kultur jeweils eine konstante Monozytenzahl pro Mediummenge (1×10^6 /ml) eingesetzt.

Als Kontrolle dienten Monozyten, die in 6-well-Kulturplatten (Ultra low cluster, Falcon®, Becton Dickinson Labware, Kalifornien, USA) unter identischen Bedingungen im Brutschrank kultiviert wurden.

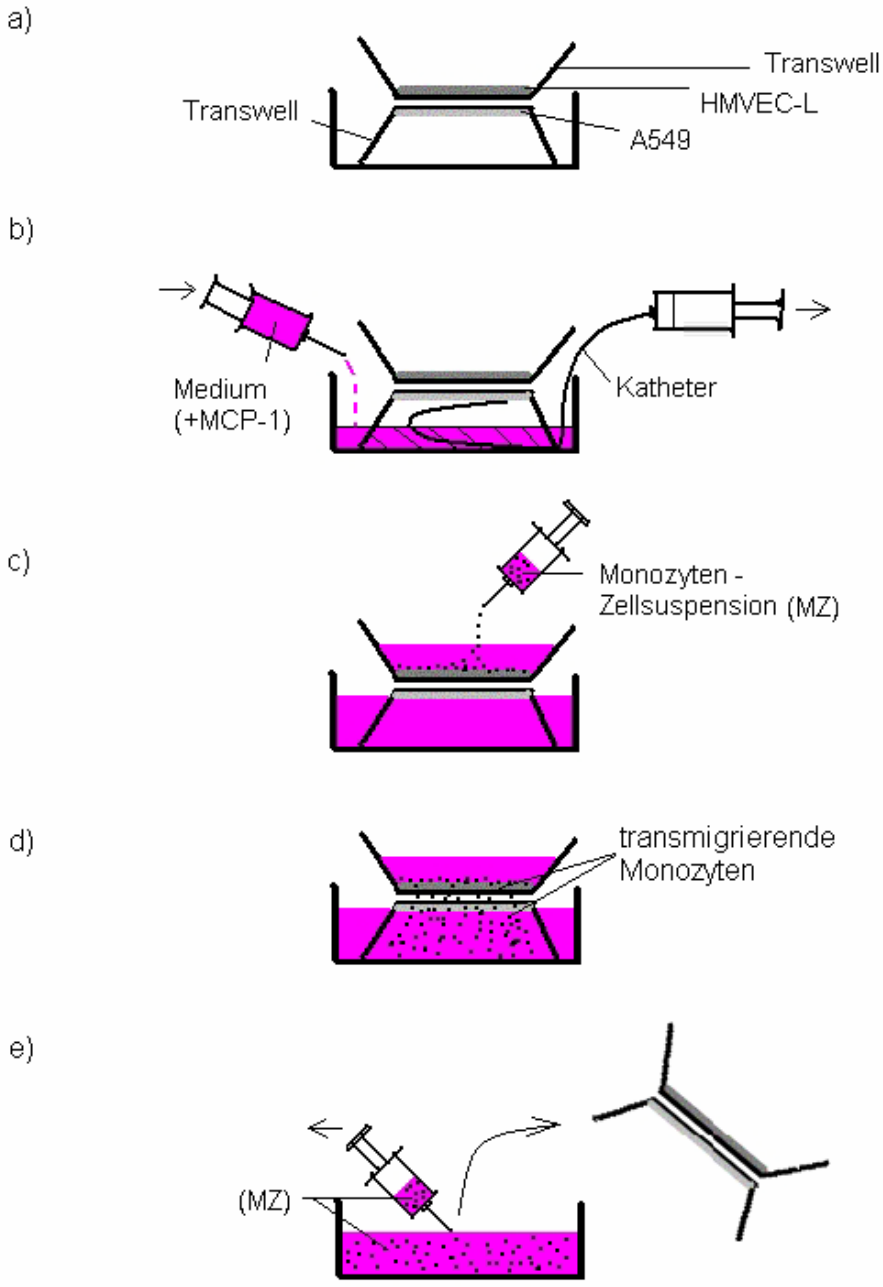


Abb. 1

Vereinfachte schematische Darstellung des Versuchsaufbaus eines endo-/epithelialen Bilayersystems

a) Bilayersystem bestehend aus jeweils endo- bzw. epithelialen Transwells gemäß Schemazeichnung auf Kulturplatten (6-well ultra low cluster) angeordnet

b) Luftblasenfreie Füllung des unteren Kompartimentes mit Medium

c) Einbringen der Monozyten-Zellsuspension

d) Monozytentransmigration über 4h unter Brutschrankbedingungen (37°C, 5% CO_2)

e) Entfernen der Transwells und Entnahme der Monozyten, anschließend 16h Kultur und Zytokinmessung

4.3.2 Monozyteninkubation im Bilayersystem

Die Versuchsanordnung entsprach im Wesentlichen derjenigen der Transmigrationsexperimente und diente der Erfassung von Veränderungen der monozytären Zytokinproduktion im Transwellsystem ohne Transmigration. Die Monozyten wurden hierbei nicht wie im Transmigrationsversuch im oberen Transwellkompartiment (Endothelseite) eingesetzt, sondern mittels eines Katheters direkt in das untere alveoläre Epithelkompartiment eingebracht und dort für 4 h inkubiert.

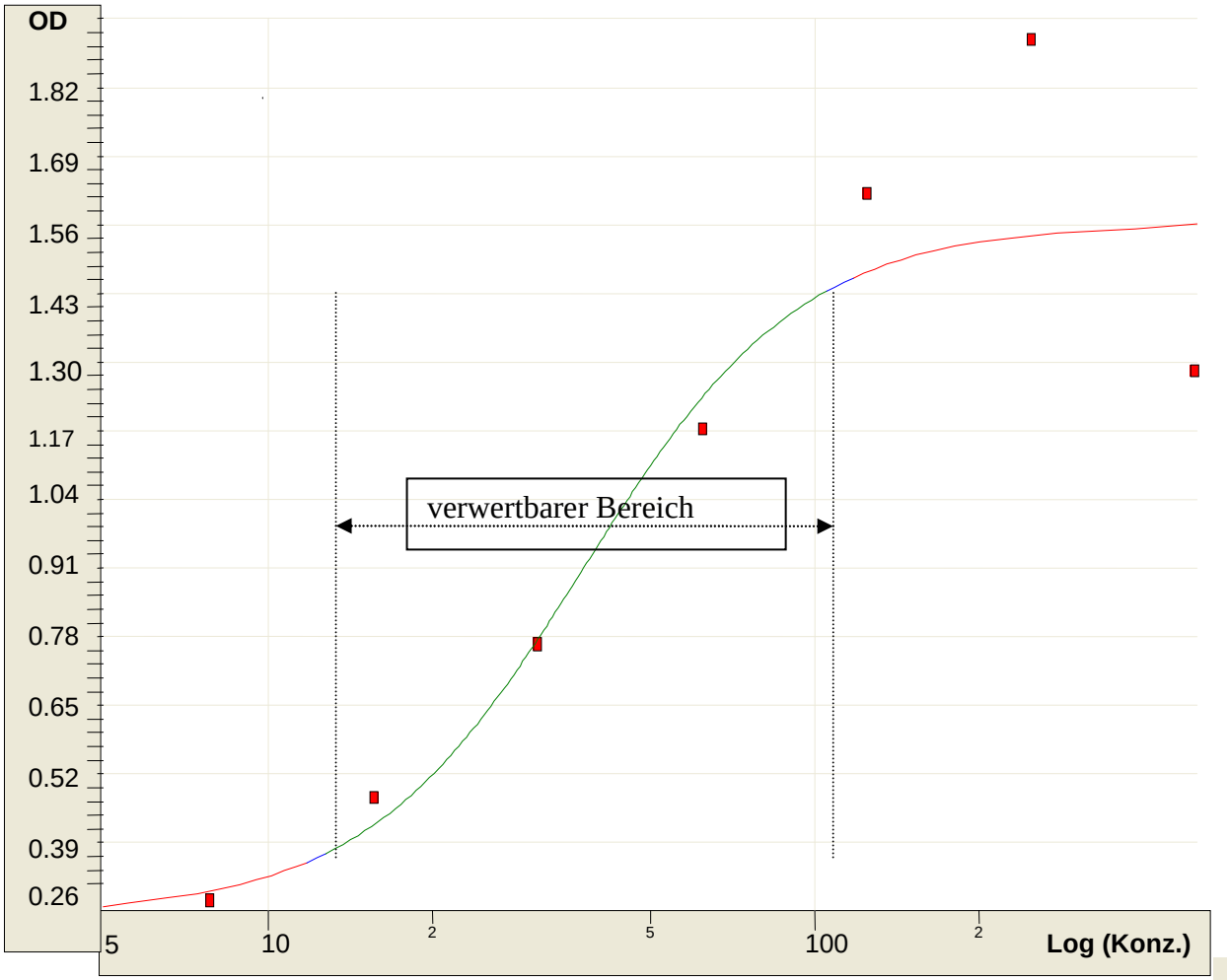
4.3.3 Monozytenadhärenz

Um quantitative Veränderungen der monozytären Zytokinfreisetzung durch den Adhärenzschritt im Rahmen der Transmigration isoliert zu erfassen, wurden die Monozyten in mit Endo- oder Epithel bedeckten 6-well-Kulturplatten eingebracht und für zwei bzw. vier Stunden inkubiert. Anschließend wurden zwei Monozytenfraktionen zurückgewonnen. Die erste Fraktion bestand aus schwach adhärenten Monozyten, die mittels Pipette leicht abgespült werden konnten. Die zweite Fraktion umfasste fest adhärente Monozyten, die sich nur durch mehrfaches Spülen der Wells mit kaltem Medium von der Endo- bzw. Epithelschicht ablösen ließen. Diese zweite Fraktion wurde zur Analyse der adhärenzinduzierten Funktionsänderungen der Monozyten herangezogen. Auch hierbei folgte eine Monozyteninkubation über 16 Stunden unter Brutschrankbedingungen (37°C, CO_2-Gehalt: 5%), um die in diesem Zeitraum produzierten Zytokinmengen anschließend mittels ELISA-Quantifizierung zu erfassen.

4.4 Nachweisverfahren

4.4.1 Zytokinquantifizierung mittels ELISA

Die in den Kulturüberstand freigesetzten Zytokinmengen wurden mit Hilfe kommerzieller ELISA-Kits (Eli-Pair®, Diaclone Research, Besançon, Frankreich und Immunoassay, R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) quantifiziert [40, 71, 91]. Das „Coaten“ der 96-well-Microtiterplatten (400 µl, Nunc-Immunoplate, F96 Maxisorp®, Nalge Nunc International, Roskilde, Dänemark) erfolgte durch Auftragen der in phosphatgepufferter Kochsalzlösung ($PBS^{-/-}$, PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich) verdünnten Capture-Antikörper (Anti human IL-1β/ TNF-α antibody, Diaclone Research, Besançon, Frankreich und Monoclonal anti human IL-6/IL-8 antibody, R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) in Volumina von jeweils 100 µl pro Well. Nach mindestens 12-stündiger Inkubation unter Lichtausschluss und einer Temperatur von 4°C folgte ein zweimaliger Waschvorgang mit ELISA - Waschpuffer (PBS mit 0,05% Polysorbat (Tween) 20 (Sigma, München, Deutschland)) mit jeweils 400 µl/Well mit Hilfe eines maschinellen ELISA-Washers (Columbus, Tecan GmbH, Crailsheim, Deutschland) und das Blockieren der unspezifischen Bindungen der o.g. Antikörper über 2 h bei Raumtemperatur mit je 250 µl Saturation Buffer (1% BSA (Sigma, München, Deutschland) und 5% Saccharose in PBS). Die Vorbereitung der Microtiterplatten war durch eine 24-stündige Trocknung komplettiert. Anschließend wurden die Standards sowie die Proben in definierten Verdünnungen aufgetragen. Diese Verdünnungen wurden durch Verdünnungsreihen ermittelt, um die Konzentrationen der jeweiligen Zytokine in einem optimierten Bereich der ELISA-Standardkurve zu halten und somit die Messgenauigkeit des Verfahrens zu gewährleisten. Akzeptiert wurden hierbei Verdünnungen, welche die Grenzen der ELISA-Readersoftware (MicroWin® V.3.32, Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overrath, Deutschland) nicht über- oder unterschritten (im exemplarischen Kurvenbeispiel als grüner Bereich der Kurve dargestellt (siehe Abb. 2)). Der verwertbare Messbereich lag für IL-1β zwischen 15,6 pg/ml und 500 pg/ml, für TNF-α zwischen 25 pg/ml und 800 pg/ml. Innerhalb dieser Bereiche verlief die photometrisch gemessene Extinktion weitgehend linear und konnte somit verlässlichen Absolutwerten zugeordnet werden [25].



(modifiziert nach MikroWin® Readersoftware)

Abb. 2 Exemplarisches Beispiel einer ELISA-Standardkurve (Kalibrationskurve)

Mittelwerte der Standards in Doppelbestimmung (rote Punkte)

Y-Achse: OD (photometrisch gemessene Extinktion)

X-Achse: Konzentration der Standards in logarithmischer Skalierung

Grüner Anteil der Kalibrationskurve: Konzentrationsbereich mit verwertbarer Messgenauigkeit

Standards und Proben wurden in Diluent Buffer (0,1% BSA, 0,05% Tween 20 in TRIS-NaCl, pH 7,3 (TRIS, Sigma und NaCl 0,9%, Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen, Deutschland)) verdünnt. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

Der biotinylierte Detektionsantikörper (Diaclone Research und R&D Systems Inc.) wurde direkt nach dem Auftragen der Proben in einem Volumen von 50 µl pro Well zugefügt. Nach 3-stündiger Inkubationsdauer unter Raumtemperatur und dreimaligem Waschvorgang mit mindestens 400 µl pro Well folgte die Entwicklung und Auswertung. Hierbei kam HRP-Streptavidin (Zymed®, Invitrogen GmbH) in Diluent Buffer 1:4000 verdünnt zur Anwendung mit 100 µl/Well und anschließender 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligem Waschvorgang wurden bei Bestimmung von IL-1β und TNF-α 100 µl/ Well TMB-Fertiglösung (Eli-Pair® Diaclone Research) und bei IL-6 und IL-8 200 µl/Well ABTS-Lösung (ABTS, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland) zugesetzt. Hierbei wurden 14 mg ABTS zuvor in 21 ml Substratpuffer (8,2 g Na-Acetat-Trihydrat, 6,9 g NaH_2PO_4 x H_2O in 1 l Aqua dest. (Baxter S.A., Unterschleißheim, Deutschland), pH: 4,2) lt. Herstellerprotokoll gelöst und mit 0,03% H_2O_2 aktiviert. Die chemische Reaktion, bei welcher die Peroxidase das Substrat in einer Farbreaktion umsetzt, erfolgte unter Lichtabschluss und wurde nach einer Entwicklungszeit von 15 min bei TMB durch Zugabe von 100 µl 1M H_2SO_4 gestoppt, bei ABTS musste im Anschluss direkt gemessen werden.

Zur photometrischen (450 nm-Filter bei TMB, 405 nm-Filter bei ABTS) Auswertung mit Hilfe eines Plattenphotometers (ELISA-Reader, Molecular Devices GmbH, Ismaning/München, Deutschland) wurde eine kommerziell erhältliche Software (MicroWin®, s.o., Beispielkurve s. Abb.2) verwendet, welche die automatische Berechnung der Standardkurven ermöglichte. Die Absolutwerte der Zytokinkonzentrationen in den zuvor verdünnten Proben wurden nach der Messung manuell entsprechend der jeweiligen Verdünnung berechnet und korrigiert.

4.4.2 Duchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde sowohl bei der Apoptosemessung als auch bei der Messung des intrazellulär gebildeten IL-1β verwendet.

Bei diesem Verfahren ist es möglich aus einer Zellsuspension die darin enthaltenen Zellen anhand der Zellgröße und Zellgranularität zu differenzieren. Nach Markierung der zu untersuchenden Zellen mit geeigneten Fluorochromen ist zusätzlich eine Analyse durch Messung der laserinduzierten Fluoreszenzlichtemission möglich.

Im Durchflusszytometer (FACScan® mit Software Cell Quest® (Version 3.1f), Becton Dickinson, San Jose, Kalifornien, USA) passieren die zu analysierenden Zellen einzeln eine Messkammer, die seitlich von einem Laser (Argon-Ionen-Laser, λ: 488 nm) bestrahlt wird. Dazu wird die Zellsuspension zunächst durch eine Kapillare angesaugt und durch ein Drucksystem in ein zweites Flusssystem mit partikelfreier Grundlösung und anderer Fließgeschwindigkeit eingebracht. Durch diese sogenannte Mantelflüssigkeit (sheath fluid) wird die Zelsuspension in laminarer Strömung hydrodynamisch in Richtung des Lasers bis auf Einzelzellebene fokussiert. Das hierbei entstehende Vorwärtsstreulicht FSC (forward scatter) wird durch Beugung des Lichts hervorgerufen und dient nach Umsetzung in elektrische Impulse durch eine Fotodiode als Maß für die Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht SSC (side scatter) wird durch Brechung des Lichts hervorgerufen und dient als Maß für die Granularität. Die Messung erfolgt wegen der schwächeren Lichtintensität mit einer Foto-Verstärkerröhre (PMT, Photomultipliertube).

Durch Vorschaltung dichroitischer Spiegel, die nur einen Teil des Lichtspektrums reflektieren, den Rest jedoch durchlassen, kann in Kombination mit speziellen Filtern das einfallende Licht nach der Wellenlänge getrennt und eine Aussage über die Fluoreszenzintensität der Zellen getroffen werden wenn diese zuvor, wie in dieser Arbeit bei Apoptosemessung und intrazellulärer IL-1β Messung beschrieben (s. u.), entsprechend mittels Fluoreszenzantikörpern markiert wurden. Eine Verstärkung der relativ schwachen Emissionen wird hier ebenfalls durch PMT bei der Umsetzung in elektrische Impulse erreicht [31, 63, 70].

4.4.3 Apoptosemessung

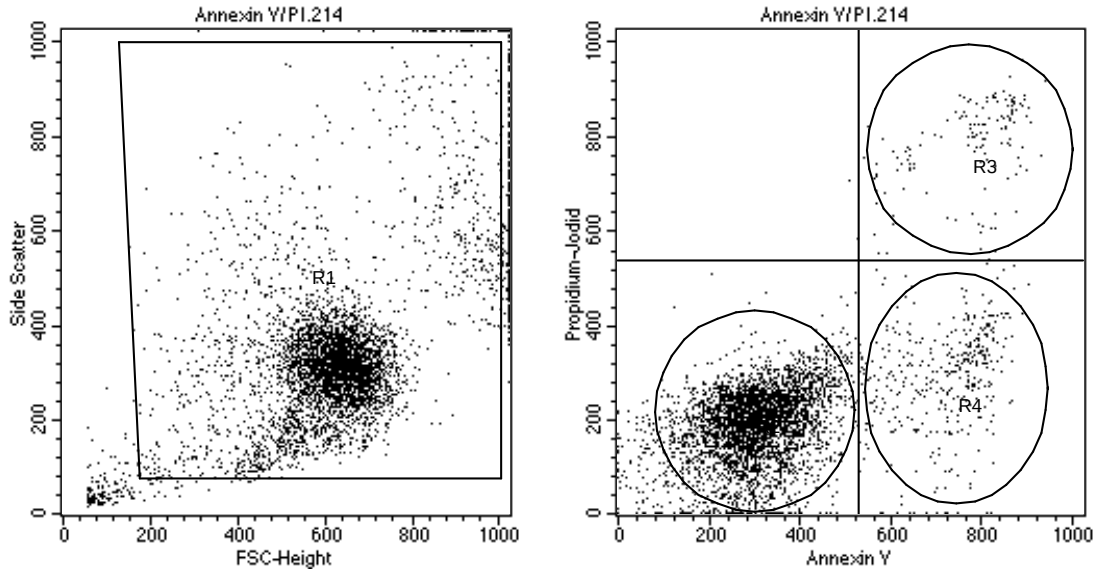
Die Differenzierung der Monozyten in vitale, apoptotische und nekrotische Zellen wurde mittels durchflusszytometrischer Messung mit Hilfe eines auf Annexin-V detektierenden Apoptose-Kits durchgeführt.

Annexin-V ist ein Ca^{2+}-abhängiges Phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität zu Phosphatidylserin (PS). PS, welches normalerweise an der Innenseite der Plasmamembran vitaler Zellen vorkommt, wird bei apoptotischen Zellen auf die äußere Seite der Membran transloziert. Annexin-V kann somit als empfindliche Sonde für die PS-Exposition auf der Membranaußenseite aller exprimierenden apoptotischen Zellen eingesetzt werden.

Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markiertes Annexin-V (Annexin-V-Fluos®, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) bindet an PS und kann im Grünfluoreszenzkanal (Bandpassfilter 515 nm) des Durchflusszytometers detektiert werden. Da nekrotische Zellen aufgrund ihrer verlorenen Membranintegrität auf diese Weise ebenfalls angefärbt werden, können diese durch Gegenfärbung mit Propidiumjodid (Sigma) im Rotfluoreszenzkanal (Bandpassfilter > 560 nm) von apoptotischen Zellen mit intakter Membranintegrität abgegrenzt werden [108].

Ein exemplarisches Beispiel eines Dotplot-Diagrammes stellt Abb.3 dar.

Dieses Verfahren wurde bei jeder Versuchsreihe unter anderem zur Qualitätskontrolle der Monozyten eingesetzt. Ausgehend von einer durchschnittlichen Vitalität von ca. 90% wurden Abweichungen > ±8% als Ausschlusskriterium festgelegt, um die Ausgangssituation der Versuche vergleichbar zu gestalten.



Quadrant Statistics

File: Annexin V/PI.214
Sample ID: Annexin V/PI
Tube:
Gate: G1
Total Events: 5174
Y Parameter: FL3-H Propidium-Jodid (Log)

Log Data Units: Channel Values
Patient ID: vor TM
Acquisition Date: 18-Nov-99
Gated Events: 4482
X Parameter: FL1-H Annexin V (Log)
Quad Location: 532, 534

Quad	% Gated	Y Mean
UL	0.04	645.00
UR	3.19	781.38
LL	88.31	187.24
LR	8.46	286.81

(erstellt mit Cell Quest®-Software)

Abb. 3

Diskriminierung zwischen vitalen, apoptotischen und nekrotischen Monozyten nach Anfärbung mit Annexin V. Exemplarische Darstellung einer durchflusszytometrischen Apoptosemessung (Analyse mittels FACScan®). Kernhaltige Zellen werden mittels Vor- und Seitwärts-Lichtstreuung von Zell-Debris abgegrenzt (linkes Dotplot Diagramm). Vitale Zellen finden sich im linken unteren Quadranten, apoptotische Zellen im rechten unteren Quadranten (R4) und nekrotische Zellen im rechten oberen Quadranten (R3) des rechten Dotplot-Diagramms.

4.4.4 Intrazelluläre Zytokinmessung

Die durchflusszytometrische intrazelluläre Zytokinquantifizierung diente zusätzlich zur mittels ELISA bestimmten Zytokinsekretion der Erfassung der monozytären Zytokinbildung unmittelbar nach Transmigration der Monozyten. Durch diese Methodik werden die Einflüsse der langen Inkubationszeit (16 Stunden) umgangen. Somit ließ sich zeigen, dass die durch Monozyten sezernierten Zytokinmengen in den Kulturmedienüberständen nicht ausschließlich durch Aktivierung der Monozyten während der Kultur zustande kamen.
Die Präparation der Monozyten wurde unter Zuhilfenahme eines kommerziellen Sets (IntraPrep®, Immunotech, Coulter Company, Marseille, Frankreich) durchgeführt. Die Methode wurde in unserem Labor für Monozyten optimiert. Für die durchflusszytometrische Detektion von intrazellulär akkumuliertem IL-1β wurden 2 x 10^5 Monozyten in 5 ml-Polypropylenröhrchen (Falcon®- nonpyrogenic, Becton Dickinson Labware, Neylan Cedex, Frankreich) pipettiert und mit 100 µl der im Set enthaltenen Fixierungslösung (IntraPrep® fixation reagent, 5,5% Formalin) behandelt. Nach 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit 4 ml PBS (PAA Laboratories GmbH) gewaschen und 5 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen resuspendiert. Es folgte die Permeabilisierung der Zellmembran der Monozyten durch Inkubation mit 100 µl PBS gepufferter Saponinlösung mit 0,1% NaN_3, die ebenfalls Bestandteil oben genannten Sets (IntraPrep® permeabilization reagent) war für 5 min bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 10 µl der spezifischen Phycoerythrin (PE)-fluoreszenzmarkierten anti-IL-1β Antikörper (monoclonal IgG_1, anti-IL-1β PE-labeled, R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) bzw. eines Isotypkontrollantikörpers (Becton Dickinson Simultest® Control) wurden die Zellen für weitere 15 min inkubiert. Nach anschließendem zweimaligem Waschen der Zellen standen die Monozyten zur Untersuchung bereit. Die nicht permeabilisierten Zellen wurden mit einer entsprechenden saponinfreien Pufferlösung inkubiert. In der durchflusszytometrischen Analyse wurden jeweils permeabilisierte Proben und Isotypkontrollen mit nicht permeabilisierten Proben verglichen, um eine unspezifische oder extrazelluläre Membranbindung des spezifischen Antikörpers zu detektieren und somit die Messung der intrazellulären Signale zu diskriminieren [51, 87, 97].

4.5 Statistik

Die Daten sind als Mittelwerte +/- Standardfehler (SEM) von n unabhängigen Versuchen dargestellt. Zur Berechnung signifikanter Unterschiede kamen der t-Test, die einfaktorielle Varianzanalyse (One Way Analysis of Variance) und der Bonferroni Test zur Anwendung. Werte von $p<0,05$ wurden als signifikant betrachtet. Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SigmaStat for Windows® Ver.2.03 durchgeführt.

Die unterschiedliche Anzahl (n) vieler durchgeführter Experimente erklärt sich aus dem komplexen Versuchsaufbau, der zum Verwurf einiger Ansätze durch äußere Störungen wie z.B. Kontamination der Kulturen führte. Es wurden jeweils nur die unter einwandfreien Bedingungen abgelaufenen Versuche verwendet.

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung eines endo-/epithelialen Transmigrationssystems für Monozyten in vitro

5.1.1 Transmigrationsrate

Um die Effektivität der CCL2/MCP1-getriebenen Monozytenmigration durch die pulmonal endo-/epitheliale Barriere in vitro zu erfassen, wurden die Transmigrationsraten über endo- bzw. epitheliale Monolayer sowie einen endo-/epithelialen Bilayer durch mikroskopische Zählung der transmigrierten Zellen in der Neubauer-Zählkammer nach 4 Stunden Transmigrationszeit analysiert. Die Transmigrationsrate (Verhältnis transmigrierter zu eingesetzter Monozytenanzahl) lag im Bilayersystem im Mittel bei 17%. Über den pulmonal mikrovaskulären Endothelmonolayer transmigrierten 21% der eingesetzten Monozyten.
Die Monozytentransmigration über den A549 Epithelzellmonolayer lag mit durchschnittlich 47% deutlich höher.

Um zu untersuchen, ob eine inflammatorisch veränderte Barriere die Monozytenmigration beeinflusst, wurde eine Vorstimulation der Endo- bzw. Epithelzellen mit Interleukin-1β durchgeführt. Es zeigte sich nach vierstündiger Vorstimulation der Mono- und Bilayer mit IL-1β in einer Konzentration von 10 ng/ml ein leichter Rückgang der Transmigrationsraten (4% für Bilayer, 3% für Endothel, 8% für Epithel) im Vergleich zu unstimulierten Schranken.

Über A549 Epithel war die Transmigrationsrate nach inflammatorischer Vorstimulation im Vergleich zur Transmigration über pulmonal mikrovaskuläres Endothel bzw. den endo-/ epithelialen Bilayer signifikant erhöht ($p<0,05$, $\alpha=0,05$, One Way Analysis of Variance und Bonferroni Test).
(s. Abb. 4)

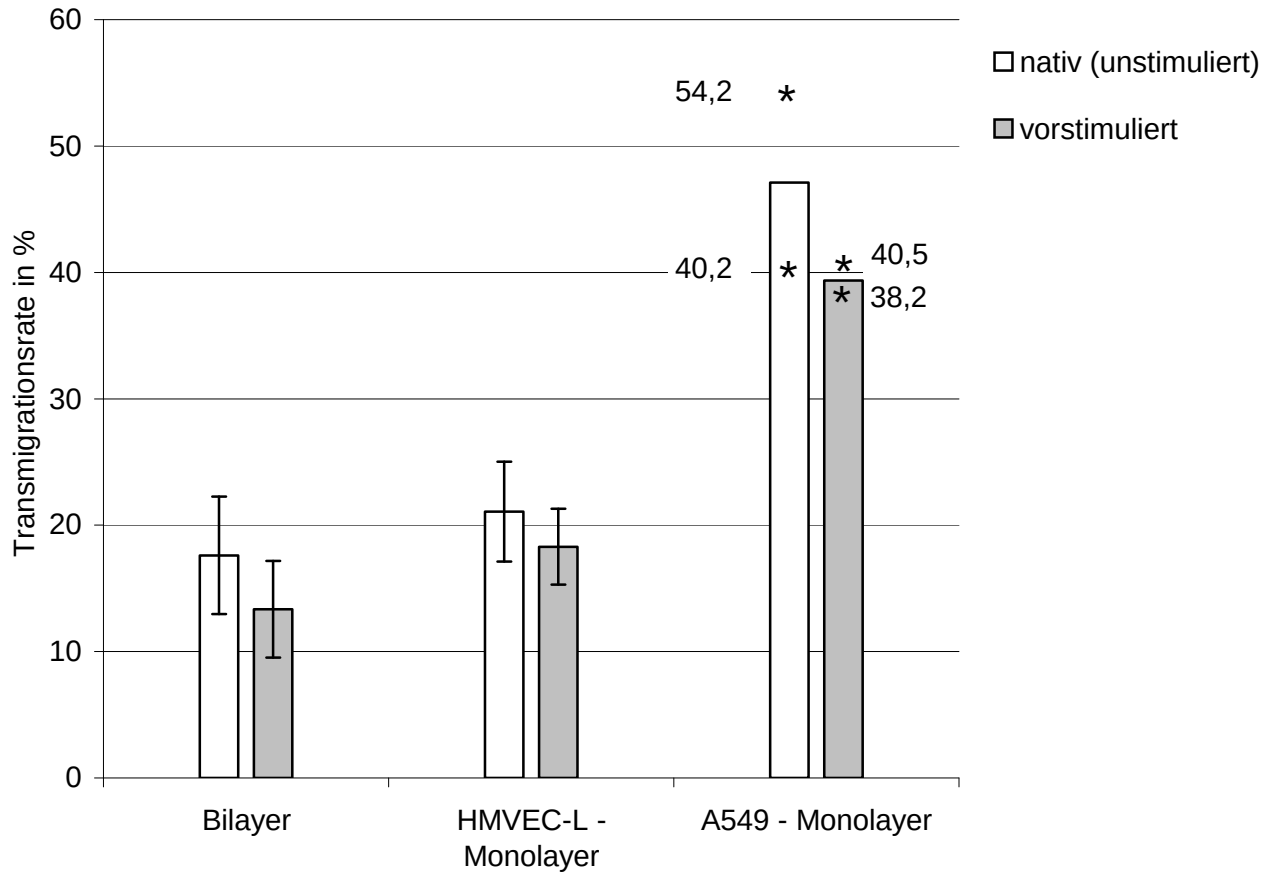


Abb. 4

Quantitative Erfassung der CCL2/MCP-1-getriebenen Monozytenmigration über native (unstimulierte) sowie inflammatorisch mit IL-1β vorbehandelte Endo-/Epithelbarrieren in vitro (CCL2/MCP-1-Konzentration im Well: 10 ng/ml [72, 94]). Mikroskopische Auszählung der transmigrierten Monozyten in der Neubauer-Zählkammer nach 4 h Transmigrationszeit. Mittelwerte der Transmigrationsraten in Prozent +/- SEM der eingesetzten Monozyten aus (Bilayer: n=4, HMVEC-L: n=3) Experimenten. A549-Monolayer: Mittelwerte der Transmigrationsraten in Prozent dargestellt, bei n=2 Versuchen wurden die einzelnen Messwerte als Punkte (⋆) dargestellt.

5.1.2 Einfluss der Migration auf die Monozytenvitalität und Apoptoserate

Um den Einfluss der Transmigration auf die Vitalität und Apoptoserate der Monozten zu erfassen, wurden die Zellen vor und nach Transmigration durchflusszytometrisch in vitale, apoptotische und nekrotische Zellen mittels Propidiumjodid und Annexin-V-Färbung differenziert.

Vor der Transmigration betrug der Anteil vitaler Monozyten 90%. Apoptoseeigenschaften zeigten 5% der Zellen, der Anteil nekrotischer Zellen betrug ebenfalls 5% (s. Abb. 5).

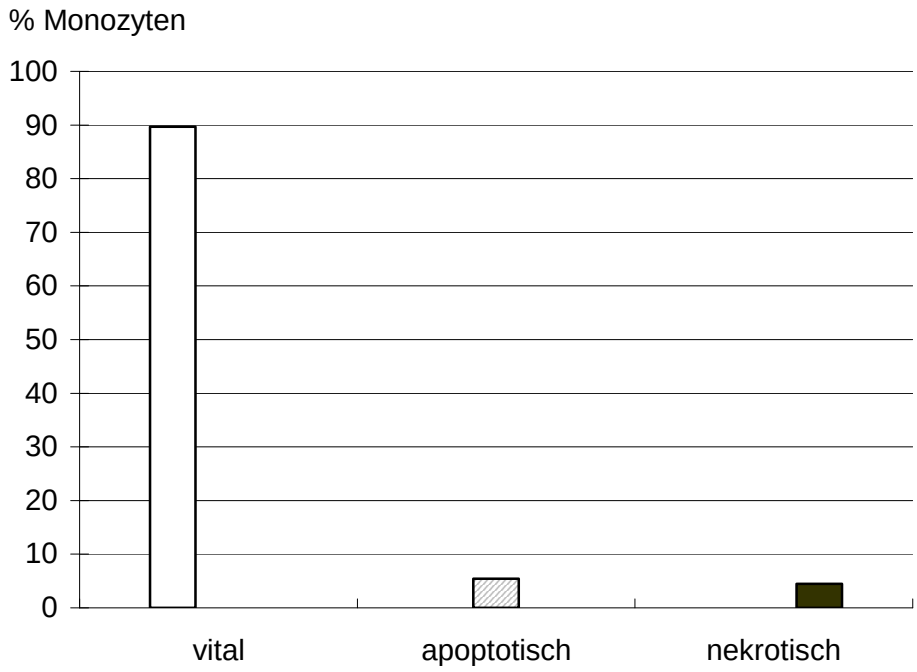


Abb. 5

Anteil vitaler, apoptotischer und nekrotischer Monozyten vor Transmigration (Ausgangspopulation). Durchflusszytometrische Analyse nach Propidiumjodid und Annexin-V-Färbung. Mittelwerte in Prozent (SEM < +/- 0,7%) der Ausgangspopulation aus n=7 Messungen.

Nach Bilayertransmigration und anschließender 16-stündiger Kultur kam es zu einer Reduktion des Anteils vitaler Zellen im Vergleich zur Ausgangspopulation um 18% auf 72%.

Die Vorstimulation des Bilayers mit IL-1β veränderte die Vitalitätsparameter der transmigrierten Zellen nicht nennenswert. Demgegenüber lag der Anteil vitaler Monozyten mit im Mittel 52% in der Kulturkontrolle ohne Transmigration (4 h mit CCL2/MCP-1 in „low cluster plates“ inkubierte und anschließend für 16 h kultivierte Monozyten) tendenziell niedriger. Die Apoptoserate war in der Kontrolle mit 27% versus 17% nach Bilayertransmigration entsprechend höher, der Anteil nekrotischer Monozyten war in der Kontrolle mit 20% doppelt so hoch im Vergleich mit der Monozytenpopulation nach Transmigration (s. Abb. 6).

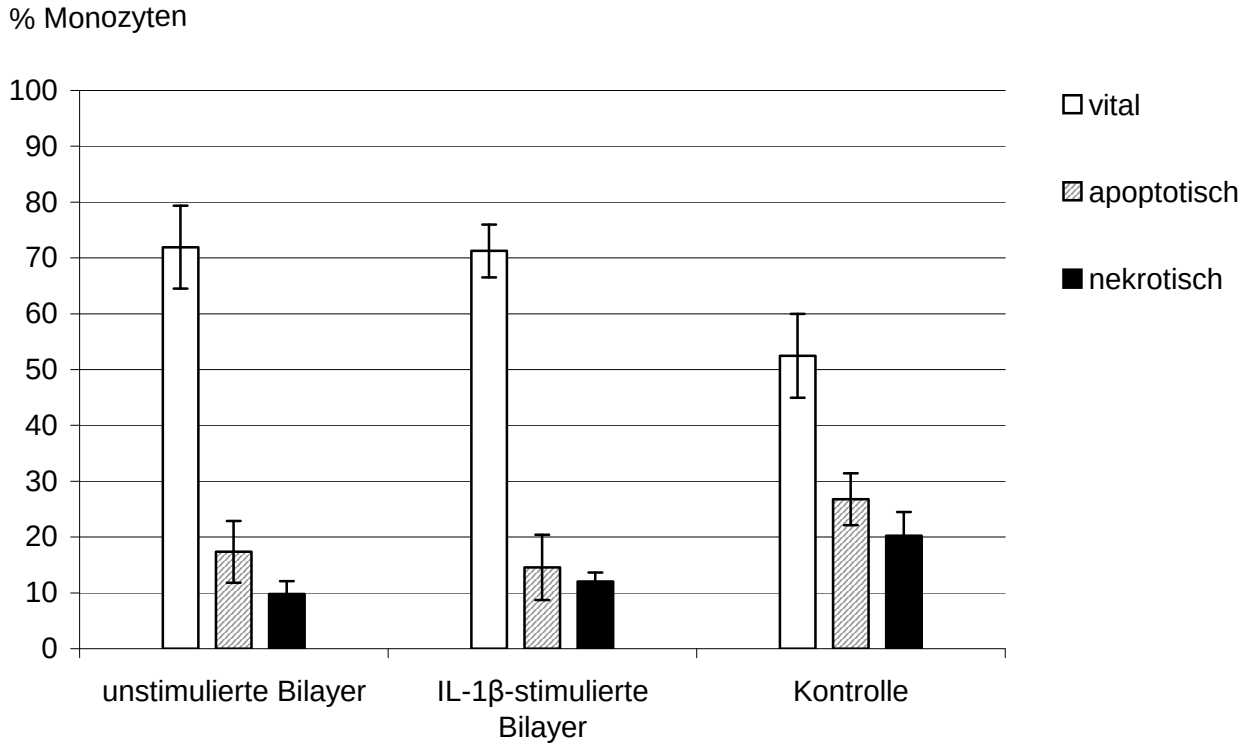


Abb. 6

Prozentualer Anteil vitaler, apoptotischer und nekrotischer Monozyten nach Transmigration durch einen endo-/epithelialen Bilayer. Durchflusszytometrische Analyse nach Propidiumjodid und Annexin-V-Färbung der Monozyten nach 4 h Transmigration über unstimulierte (native) sowie mit IL-1β (10 ng/ml) vorstimulierte Bilayer und anschließender 16-stündiger Kultur. Als Kontrolle dienten Monozyten, die 4 h mit CCL2/MCP-1 in „low cluster plates" inkubiert und anschließend für 16 h kultiviert wurden. Mittelwerte in Prozent +/- SEM der Gesamtpopulation aus n=4 Experimenten.

Unter gleichen Bedingungen reduzierte sich im A549-Monolayermodell der vitale Anteil der Monozyten um 29% im Vergleich zur Ausgangssituation vor der Transmigration und lag damit bei 61%. Die IL-1β-Vorstimulation des Epithelmonolayers ergab eine etwas höhere Vitalität mit einem Anteil von 69%.

Wie im Bilayerexperiment war der Anteil vitaler Monozyten in der Kulturkontrolle ohne Transmigration (4 h mit CCL2/MCP-1 in „low cluster plates" inkubierte und anschließend für 16 h kultivierte Monozyten) mit 55% niedriger. Der Anteil apoptotischer Monozyten nach Transmigration lag bei 14%, nach IL-1β–Vorstimulation nur bei 10% im Vergleich zu 17% in der Kontrolle. Nekrose zeigten 21% der Zellen, nach IL-1β - Stimulation 18% versus 25% in der Kontrolle (s. Abb. 7).

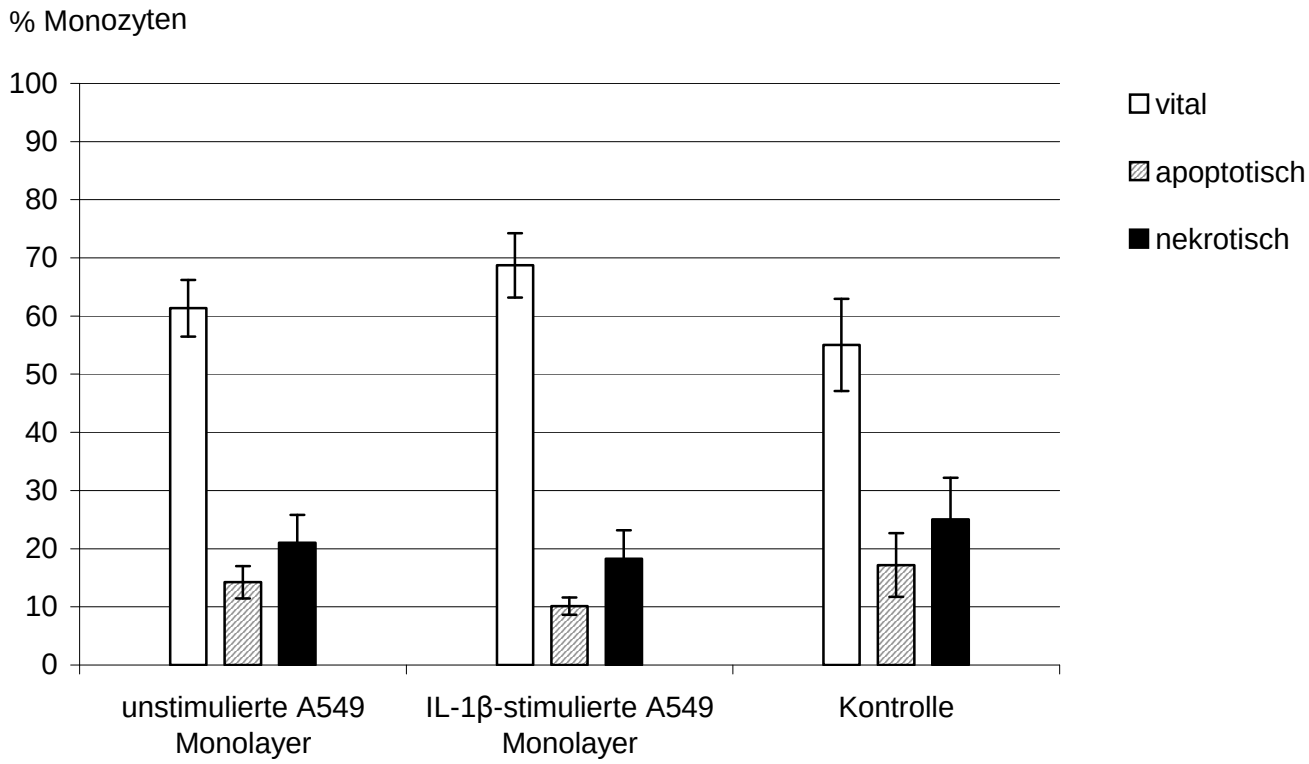


Abb. 7

Prozentualer Anteil vitaler, apoptotischer und nekrotischer Monozyten nach Transmigration durch einen epithelialen A549 Monolayer. Durchflusszytometrische Analyse nach Propidiumjodid und Annexin-V-Färbung der Monozyten nach 4 h Transmigration über unstimulierte (native) sowie mit IL-1β (10 ng/ml) vorstimulierte A549 Monolayer und anschließender 16-stündiger Kultur. Als Kontrolle dienten Monozyten, die 4 Stunden mit CCL2/MCP-1 in „low cluster plates" inkubiert und anschließend für 16 h kultiviert wurden. Mittelwerte in Prozent +/- SEM der Gesamtpopulation aus n=3 Experimenten.

Im HMVEC-L-Monolayermodell lag der Anteil vitaler Zellen nach Transmigration bei 65%. Mit einem Anteil von 79% vitaler Zellen zeigte sich ein Anstieg um 14% nach IL1-β-Vorstimulation der Endothelzellen. Mit 47% vitaler Monozyten waren auch hier die Unterschiede zur Kontrolle statistisch nicht signifikant. Der Anteil apoptotischer Monozyten lag nach Transmigration ohne Vorstimulation bei 11%, nach IL-1β – Vorstimulation der Monolayer bei 8% gegenüber 12% in der Kulturkontrolle. Auffälliger war der Vergleich der nekrotischen Monozyten, wobei sich in der Kontrolle 39% im Gegensatz zu 22% bzw. 10% (IL-1β–vorstimuliert) nach Transmigration über HMVEC-L-Monolayer fanden (s. Abb. 8).

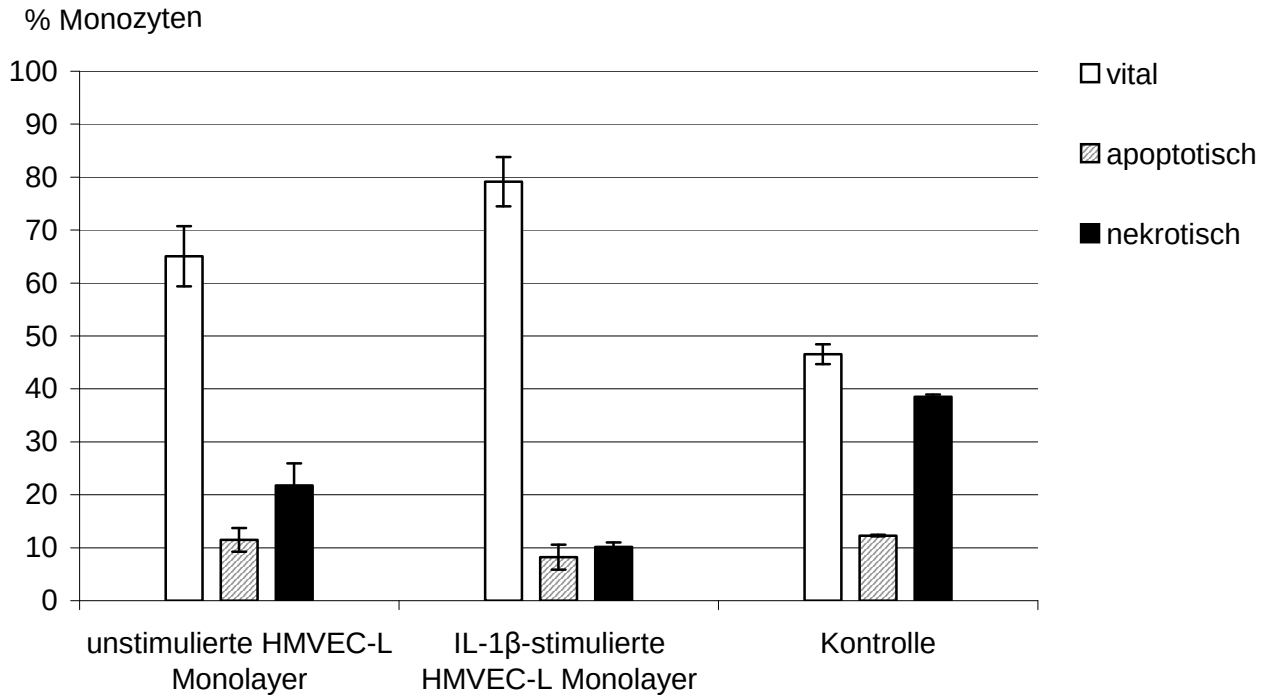


Abb. 8

Prozentualer Anteil vitaler, apoptotischer und nekrotischer Monozyten nach Transmigration durch einen endothelialen HMVEC-L-Monolayer. Durchflusszytometrische Analyse nach Propidiumjodid und Annexin-V-Färbung der Monozyten nach 4 h Transmigration über unstimulierte (native) sowie mit IL-1β (10 ng/ml) vorstimulierte HMVEC-L-Monolayer und anschließender 16-stündiger Kultur. Als Kontrolle dienten Monozyten, die 4 h mit CCL2/MCP-1 in „low cluster plates" inkubiert und anschließend für 16 h kultiviert wurden. Mittelwerte in Prozent +/- SEM der Gesamtpopulation aus n=2 Experimenten.

Der in allen Transwellansätzen reproduzierbare Befund eines tendenziell höheren Anteils vitaler Zellen (bzw. niedrigeren Anteils apoptotischer und nekrotischer Zellen) in der transmigrierten Population im Vergleich zu Monozyten, die lediglich mit CCL2/MCP1 kultiviert wurden, führte zu den folgenden Fragestellungen:

1. Werden durch den Migrationsvorgang antiapoptotische Prozesse induziert, die zu einer höheren Vitalität der transmigrierten Monozyten im Vergleich zu lediglich kultivierten Kontrollen führen?

2. Werden beim Transmigratiosvorgang Monozyten mit hoher Vitalität/niedriger Apoptoserate in der transmigrierten Zellfraktion selektioniert?

Um die Anteile vitaler, apoptotischer und nekrotischer nicht-transmigrierten Monozyten im Vergleich zu transmigrierten Monozyten innerhalb eines Transwellansatzes zu erfassen, wurden die nach 4 h Transmigrationszeit im oberen Kompartiment (Insert) verbliebenen Monozyten mit den im unteren Kompartiment (Well) akkumulierten, transmigrierten Zellen verglichen.

Es wurde nur die Monozytenmigration über einen A549-Monolayer unter diesem Aspekt in einem Einzelexperiment analysiert (s. Abb. 9, Abb. 10).

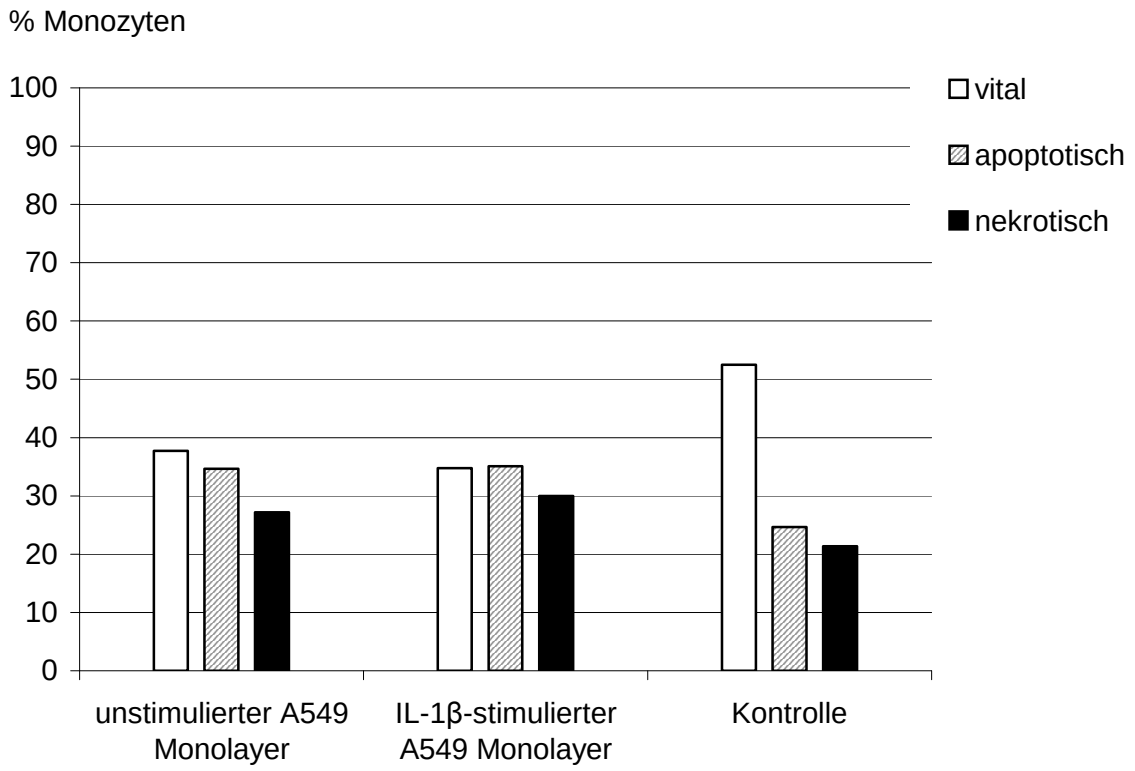


Abb. 9

Prozentualer Anteil vitaler, apoptotischer und nekrotischer Monozyten in der nicht-migrierten, nach dem Transmigrationsversuch im Transwell-Insert verbliebenen Zellpopulation. Durchflusszytometrische Analyse nach Propidiumjodid und Annexin-V-Färbung der aus den „Inserts“ entnommenen Monozytenfraktion. 4 h Transmigrationsexperiment über unstimulierte (native) sowie mit IL-1β (10 ng/ml) vorstimulierte A549-Monolayer. Als Kontrolle dienten Monozyten, die 4 h mit CCL2/MCP-1 in „low cluster plates“ inkubiert wurden. Angabe in Prozent der Gesamtpopulation. Einzelexperiment.

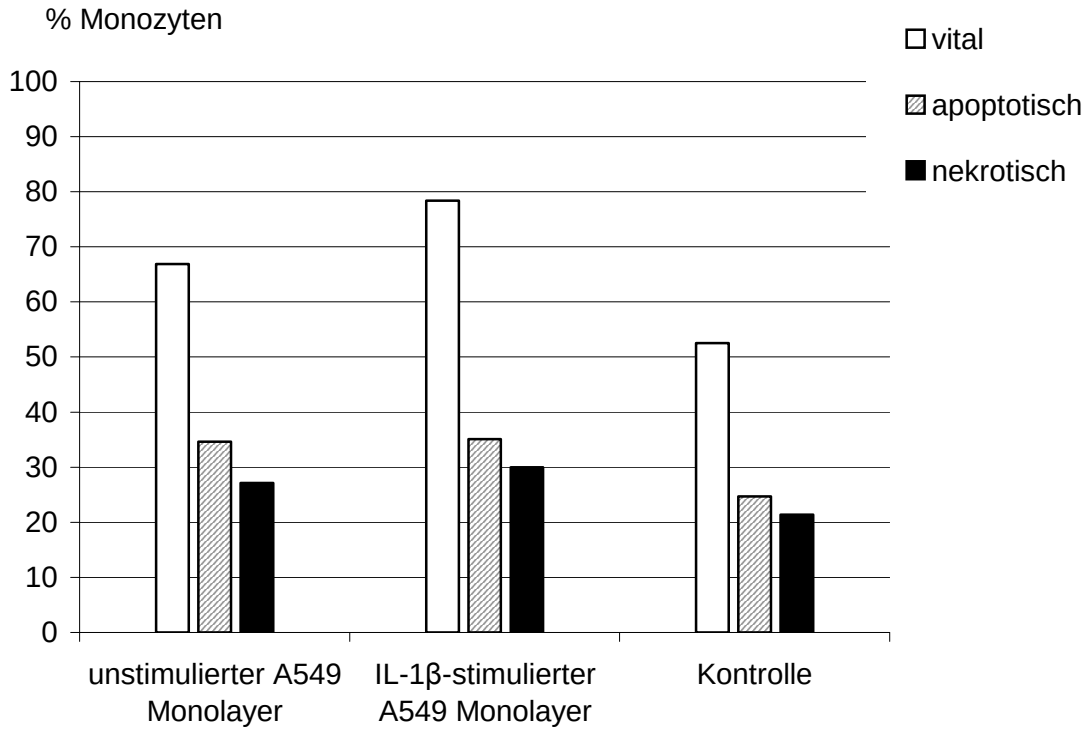


Abb. 10

Prozentualer Anteil vitaler, apoptotischer und nekrotischer Monozyten in der migrierten, nach dem Transmigrationsversuch im „Well" befindlichen Zellpopulation. Durchflusszytometrische Analyse nach Propidiumjodid und Annexin-V - Färbung der aus den „Wells" entnommenen Monozytenfraktion. 4 h Transmigrationsexperiment über unstimulierte (native) sowie mit IL-1β (10 ng/ml) vorstimulierte A549-Monolayer. Als Kontrolle dienten Monozyten, die 4 h mit CCL2/MCP-1 in „low cluster plates" inkubiert wurden. Angabe in Prozent der Gesamtpopulation. Einzelexperiment.

In diesem Transmigrationsexperiment zeigte sich ein deutlicher Unterschied in den Vitalitätsparametern zwischen transmigrierten und im oberen Transwellkompartiment verbliebenen Monozyten. Die transmigrierten Zellen zeigten einen höheren Anteil vitaler Monozyten (67%) im Gegensatz zu den nicht-transmigrierten Monozyten im oberen Transwellkompartiment (Anteil vitaler Zellen: 38%).

Um zu differenzieren, ob sich lebende Zellen im unteren Transwellkompartiment und tote Zellen im oberen Kompartiment lediglich selektiv anreichern oder ob die Transmigration aktiv antiapoptotische Prozesse in den transmigrierten Zellen induziert, wurde die Vitalität der Zellen im Gesamtsystem (Insert und Well) erfasst und mit der Kontrolle nicht-transmigrierter Zellen in Low-cluster Kultur verglichen.

In der Low-cluster Kontrolle fand sich ein vergleichbarer Anteil vitaler Monozyten wie im Gesamt-Transwellansatz (52% vitale Monozyten im Transmigrationsansatz versus 53% in der

Kontrolle). Dies spricht gegen einen ausgeprägten antiapoptotischen Effekt durch den Transmigrationsprozess (Apoptoseanteil 27% im Transmigrationsansatz vs. 25% in der Kontrolle). Eher ist davon auszugehen, dass die unterschiedliche Vitalität der Monozytenpopulationen im oberen und unteren Kompartiment des Transwells vorwiegend durch die präferentielle Migration vitaler Zellen zustande kommt (s. Abb. 11).

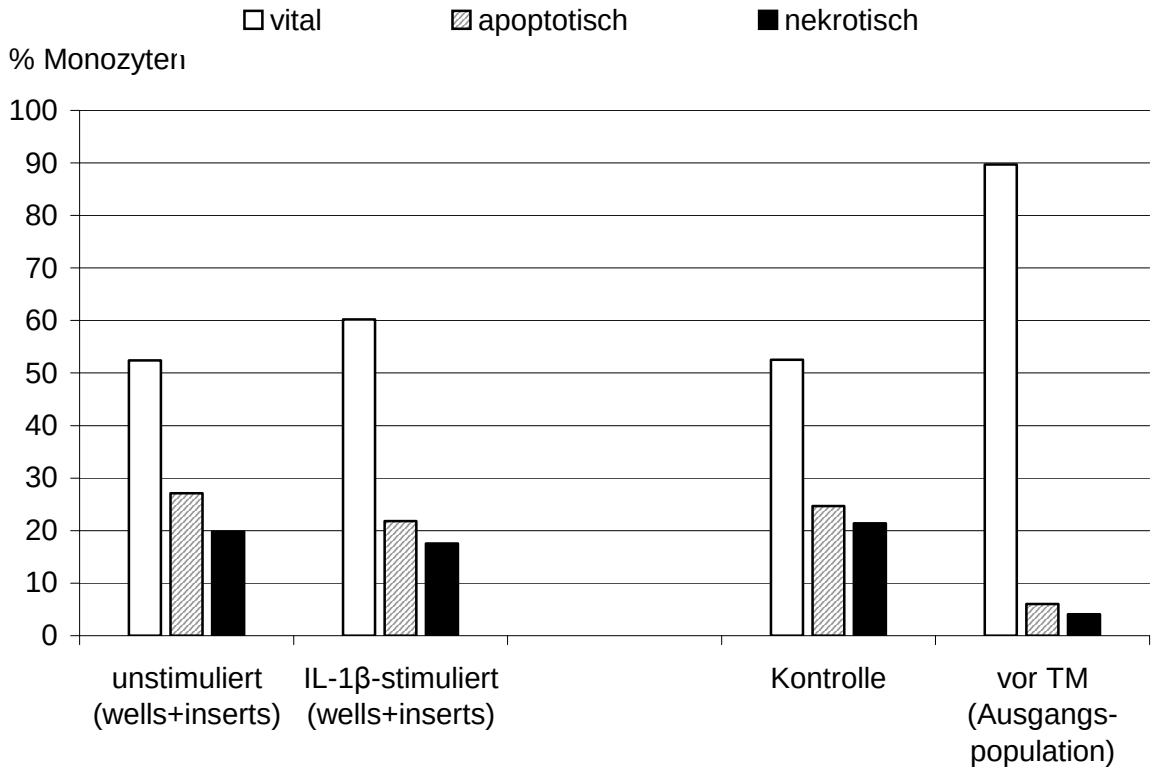


Abb. 11

Prozentualer Anteil vitaler, apoptotischer und nekrotischer Monozyten im gesamten Transwellansatz (Inserts plus Wells) im Vergleich zur „Low Cluster" Kulturkontrolle und zur Ausgangspopulation vor Transmigration (TM). Durchflusszytometrische Analyse nach Propidiumjodid und Annexin-V-Färbung der aus den „Inserts" bzw. „Wells" entnommenen Monozytenfraktion. 4 h Transmigrationsexperiment über unstimulierte (native) sowie mit IL-1β (10 ng/ml) vorstimulierte A549 Monolayer. Als Kontrolle dienten Monozyten, die 4 h mit CCL2/MCP-1 in „low cluster plates" inkubiert wurden. Angabe in Prozent der Gesamtpopulation. Einzelexperiment.

5.2 Einfluss der Transmigration und Adhärenz auf die monozytäre Zytokinsynthese

5.2.1 Transmigration

Monozyten wurden vor und nach Transmigration über einen endo- oder epithelialen Monolayer oder einen endo-/epithelialen Bilayer, im Folgenden auch als Barrieren bezeichnet, hinsichtlich ihrer Zytokinsynthese untersucht. Hierzu wurden die Ausgangsmonozytenpopulation und die transmigrierten Monozyten über einen Zeitraum von 16 Stunden kultiviert und die liberierten Zytokine im Kulturüberstand mittels ELISA quantifiziert.

Nach Migration durch einen endo-/epithelialen Bilayer zeigten die transmigrierten Monozyten eine signifikant höhere Synthese der inflammatorischen Zytokine TNF-α und IL1-β als die Ausgangspopulation.

Im Vergleich zur Low-cluster Kontrolle, die als Basalwert verwendet wurde, erhöhte sich die IL-1β - Synthese um den Faktor 2,2. Die TNF-α - Produktion stieg um das 2,4-fache. Durch vierstündige Vorstimulation der Endo- bzw. Epithelzellen mit IL-1β erhöhte sich die monozytäre TNF-α - Produktion um den Faktor 6,2. IL-1β stieg nach endo-/epithelialer Vorstimulation um das 6,9-fache gegenüber der Kontrolle an (s. Abb. 12).

Die Darstellung einer x-fachen Steigerung der Zytokinmenge nach Transmigration bezogen auf die Kontrolle wurde verwendet, um die innerhalb der einzelnen Experimente konsistenten Steigerungen miteinander zu vergleichen, da die Absolutwerte der Zytokinmengen zwischen den Ansätzen auf zum Teil erheblich unterschiedlichem Niveau lagen. So lagen die als Basalwert definierten und auf x=1 normierten Zytokinmengen in der Kontrolle zwischen 9 pg/ml - 515 pg/ml im Falle des Zytokins IL-1β und zwischen 141 pg/ml - 2331 pg/ml bei TNF-α.

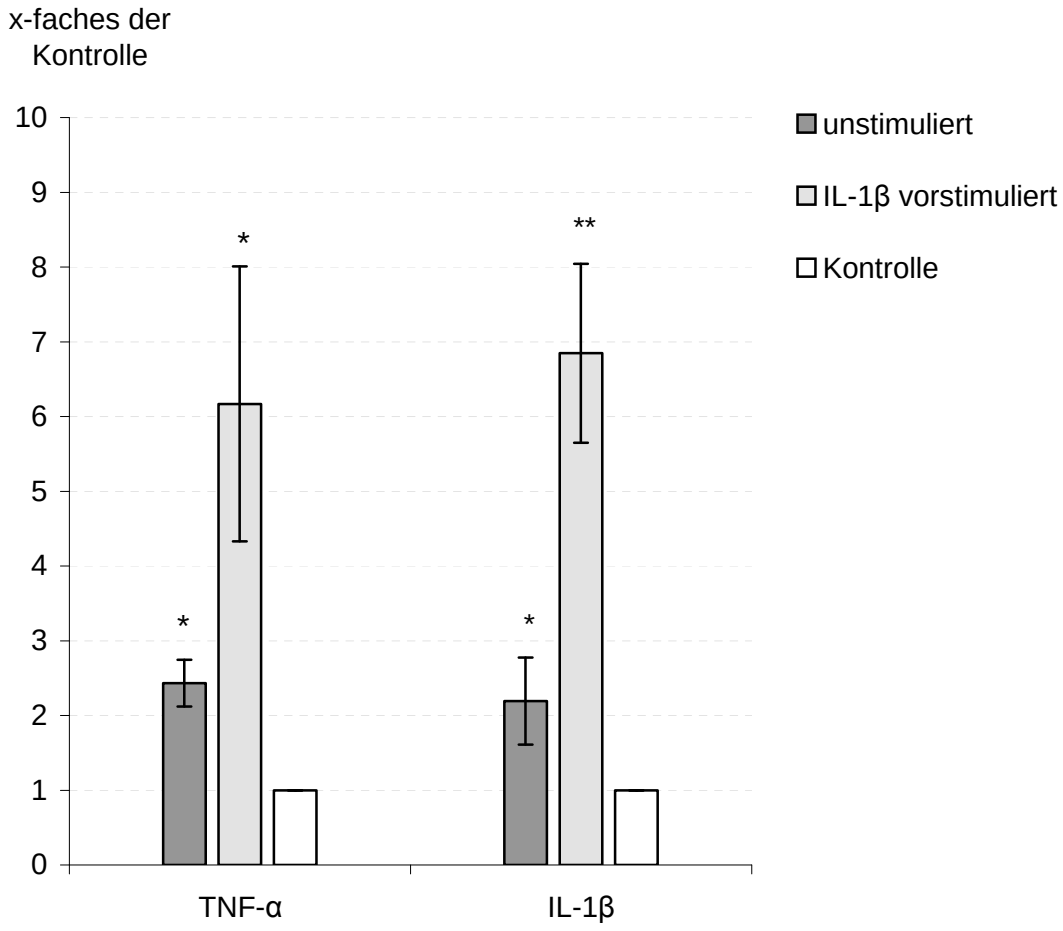


Abb. 12

Induktion der monozytären TNF-α und IL-1β Zytokinsynthese durch CCL2/MCP-1 getriebene Monozytenmigration (4 h) über endo-/epitheliale Bilayer. Über unstimulierte oder mit IL-1β (10 ng/ml) vorstimulierte endo-/epitheliale Bilayer migrierte Monozyten (Transmigrationszeit 4 h) wurden für weitere 16 h in vitro kultiviert und die in den Überstand freigesetzten Zytokine TNF-α und IL-1β mittels ELISA quantifiziert. Als Kontrolle dienten Monozyten, die 4 h mit CCL2/MCP-1 in „low cluster plates" inkubiert und anschließend für 16 h kultiviert wurden. Angabe der Zytokinfreisetzung als x-fache Steigerung bezogen auf die Kontrolle als Basalwert. Mittelwerte +/-SEM; *p<0,05; **p<0,005 bezogen auf die Kontrolle.
Absolutwerte der Kontrollen in pg/ml: IL-1β (n=4): 9; 10; 30; 515; TNF-α (n=3): 141; 1157; 2331

Auch die Zytokine IL-6 und IL-8 wurden nach Transmigration und Kultur im Vergleich zur Kontrolle tendenziell vermehrt synthetisiert. Der Zuwachs des gebildeten IL-6 betrug das 9,4-fache, IL-8 erhöhte sich um den Faktor 1,9. In beiden Fällen fiel eine hohe Varianz der gebildeten Zytokinmengen mit entsprechend hohem Standardfehler (SEM) auf. Im Gegensatz zur monozytären TNF-α und IL-1β - Synthese steigerte die endo-/epitheliale Vorstimulation mit IL-1β die monozytäre IL-6- und IL-8 - Synthese nicht signifikant (s. Abb. 13).

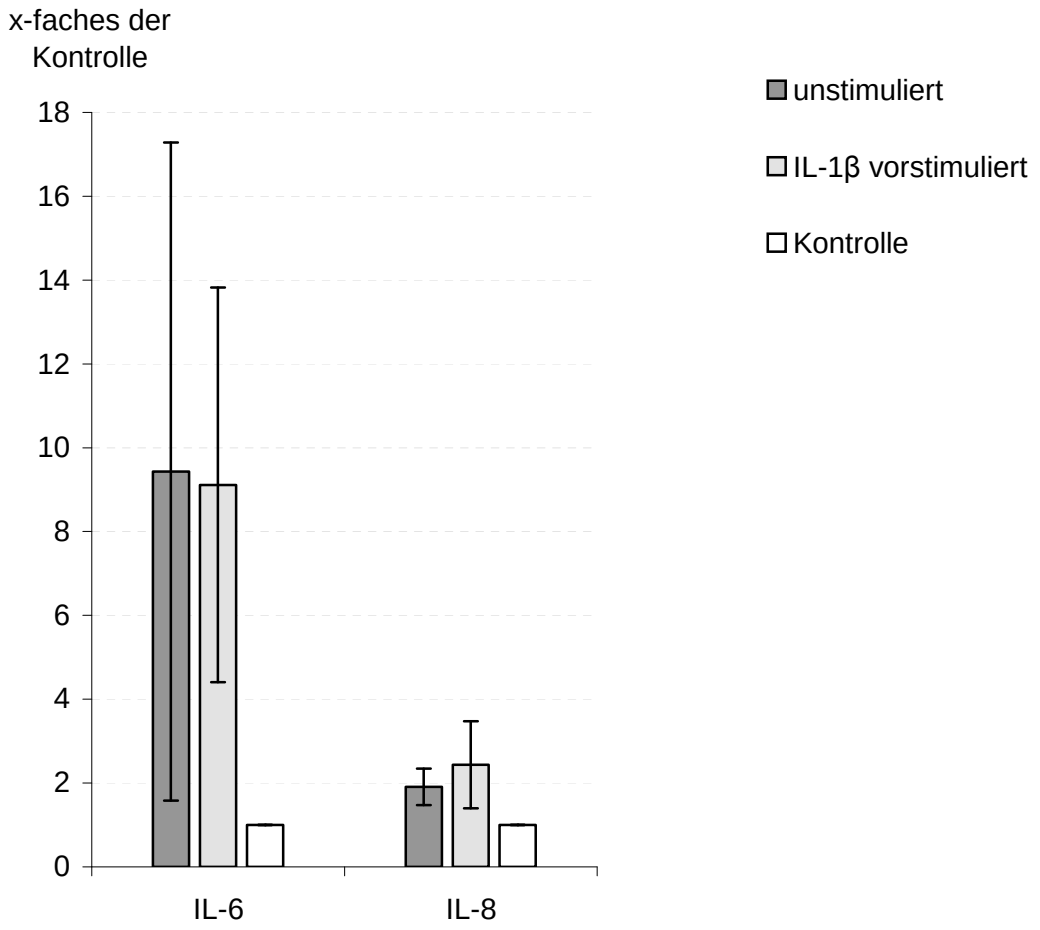


Abb. 13

Induktion der monozytären IL-6 und IL-8 Zytokinsynthese nach CCL2/MCP-1 getriebener Monozytenmigration (4 h) über endo-/epitheliale Bilayer. Über unstimulierte oder mit IL-1β (10 ng/ml) vorstimulierte endo-/epitheliale Bilayer migrierte Monozyten (Transmigrationszeit 4 h) wurden für weitere 16 h in vitro kultiviert und die in den Überstand freigesetzten Zytokine IL-6 bzw. IL8 mittels ELISA quantifiziert. Als Kontrolle dienten Monozyten, die 4 h mit CCL2/MCP-1 in „low cluster plates" inkubiert und anschließend für 16 h kultiviert wurden. Angabe der Zytokinfreisetzung als x-fache Steigerung bezogen auf die Kontrolle als Basalwert. Mittelwerte +/-SEM. Absolutwerte der Kontrollen in pg/ml: IL-6 (n=4): 397; 104; 118; 6536; IL-8 (n=4): 1763; 263946; 13317; 156358

Um festzustellen, ob eine Zytokininduktion auch nach Transmigration über endo- oder epitheliale Monolayer nachweisbar war, wurde unter denselben Migrationsbedingungen ein Vergleich zwischen den verschiedenen Transwellsystemen durchgeführt. Gemessen wurden die Zytokine IL-1β, IL-8 sowie TNF-α wiederum nach 16 h Kultur der transmigrierten Monozyten. Die Transmigrationen über endo- bzw. epitheliale Monolayer wurden nur als Einzelexperimente durchgeführt, somit sind die in den drei folgenden Abbildungen dargestellten Ergebnisse, statistisch nicht beweisend. Die Synthese von IL-1β lag nach

Transmigration über A549-Epithelzellen mit einer 5,5 –fachen Erhöhung in Bezug auf die Kontrolle deutlich höher als im Bilayermodell. Die Transmigration über Endothel zeigte eine geringere Induktion des Zytokins und lag bei Faktor 1,6. Auch die durch transepitheliale Monozytenmigration induzierte IL-8 – Synthese (3,9-fach) fiel höher aus als nach der Migration über den Bilayer (1,9-fache Steigerung) oder über einen Endothelmonolayer (keine Zytokininduktion). Anders verhielt es sich im Falle des Zytokins TNF-α. Hier zeigte die Migration über Endothel eine höhere Zytokininduktion mit einem Zuwachs gegenüber der Kontrolle um das 7,4-fache. Nach A549-Passage produzierten die Monozyten die 1,5-fache TNF-α - Menge verglichen mit der Low-cluster – Kontrolle (s. Abb. 14-16).

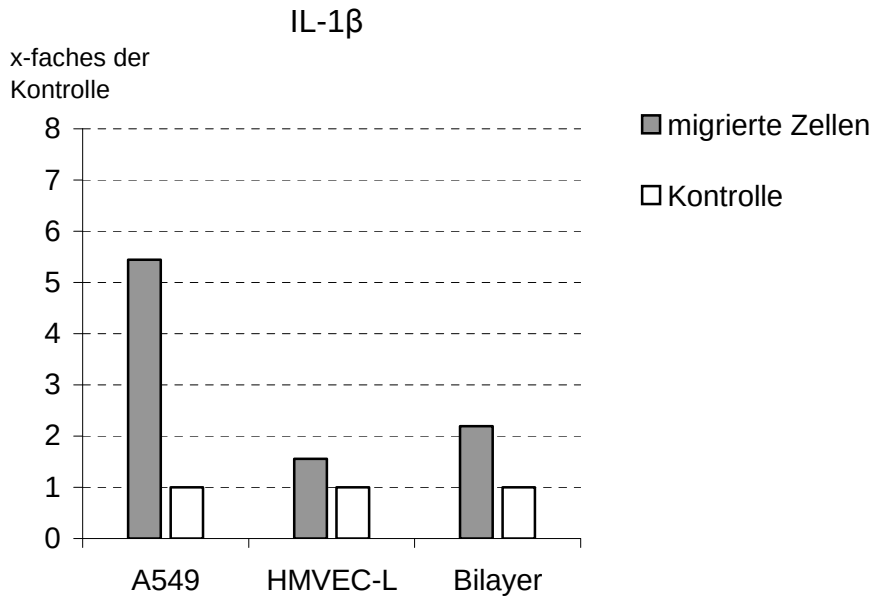


Abb. 14

IL-1β Zytokinsynthese durch Monozyten nach CCL2/MCP-1 getriebener Monozytenmigration (4 h) über endo-/epitheliale Mono- bzw. Bilayer. Über epitheliale oder endotheliale Mononlayer oder endo-/epitheliale Bilayer migrierte Monozyten (Transmigrationszeit 4 h) wurden für weitere 16 h in vitro kultiviert und das in den Überstand freigesetzte Zytokin IL1-β mittels ELISA quantifiziert. Als Kontrolle dienten Monozyten, die 4 h mit CCL2/MCP-1 in „low cluster plates“ inkubiert und anschließend für 16 h kultiviert wurden. Angabe der Zytokinfreisetzung als x-fache Steigerung bezogen auf die Kontrolle. Einzelexperiment.

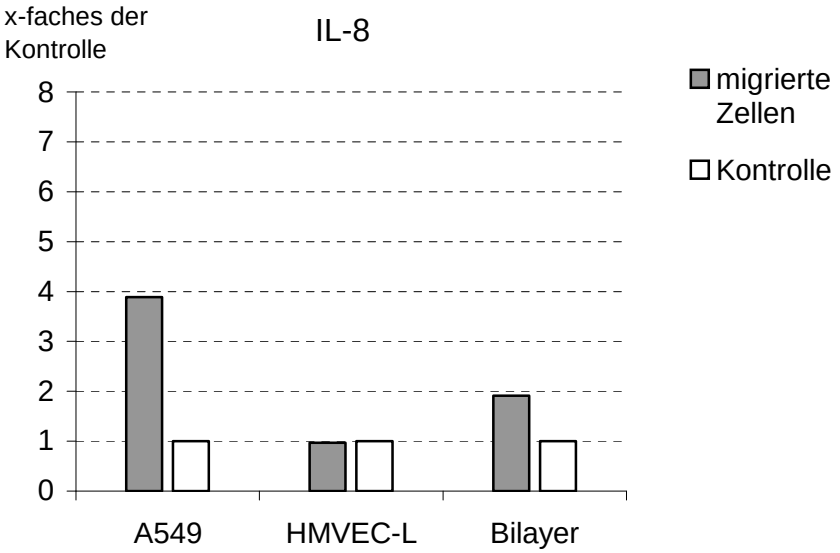


Abb. 15

IL-8 Zytokinsynthese von Monozyten nach CCL2/MCP-1-getriebener Monozytenmigration (4 h) über endo-/epitheliale Mono- bzw. Bilayer. Über epitheliale oder endotheliale Mononlayer oder endo-/epitheliale Bilayer migrierte Monozyten (Transmigrationszeit 4 h) wurden für weitere 16 h in vitro kultiviert und das in den Überstand freigesetzte Zytokine IL8 mittels ELISA quantifiziert. Als Kontrolle dienten Monozyten, die 4 h mit CCL2/MCP-1 in „low cluster plates“ inkubiert und anschließend für 16 h kultiviert wurden. Angabe der Zytokinfreisetzung als x-fache Steigerung bezogen auf die Kontrolle. Einzelexperiment.

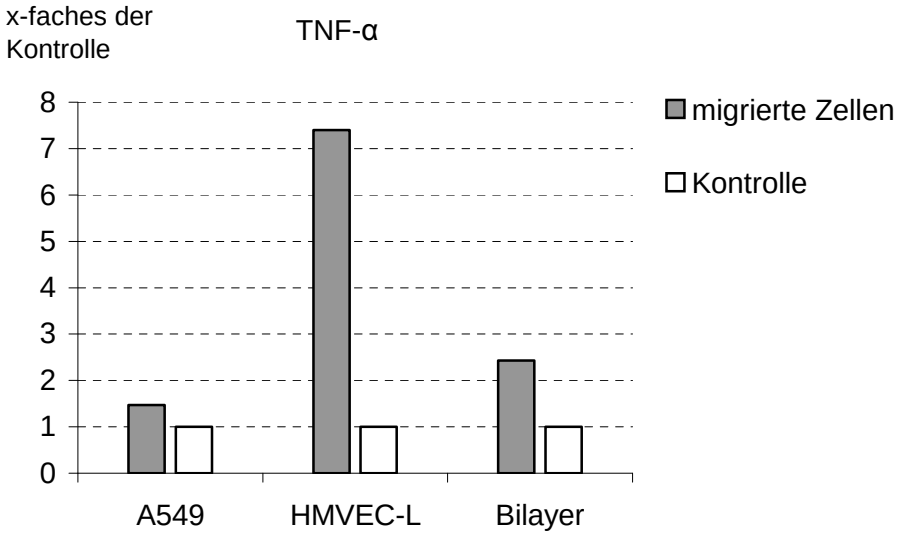


Abb. 16

TNF-α Zytokinsynthese von Monozyten nach CCL2/MCP-1-getriebener Monozytenmigration (4 h) über endo-/epitheliale Mono- bzw. Bilayer. Über epitheliale oder endotheliale Monolayer oder endo-/epitheliale Bilayer migrierte Monozyten (Transmigrationszeit 4 h) wurden für weitere 16 h in vitro kultiviert und das in den Überstand freigesetzte Zytokin TNF-α mittels ELISA quantifiziert. Als Kontrolle dienten Monozyten, die 4 h mit CCL2/MCP-1 in „low cluster plates“ inkubiert und anschließend für 16 h kultiviert wurden. Angabe der Zytokinfreisetzung als x-fache Steigerung bezogen auf die Kontrolle. Einzelexperiment.

Wie zuvor schon im Bilayermodell gezeigt, konnte eine weitere Steigerung der Zytokinsynthese nach Transmigration durch eine Vorstimulation der Endo- bzw. Epithelzellen mit IL-1β beobachtet werden. In den Monolayermodellen fiel diese Steigerung geringer aus. Eine statistisch signifikante Steigerung der Zytokinsynthese gegenüber der Transmigration über native (unbehandelte) Barrieren konnte nur nach der Transmigration über A549-Monolayer sowie den Bilayer nachgewiesen werden. Nach Monozytentransmigration über mit IL-1β-vorstimuliertem HMVEC-L-Monolayer verringerte sich die TNF-α - Synthese sogar leicht um 10% verglichen mit der unstimulierten Endothelbarriere. Der direkte Vergleich zwischen den IL-1β stimulierten Transwellsystemen ist in den folgenden Abbildungen dargestellt (s. Abb. 17, Abb. 18).

Im Epithelmonolayer-Modell führte die inflammatorische Vorstimulation zu einem Anstieg der TNF-α - Produktion um den Faktor ~1,5 im Vergleich zu unstimuliertem Epithel, IL-1β stieg um das ~3,2-fache an.

Nach der Transmigration über endothelialen Monolayer stieg IL-1β um den Faktor ~2,3 im Vergleich zu unstimuliertem Endothel.

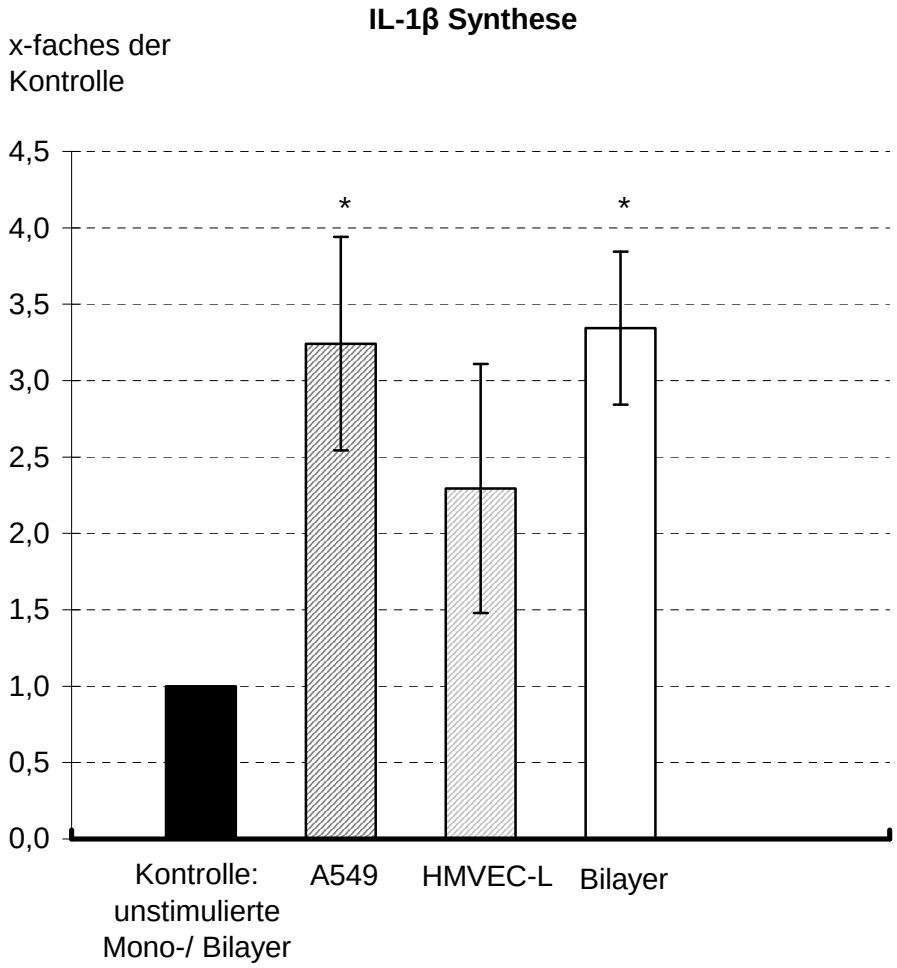


Abb. 17

Monozytäre IL-1β Synthese nach Transmigration über inflammatorisch vorbehandelte (IL-1β-vorstimulierte) Mono- und Bilayer im direkten Vergleich. Über unstimulierte oder mit IL-1β (10 ng/ml) vorstimulierte epitheliale bzw. endotheliale Mononlayer oder endo-/epitheliale Bilayer migrierte Monozyten (Transmigrationszeit 4 h) wurden für weitere 16 h in vitro kultiviert und das in den Überstand freigesetzte Zytokin IL-1β mittels ELISA quantifiziert. Mittelwerte als x-fache Steigerung +/-SEM gegenüber der Zytokinproduktion nach Migration über unstimulierte Mono-/Bilayer (Barrieren). (A549-Monolayer: n=3, *p<0,05 in Bezug auf unstimulierte Barrieren; HMVEC-L – Monolayer: n=2; Bilayer: n=3, *p<0,05 in Bezug auf unstimulierte Barrieren).

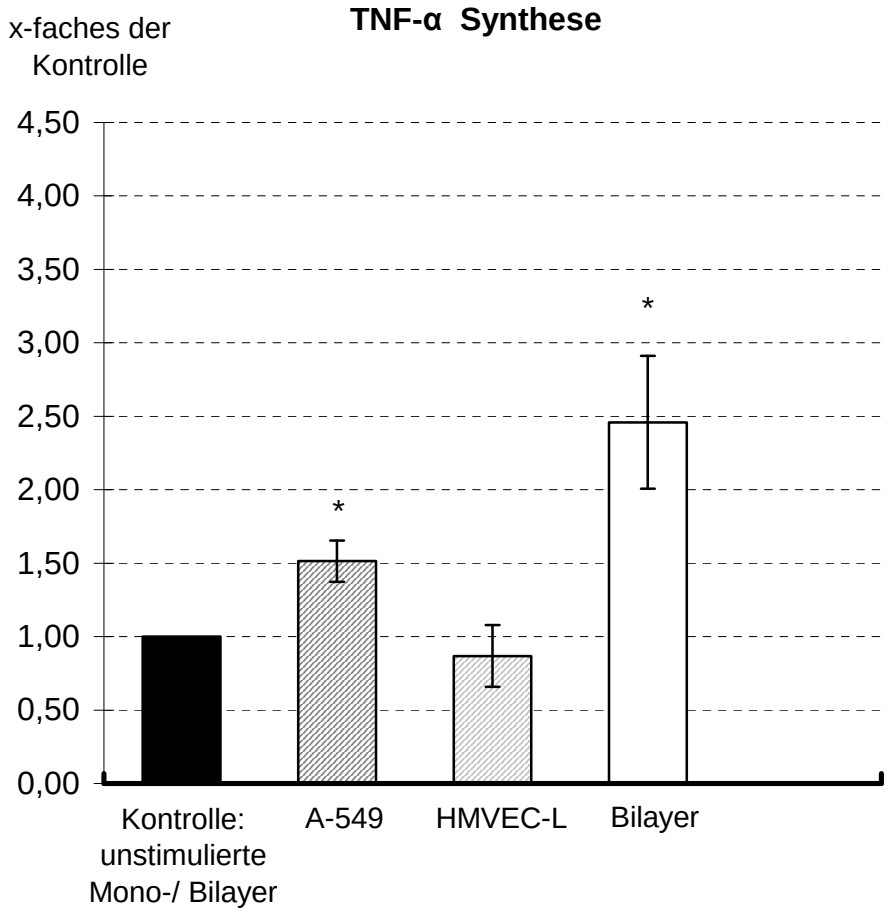


Abb. 18

Monozytäre TNF-α-Synthese nach Transmigration über IL-1β-vorstimulierte Mono- u. Bilayer im direkten Vergleich. Über unstimulierte oder mit IL-1β (10 ng/ml) vorstimulierte epitheliale bzw. endotheliale Mononlayer oder endo-/epitheliale Bilayer migrierte Monozyten (Transmigrationszeit 4 h) wurden für weitere 16 Stunden in vitro kultiviert und das in den Überstand freigesetzte Zytokin TNF-α mittels ELISA quantifiziert. Mittelwerte als x-fache Steigerung +/-SEM gegenüber der Zytokinproduktion nach Migration über unstimulierte Mono-/Bilayer. (A549-Monolayer: n=3, *p<0,05 in Bezug auf unstimulierte Barrieren; HMVEC-L – Monolayer: n=2; Bilayer: n=3, *p<0,05 in Bezug auf unstimulierte Barrieren).

Um herauszufinden, ob der direkte Zellkontakt zwischen transmigrierendem Monozyt und Endo-/Epithelzelle im Transmigrationsprozess die Steigerung der Zytokinsynthese auslöst oder ob endothelial bzw. epithelial freigesetzte Zytokine hierfür verantwortlich sind, wurden Monozyten ohne vorherige Transmigration im unteren Kompartiment des Bilayermodells der MCP1/CCL2-getriebenen Zellmigration inkubiert.

Die 4-stündige Inkubation von Monozyten im unteren Transwellkompartiment ohne vorherige Transmigration zeigte lediglich eine geringe Zytokininduktion für das Zytokin TNF-α mit einem Zuwachs gegenüber der Kontrolle um Faktor 1,4. Die Steigerung der Synthese von IL-

1β hingegen war mit einem Zuwachs um Faktor 2,0 annähernd so hoch wie nach Transmigration im Bilayermodell (Faktor 2,2). In Anwesenheit inflammatorisch vorbehandelten Endo-/Epithels fand sich keine weitere nennenswerte Steigerung der Zytokinsynthese von Monozyten, die im unteren Transwellkompartiment inkubiert wurden. (s. Abb. 19)

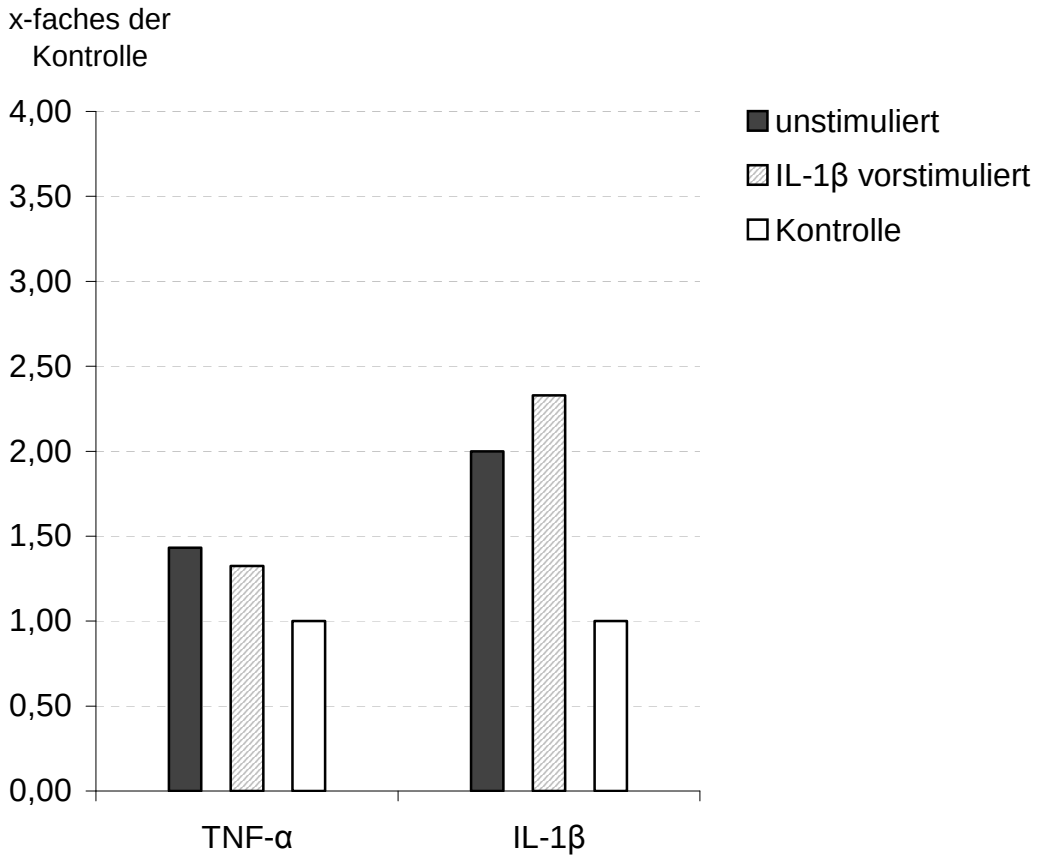


Abb. 19

Induktion der monozytären Zytokinsynthese nach Inkubation von Monozyten im unteren Kompartiment des Bilayermodells (über 4 h) ohne vorherige Transmigration. Monozyten wurden für 4 h im unteren Transwellkompartiment von unstimulierten oder mit IL-1β (10 ng/ml) vorstimulierten endo-/epithelialen Bilayer inkubiert, anschließend für weitere 16 h in vitro kultiviert und die in den Überstand freigesetzten Zytokine TNF-α und IL-1β mittels ELISA quantifiziert. Als Kontrolle dienten Monozyten, die 4 h mit CCL2/MCP-1 in „low cluster plates“ inkubiert und anschließend für 16 h kultiviert wurden. Werte als x-fache Steigerung gegenüber der Kontrolle. Einzelexperiment.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass lösliche Faktoren an der monozytären Zytokinproduktion im Transmigrationsprozess zwar beteiligt sind, eine maximale transmigrationsassoziierte Zytokininduktion jedoch nur durch direkte Zell-Zellkontakte insbesondere bei inflammatorisch vorstimulierten Barrieren erreicht wird.

5.2.2 Adhärenz

Um die Phase der Monozyteninteraktion mit Endo-/Epithelzellen, die zur Stimulation der monozytären Zytokinsynthese führt, weiter einzugrenzen, wurde die Bestimmung der aus Monozyten freigesetzten Zytokine nach Adhärenz an Endothel- sowie Epithelmonolayer und nachfolgender Kultur über 16 h durchgeführt und mit der Zytokininduktion nach Transmigration verglichen.

Nach Adhärenz an HMVEC-L zeigten die Monozyten eine dem Transmigrationsvorgang vergleichbare IL-1β - Zytokininduktion, TNF-α wurde in geringerem Ausmaß hochreguliert als nach der Transmigration. Für IL-8 fand sich mit einem Anstieg um Faktor 2,0 nach Adhärenz eine stärkere Zytokininduktion als nach Transmigration.

Bei den Adhärenzversuchen an A549-Epithelzellen fiel eine hohe Varianz der monozytären Zytokinproduktion auf. IL-1β wurde 2,9-fach vermehrt synthetisiert und war somit weniger stark hochreguliert als nach Transmigration (x 5,5).

Die Synthese von TNF-α und IL-8 war nach Adhäsion an A549 Zellen im Vergleich zur „Low cluster“ Kontrolle nicht gesteigert (Abb. 20).

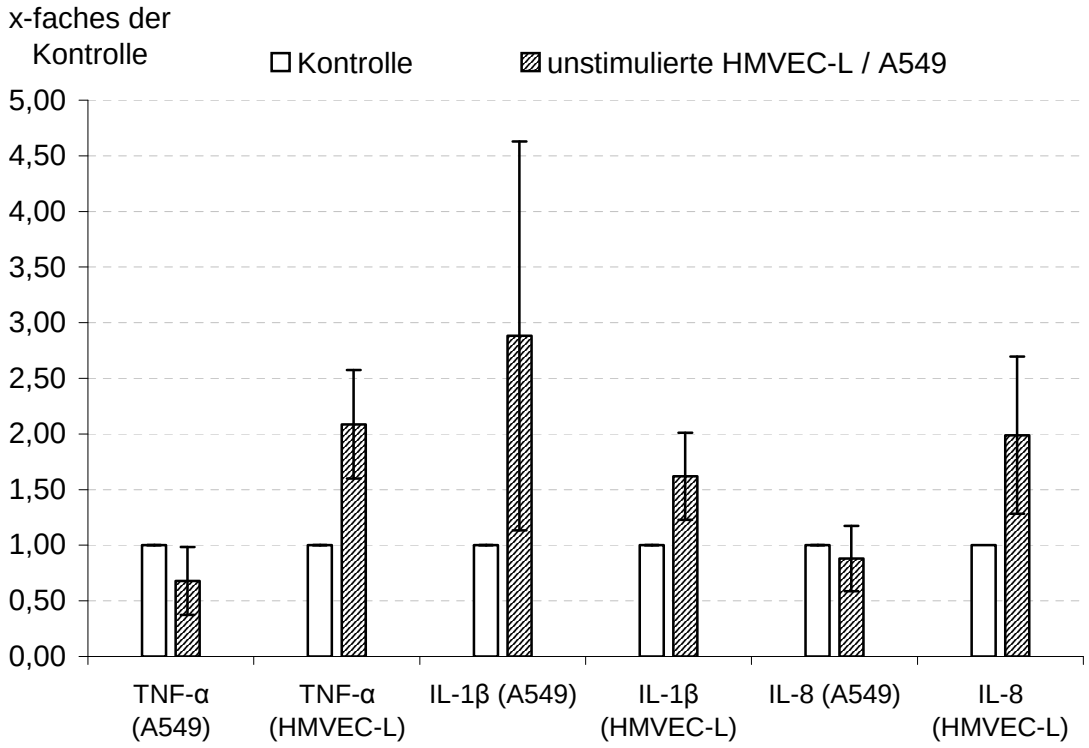


Abb. 20

Induktion der monozytären Zytokinsynthese nach Adhärenz an Endo- bzw. Epithelmonolayer. Nach 4 h Adhärenz an Endo- bzw. Epithelzellmonolayer in Gegenwart von CCL2/MCP1 (Konzentration: 10 ng/ml) wurden die Monozyten für 16 h kultiviert und anschließend die in den Kulturüberstand freigesetzten Zytokine mittels ELISA bestimmt. Als Kontrolle dienten Monozyten, die 4 h mit CCL2/MCP-1 in „low cluster plates" inkubiert und anschließend für 16 h kultiviert wurden. Mittelwerte als x-fache Steigerung +/- SEM im Vergleich zur Kontrolle (HMVEC-L - Monolayer: n=4, A549-Monolayer: n=3).

Nach IL-1β-Vorstimulation der Einzelzellschichten war der Einfluss der Adhärenz auf die Zytokininduktion variabel. Die monozytäre IL-1β - Synthese lag hierbei niedriger als nach Transmigration. Umgekehrt verhielt sich die TNF-α - Produktion. Dort kam es nach Adhärenz zu einer stärkeren Induktion des Zytokins als nach Transmigration (Abb. 21).

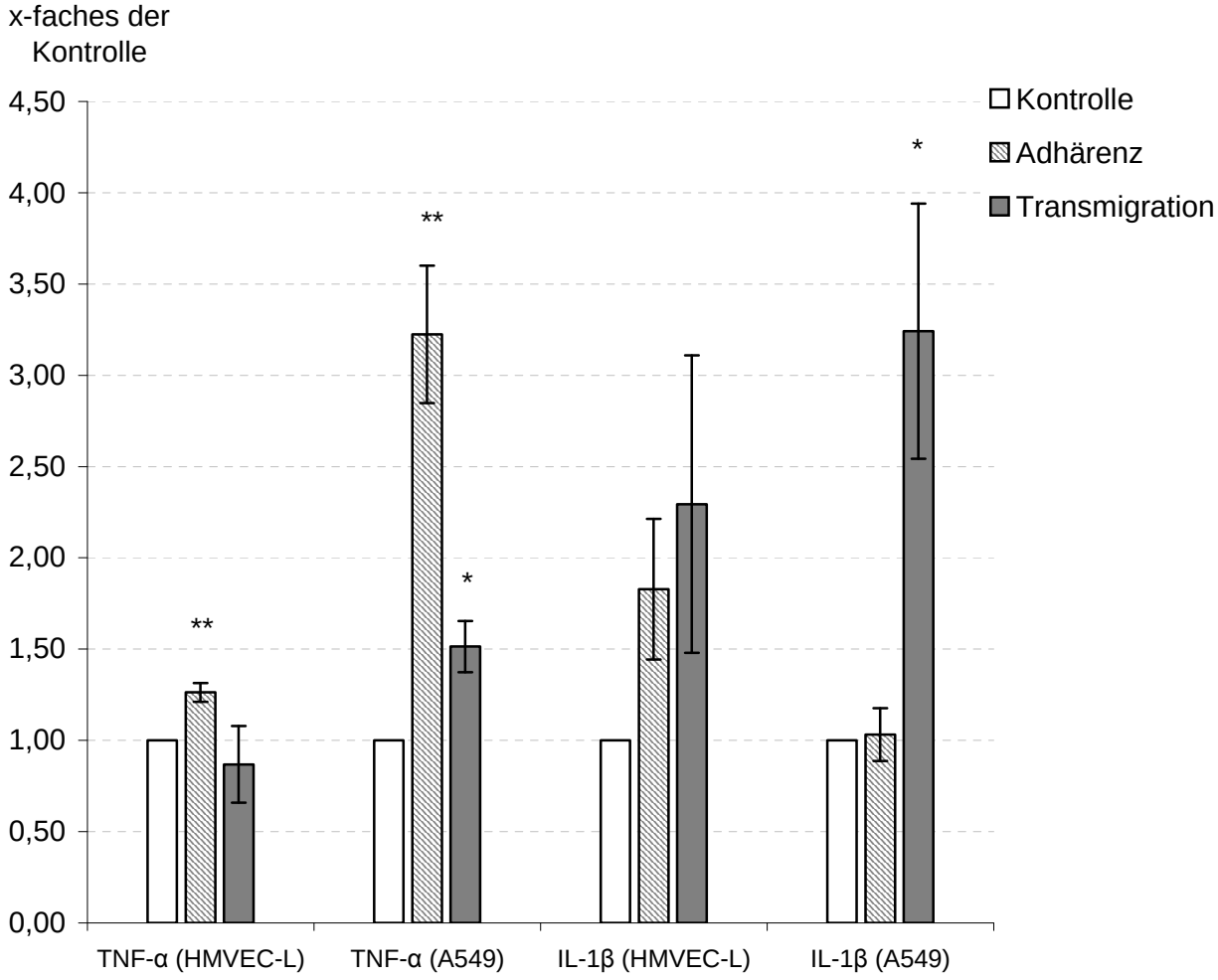


Abb. 21

Direktvergleich der monozytären Zytokinsynthese nach Adhärenz bzw. Transmigration an/über inflammatorisch vorbehandelte(n) Mono-/Bilayer (Barrieren). HMVEC-L und A549 – Zellen wurden für 4 h mit IL-1β (10 ng/ml) vorstimuliert. Über vorstimulierte epitheliale oder endotheliale Monolayer migrierte Monozyten (Transmigrationszeit 4 h, CCL2/MCP-1 Konzentration 10 ng/ml) oder Monozyten nach 4 h Adhäsion an vorstimulierte Endo- bzw. Epithelzellen wurden für weitere 16 h in vitro kultiviert und die in den Überstand freigesetzten Zytokine mittels ELISA quantifiziert. Mittelwerte als x-fache Steigerung +/-SEM gegenüber der Zytokinproduktion nach Migration über unstimulierte Mono-/Bilayer (Kontrolle). (Transmigration: A549: n=3 , HMVEC-L: n=2; Adhärenz: A549: n=3 , HMVEC-L: n=4. *p<0,05, **p<0,005 bezogen auf unstimulierte Barrieren)

Insgesamt zeigen die Daten, dass die Adhärenz von Monozyten an Endo-/Epithelzellen als Initialschritt des Transmigrationsvorgangs bereits zu einer Induktion der monozytären Zytokinsynthese führen kann. Diese kann sich im Verlauf der Transmigration weiter verstärken wie im Falle des Zytokins IL-1β oder möglicherweise auch wieder abschwächen wie im Falle der der monozytären TNF-α - Freisetzung bei Transmigration über stimulierte Barrieren.

5.2.3 Intrazelluläre IL-1β - Konzentration in Monozyten nach Transmigration und Adhärenz

Die Bestimmung intrazellulärer Zytokinkonzentrationen diente der Überprüfung des Einflusses der Transmigration und der Adhärenz auf die Zytokinsynthese im direkten Anschluss an den Adhärenz- bzw. Transmigrationsvorgang durch eine zweite unabhängige Nachweismethode. Die Messungen wurde hierbei auf Interleukin 1β beschränkt. Die Methode vermeidet die lange Inkubationszeit (16 h), die für die Zytokinsekretion in den Überstand nötig war. Durch durchflusszytometrische Messungen ließ sich eine tendenziell höhere intrazelluläre IL-1β-Konzentration in transmigrierten Monozyten im Vergleich zu adhärenten Monozyten nachweisen. Eine erhöhte zytoplasmatische Zytokinkonzentration im Vergleich zur Kulturkontrolle war bereits direkt nach der vierstündigen Transmigration bzw. Adhärenz nachweisbar. Eine signifikante weitere Steigerung der intrazellulär synthetisierten Zytokine nach Interaktion mit IL-1β-vorstimulierten Endo-/Epithelzellen ließ sich nicht nachweisen (s. Abb. 22, Abb. 23).

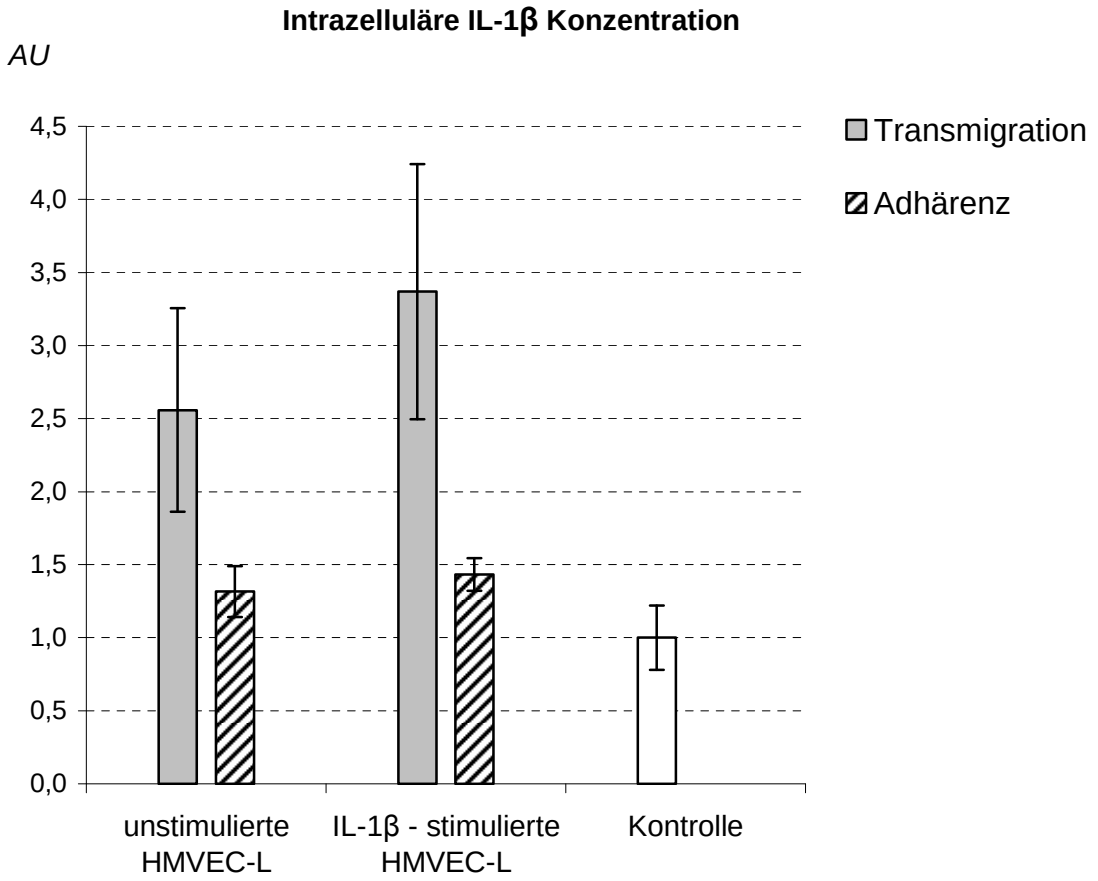


Abb. 22

Intrazelluläre IL-1β Konzentration von Monozyten nach Adhärenz an bzw. Transmigration durch einen endothelialen Monolayer. Über unstimulierte oder mit IL-1β (10 ng/ml) vorstimulierte Endothelzellmonolayer migrierte Monozyten (Transmigrationszeit 4 h, CCL2/MCP-1 Konzentration 10 ng/ml) oder Monozyten nach 4 h Adhäsion an unstimulierte/vorstimulierte Endothelzellen wurden direkt im Anschluss an die Adhäsion/Transmigration durchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer intrazellulären IL-1β Konzentration untersucht. Als Kontrolle dienten Monozyten, die 4 h mit CCL2/MCP-1 in „low cluster plates" inkubiert wurden. Mittelwerte in AU +/- SEM. AU-Werte nach Verrechnung der durch FACS-Analyse ausgewerteten „mittleren Fluoreszenzintensität" (MFI) der mit einem fluoreszenzmarkierten anti-IL-1β Antikörper markierten Zellen (n=4).

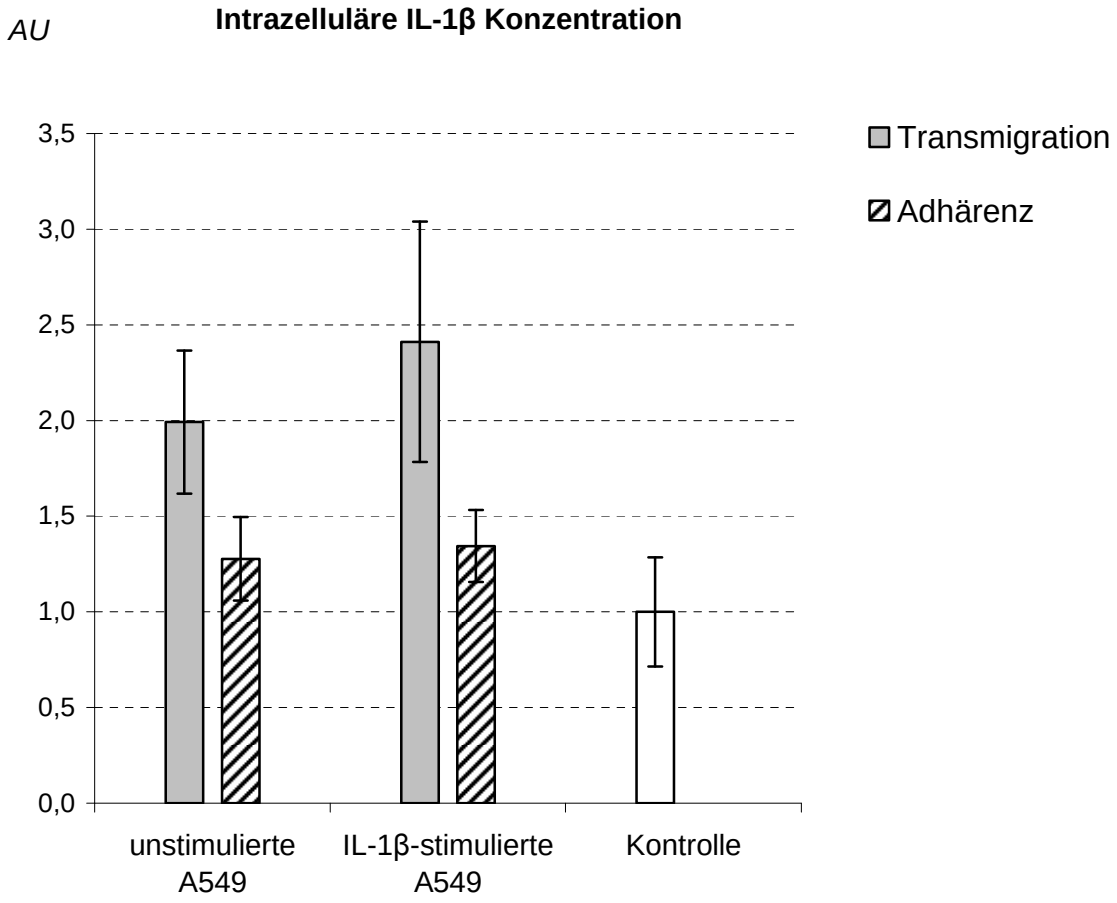


Abb. 23

Intrazelluläre IL-1β Konzentration von Monozyten nach Adhärenz an bzw. Transmigration durch einen epithelialen Monolayer. Über unstimulierte oder mit IL-1β (10 ng/ml) vorstimulierte Epithelzellmonolayer migrierte Monozyten (Transmigrationszeit 4 h, CCL2/MCP-1 Konzentration 10 ng/ml) oder Monozyten nach 4 h Adhäsion an unstimulierte/vorstimulierte Epithelzellen wurden direkt im Anschluss an die Adhäsion/Transmigration durchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer intrazellulären IL-1β Konzentration untersucht. Als Kontrolle dienten Monozyten, die 4 h mit CCL2/MCP-1 in „low cluster plates" inkubiert wurden. Mittelwerte in AU +/- SEM. AU-Werte nach Verrechnung der durch FACS-Analyse ausgewerteten „mittleren Fluoreszenzintensität" (MFI) der mit einem fluoreszenzmarkierten anti-IL-1β Antikörper markierten Zellen (n=5).

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden in vitro Mono- und Bilayermodelle der endo-/epithelialen Barriere der humanen Lunge etabliert, um den transendo-/epithelialen Migrationsprozess von Monozyten aus dem Kapillargefäßsystem der Lunge in den pulmonalen Alveolarraum näher zu charakterisieren. Neben der systematischen Evaluation zentraler Basisparameter des in vitro Transmigrationssystems wie Transmigrationsrate und Vitalität bzw. Apoptoserate der Monozyten vor und nach Migration im Transwellansatz wurde das Modell genutzt, um die durch den Transmigrationsprozess induzierte Zytokinsynthese der Monozyten zu untersuchen. Die MCP-1/CCL2-getriebene Transmigrationsrate der Monozyten über endo- oder epitheliale Monolayer bzw. endo-/epitheliale Bilayer variierte erheblich. So war die Transmigration über nichtstimuliertes A549-Epithel etwa doppelt so hoch wie die über mikrovaskuläres Endothel (47% vs. 21%). Dies steht zum Teil im Widerspruch zu Befunden anderer Arbeitsgruppen [66, 80] bzw. Autoren desselben Forschungsbereichs [44, 94], die eine geringere Monozytenmigrationsrate über die epitheliale Barriere im Vergleich zur endothelialen Schranke fanden. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ist die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit keine primären Alveolarepithelzellen, sondern die Alveolarepithelzelllinie A549, die sich von einem Alveolarzellkarzinom ableitet, als alveoläre Epithelbarriere eingesetzt wurde. A549-Zellen, die eher Alveolarepithelzell Typ II, als Typ I - Charakteristika besitzen, bilden möglicherweise weniger dichte Zellverbände als primäre Alveolarepithelzellen.

Nach Vorstimulation der endo-/epithelialen Zellschichten mit IL-1β als definiertem proinflammatorischem Stimulus fanden sich etwas niedrigere Transmigrationsraten der Monozyten als unter Basisbedingungen, die Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant. Als Ursache für diese Abschwächung der CCL2-getriebenen Monozytenmigration, die für die transepitheliale Migration über A549-Monolayer am deutlichsten war, kommen verschiedene Erklärungsansätze in Betracht. So könnte die durch IL-1ß induzierte CCL2-Synthese in Endo- oder Epithelzellen und die Liberierung dieses Chemokins in basolateraler Sekretionsrichtung den durch exogene CCL2-Zugabe erzeugten CCL2-Chemokingradienten zwischen den verschiedenen Kompartimenten des Transwells vermindern. Auch wäre ein Einfluss der Interleukin-1β-Vorstimulation auf endo-/epitheliale Adhäsionsmoleküle sowie andere lösliche Faktoren denkbar, was eine Veränderung der

Transmigrationsbedingungen für die Monozyten zur Folge haben könnte. Eine weitere mögliche Erklärung ist eine durch Monozytenaktivierung induzierte feste Adhärenz, die nicht oder nur langsam reversibel ist und deshalb keine Migration erlaubt [17, 21, 27, 37, 72, 79, 89, 113].

Die Untersuchungen zur Vitalität der Monozyten in den verschiedenen Transwellkompartimenten mittels durchflusszytometrischer Apoptosemessungen zeigten einen höheren Anteil vitaler Monozyten im Transwell nach Transmigration (66,9%) im Vergleich zu Monozyten, die lediglich für 4 Stunden kultiviert wurden (52,5%). Diese Befunde schienen die Hypothese zu stützen, dass durch den Migrationsvorgang antiapoptotische Prozesse in Monozyten induziert werden. Weitere Untersuchungen, die alle Monozyten im Transwellansatz berücksichtigten, zeigten jedoch nach 4 Stunden eine Aufspaltung der Monozytenausgangspopulation in zwei Zellpopulationen mit unterschiedlicher Vitalität in den verschiedenen Transwellkompartimenten. Neben den transmigrierten Zellen mit niedriger Apoptoserate im unteren Kompartiment fand sich eine Zellpopulation nichttransmigrierter Monozyten mit hoher Apoptoserate, welche in den Inserts verblieben. Die Gesamtpopulation aus beiden Fraktionen zeigte die gleiche Verteilung vitaler bzw. apoptotischer und nekrotischer Zellen wie die Kulturkontrolle. Diese Befunde sprechen dafür, dass bevorzugt Zellen mit hoher Vitalität migrieren, während Zellen mit bereits induzierter Apoptose im Insert verbleiben. Somit ließ sich für die in vitro Transmigration der Monozyten im verwendeten Transwellsystem kein antiapoptotischer Effekt nachweisen.

Zur Erfassung der transmigrationsassoziierten Zytokinsynthese wurden die migrierten Zellen über einen Zeitraum von 16 Stunden kultiviert und die Zytokinfreisetzung in den Kulturüberstand mit der von nicht transmigrierten, sondern lediglich für 4 Stunden in „Low Cluster Plates“ kultivierten Monozyten verglichen. Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1β und TNF-α in Monozyten nach Transmigration über die endo-/epitheliale Barriere. Für die Zytokine IL-8 und IL-6 fand sich ebenfalls ein Anstieg der Sekretion nach Transmigration, der jedoch verglichen mit der Kontrolle aufgrund der großen Streuung statistisch nicht signifikant war.

Um den Beitrag der endo- vs. epithelialen Barriere zur transmigrationsinduzierten Zytokinsekretion zu spezifizieren, wurden bei sonst unveränderter Versuchsanordnung Vergleichsmessungen nach Monozytenmigration über Endo- bzw. Epithelmonolayer durchgeführt. Nach der Transmigration über A549-Epithel allein fiel im Vergleich zum Bilayer eine höhere Induktion von IL-1β sowie IL-8 auf. TNF-α hingegen wurde im

Vergleich weniger sezerniert. Die Transmigration über Endothel induzierte eine deutlich höhere TNF-α-Sekretion als die transepitheliale- oder Transbilayermigration. IL-1β wurde im Vergleich zur Bilayeranordnung in geringerem Ausmaß, IL-8 wurde nicht induziert.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass sowohl Endothelien wie auch Epithelien zum Teil differentiell die Funktion migrierender Monozyten modulieren, wobei die beteiligten Signalpfade bisher nur unzureichend charakterisiert sind. Im Gegensatz zum hier beschriebenen Bilayermodell sind im Zusammenhang mit der Monolayertransmigration über Endothel und Epithel bereits molekulare Interaktionen von Monozyten mit Endo- bzw. Epithelzellen beschrieben. So zeigten Arbeiten der Autoren Rosseau et al. [94], Shang et al. [100] und weiterer [3, 5, 13, 14, 39, 49, 50, 56, 69, 103, 113, 115] die Rolle verschiedener Adhäsionsmoleküle wie der $\beta_{1/2}$-Integrine, Selektine, ICAM-1, VCAM-1, integrinassoziiertem Protein CD47 und deren Expression in Bezug auf die Monolayertransmigration bzw. Adhärenz unter bestimmten Bedingungen auf. Kukreti S. et al. [59] untersuchten die Adhärenz- und Transmigrationseigenschaften von Monozyten über IL-1β-vorstimulierte HUVEC-Endothelzellen unter „Flow"-Konditionen und zeigten einen Rückgang der Adhärenz sowie der Transmigrationsrate durch selektive Blockade von α_4-, β_2 Integrinen und L-Selectin. Auch Meerschaert et al. [77] beschrieben durch Monozyten für den Transmigrationsprozess genutzte Adhäsionsmoleküle bei Experimenten mit IL-1β-vorstimulierten HUVEC-Endothelzellen. Ergebnisse über den Beitrag der an Monolayermodellen gezeigten Interaktionen zur Leukozytentransmigration über physiologisch angeordnete Endo-/Epithelzellbilayer sind in der Literatur bisher nur vereinzelt zu finden. Untersuchungen an Bilayersystemen widmen sich überwiegend anderen Fragestellungen wie beispielsweise dem Transport von Mycobacterium tuberculosis von der Alveole in das Blutgefäßsystem [7, 8, 21]. Erst kürzlich stellten Hermanns et al. [43] ein weiteres in vitro Bilayermodell der pulmonalen endo-/epithelialen Schranke vor.

Da in der vorliegenden Arbeit speziell die monozytäre Zytokinsekretion nach Transmigration im Entzündungskontext im Mittelpunkt stand, wurde die Synthese von IL-1β und TNF-α auch nach Monozytentransmigration über vierstündig mit IL-1β-vorstimulierte Barrieren gemessen. Hier zeigte sich vor allem bei der Bilayeranordnung eine weitere Steigerung der Zytokinproduktion im Vergleich zum unstimulierten Barrieremodell. Die Sekretion von Il-1β war um den Faktor 3,3, die Sekretion von TNF-α um den Faktor 2,0 höher als nach Monozytenmigration über unstimulierte Barrieren. Dies entspricht im Vergleich zur „low-cluster"-Kontrolle einer 6,9 (IL-1β)- bzw. 6,2 (TNF-α)- fachen Steigerung.

Die Transmigration über vorstimulierte Monolayer führte ebenfalls zu einer erhöhten IL-1β-Synthese im Vergleich zu unstimulierten Monolayern. Bei Transmigration über stimuliertes Endothel stieg die Synthese um den Faktor 2,3. Die Induktion nach Epithelpassage war mit Faktor 3,2 nahezu vergleichbar mit der Steigerung nach Bilayertransmigration. TNF-α hingegen wurde nach Epitheltransmigration 1,5-fach gebildet. Nach Migration über Endothelzellen war sogar ein leichter Rückgang festzustellen.

Insgesamt sprechen die Befunde dafür, dass inflammatorisch vorbehandelte A549-Epithelzellen einen stärkeren Beitrag zur transmigrationsassoziierten Zytokininduktion als Funktionsparameter für die Monozytenaktivierung leisten als mikrovaskuläre Endothelzellen. Des Weiteren legen die Ergebnisse die Hypothese nahe, dass in der IL-1β-vorstimulierten Bilayeranordnung eine Interaktion zwischen A549 und HMVEC-L – Zellen stattfindet, welche die transmigrierenden Monozyten in höherem Maße zur Bildung der proinflammatorischen Zytokine anregt als die jeweiligen Einzelzellschichten. Es konnte hier jedoch kein direkter additiver Effekt nachgewiesen werden.

Die einseitige, differentielle Vorstimulation des Endothels oder des Epithels mit dem Zytokin IL-1β im vorliegenden Bilayersystem ist technisch gut praktikabel. Die Analyse der transmigrationsassoziierten Zytokinsekretion der Monozyten in entsprechend vorbehandelten Transwellsystemen ergab jedoch wegen der großen Variabilität keine eindeutig zu interpretierenden Ergebnisse. Diese Tatsache spricht wiederum für noch unzureichend charakterisierte Interaktionen zwischen endo- und epithelialer Barriere mit variabler Auswirkung auf die Monozytenaktivierung, die zukünftig weiterer systematischer Evaluation bedürfen. G. Eissner et al. [22] fanden eine durch unstimulierte Monozyten hervorgerufene endotheliale Aktivierung mit Exprimierung der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1. Die daraus resultierende endotheliale TNF-α - Induktion führt zur monozytären Freisetzung von Endothelial activating factor (EAF). EAF wiederum triggert Adhäsion und Transmigration sowohl von Monozyten als auch von Lymphozyten und Granulozyten.

Weitere potentielle Einflussfaktoren in Transwell in vitro Modellen sind die verwendeten Materialien der Versuchsanordnungen. So fanden J. Frokjaer et al. [32] einen aktivierenden und prochemotaktischen Effekt durch Polyethylenpartikel bei mononukleären Zellen der Synovia.

Um den Einfluss der Transmigration auf die Monozyten mit dem der Adhärenz als Teilschritt des Transmigrationsvorganges zu vergleichen, wurden in entsprechend abgestimmten Einzelversuchen Monozytentransmigrationen über Endo- oder Epithelzellmonolayer parallel zur Adhärenz ohne Transmigrationsschritt bei vergleichbaren Bedingungen durchgeführt (vgl.

Abb. 20). Es stellte sich dabei heraus, dass die Monozytenadhärenz an Endothel und Epithel weniger hohe IL-1β- und TNF-α - Spiegel im Monozyten-Kulturüberstand induzierte als die Transmigration. Eine Ausnahme bildete die IL-1ß - Sekretion bei Adhärenz an mikrovaskulären Zellen, die eine der Transmigration vergleichbare IL-1β - Induktion (Faktor 1,6 in beiden Fällen) auslöste. Die Zytokinproduktion nach Transmigration über IL-1β-vorstimulierte Barrieren ergab eine höhere IL-1β - Induktion in Monozyten als nach Adhärenz. Dagegen synthetisierten Monozyten nach Adhärenz an IL-1β-vorstimulierten Monolayern mehr TNF-α als nach Transmigration (Abb. 21).

Um den direkten Einfluss der Transmigration sowie der Adhärenz auf die monozytäre Zytokinsynthese ohne die für die Erfassung der Sekretion in den Überstand notwendige 16-stündige Kultur zu untersuchen, wurden direkt im Anschluss an die Transmigration bzw. Adhäsion die intrazellulär akkumulierten Zytokine mit Hilfe der Durchflusszytometrie quantifiziert. Aufgrund des hohen finanziellen Aufwandes wurden die Messungen auf das Zytokin Interleukin-1β beschränkt. Hierbei konnte auf Einzelzellebene gezeigt werden, dass eine höhere Induktion von IL-1β nach Transmigration über Endo-/Epithelzellmonolayer auftrat als dies nach Adhärenz an die entsprechenden Zellbarrieren der Fall war. Diese direkt im Anschluss an den Adhärenz- bzw. Transmigrationsvorgang erhobenen Befunde bestätigen die mittels ELISA–Verfahren gemessenen monozytären Zytokinliberationsdaten nach Monozytenkultur. Auch wird somit wahrscheinlich, dass der Adhärenz- bzw. Transmigrationsprozess unmittelbar differentiell die Monozytenfunktion im Sinne einer Modulation der Zytokininduktion beeinflusst.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass sich über Transwellmonolayer pulmonaler Endo- und Epithelzellen sowie über einen endo-/epithelialen Bilayer eine MCP1/CCL2 getriebene Monozytenmigration in vitro induzieren lässt, die eine präparative Isolation der transmigrierten Zellen erlaubt. Die MCP1/CCL2-getriebenen Transmigrationsraten waren innerhalb eines Transwellansatzes sehr konstant reproduzierbar, zwischen den verschiedenen Anordnungen wie endo- bzw. epitheliale Monolayer oder kombinierte Endothel-/ Epithelbilayer fanden sich hingegen erhebliche Unterschiede. Ein direkter Einfluss der Transmigration auf die Vitalität und das Apoptoseverhalten der Monozyten konnte nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sprechen jedoch für eine Separation der eingesetzten Monozyten in eine avitalere Population nichttransmigrierender Monozyten sowie eine vitalere, weniger Apoptoseverhalten aufweisende Population transmigrierter Zellen im in

vitro Modell. Nach Transmigration zeigte sich in den Monozyten eine Induktion der Synthese proinflammatorischer Zytokine (IL-1β, TNF-α, IL-6 und IL-8), die in den Kulturüberstand freigesetzt wurden. Auch die Monozytenadhärenz an Endo- bzw. Epithel, die als Teilschritt der Transmigration zu verstehen ist, führte zu einer vermehrten Zytokinfreisetzung, die jedoch weniger ausgeprägt war als nach Transmigration.
Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass bei inflammatorisch vorbehandelten Barrieren die Transmigration über endo-/epitheliale Bilayer zu einer höheren Zytokinliberierung der transmigrierten Monozyten führt als die Transmigration über endo- bzw. epitheliale Monolayer. Auch die intrazelluläre Bestimmung des Zytokins IL-1β im Monozyten direkt nach Transmigration und Adhärenz ergab eine höhere Konzentration nach dem Transmigrationsvorgang als nach Adhäsion.

Bei der Monozytenrekrutierung in den Alveolarraum führt der Transmigrationsprozess in vitro somit zur Modulation der Monozytenfunktion im Sinne einer vermehrten Liberierung proinflammatorischer Zytokine. Dazu tragen Endo- und Epithelien sowohl in der Phase der Monozytenadhäsion als auch -transmigration bei. Darüber hinaus sind vermutlich bisher nicht spezifizierte Endo-/Epithelzellinteraktionen an der verstärkten Zytokininduktion in Monozyten während der Transmigration beteiligt. Hierfür sprechen die Befunde an inflammatorisch stimulierten Bilayern, die die Zytokinsynthese (IL-1β und TNF-α) in migrierten Monozyten stärker erhöhen als endo- bzw. epitheliale Monolayer. Die Ergebnisse scheinen im Hinblick auf die Genese akuter als auch chronisch-entzündlicher Lungenerkrankungen von Bedeutung.

7 Zusammenfassung

Bei der entzündungsgetriebenen Rekrutierung in den Alveolarraum überqueren die im Blutgefäßsystem zirkulierenden mononukleären Phagozyten die pulmonale Kapillarendothel- und Alveolarepithelbarriere. Ein durch die pulmonale Inflammation getriggerter chemotaktisch wirksamer MCP1/CCL2 – Gradient ist an der Monozytentransmigration maßgeblich beteiligt. Auf dem Weg in den Alveolarraum kommt es zu einer „Aktivierung" der Monozyten im Sinne einer inflammatorischen Monozytenmodulation. Zell-Zell-Interaktionen, wie die Monozytenadhäsion an pulmonalem Endo- bzw. Epithel sowie der Einfluss löslicher Faktoren können hierzu beitragen.

Um die transmigrationsassoziierte Funktionsänderung humaner Monozyten näher zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl die Monozytenadhärenz an Endo- bzw. Epithelzellen als auch der Transmigrationsvorgang durch die endo-/epitheliale Barriere in einem in vitro Modell imitiert. Die Monozyten transmigrierten in Anwesenheit eines MCP-1/CCL2 – Gradienten über physiologisch angeordnete HMVEC-L – Endothel- und A549 – Epithelbarrieren. Die dabei verwendeten Transwells waren mit konfluenten endo-/epithelialen Einzelzellschichten kultiviert, ebenso die Kulturplatten für die Adhärenzansätze. Die Vitalität und das Apoptoseverhalten der Monozyten in den verschiedenen Transwellkompartimenten wurden durchflusszytometrisch evaluiert. Im Anschluss an die Transmigration bzw. Adhärenz über 4 Stunden wurden die migrierten Monozyten über 16 Stunden in vitro kultiviert und die in diesem Zeitraum liberierten proinflammatorischen Zytokine IL-1β und TNF-α sowie in einigen Ansätzen IL-6 und IL-8 in den Kulturüberständen mit Hilfe der ELISA-Technik quantifiziert. Darüber hinaus wurde die intrazelluläre IL-1β - Konzentration direkt nach Transmigration bzw. Adhärenz mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt.

Die migrierte Monozytenpopulation zeigte eine höhere Vitalität bzw. geringere Apoptoserate als die im Insert verbliebenen nicht migrierten Monozyten. Der Anteil apoptotischer Zellen im gesamten Transwellansatz war im Vergleich zu den über einen gleichen Zeitraum lediglich kultivierten Monozyten jedoch gleich. Dies spricht gegen einen Antiapoptoseeffekt der Transmigration, sondern eher dafür, dass Monozyten, in denen bereits Apoptoseprozesse

ablaufen, nicht mehr so effektiv migrieren. Dadurch reichern sich vitale Monozyten in der migrierten Population an.

Die MCP-1/CCL2 getriebene in vitro Transmigration von Monozyten durch den endo-/ epithelialen Bilayer induzierte die proinflammatorischen Zytokine IL-1β, TNF-α, IL-6 sowie IL-8 in den transmigrierten mononukleären Phagozyten. Eine inflammatorisch veränderte Endo-/Epithelbarriere, die durch Vorstimulation des Bilayers mit IL-1β imitiert wurde, verstärkte die monozytäre IL-1β- / TNF-α - Liberierung nach Transmigration im Vergleich zu unstimulierten Barrieren.

Auch die MCP-1/CCL2 getriebene Transmigration über Endothel-/Epithelmonolayer induzierte die Synthese proinflammatorischer Zytokine in Monozyten, allerdings in der Regel in geringerem Ausmaß als im Bilayersystem. Insbesondere die Steigerung der Zytokinsekretion bei Migration über inflammatorisch veränderte Barrieren, imitiert durch IL-1β-Vorstimulation der Endo- bzw. Epithelmonolayer, war im Monolayermodell deutlich geringer ausgeprägt als im Bilayermodell.

Zwar induzierte bereits die Adhärenz von Monozyten an Endo- oder Epithelzellen ohne nachfolgende Transmigration eine erhöhte Synthese der Zytokine IL-1β und TNF-α (Ausnahme: Adhärenz an A549 führte nicht zur TNF-α - Induktion). Diese adhärenzinduzierte Zytokininduktion war jedoch deutlich geringer ausgeprägt als die durch Transmigration ausgelöste Zytokinfreisetzung. Eine Ausnahme hierbei bildete die Adhärenz an mikrovaskulären Zellen, die eine mit der Transmigration vergleichbare IL-1β - Induktion auslöste. Auch nach IL-1β-Vorstimulation der Zellbarrieren induzierte die Transmigration eine deutlich höhere IL-1β - Produktion in Monozyten als die Adhärenz. Umgekehrt synthetisierten Monozyten nach Adhärenz an IL-1β-vorstimulierten endo- bzw. epithelialen Monolayern mehr TNF-α als nach Transmigration.

Auch die intrazelluläre Zytokinmessung unmittelbar nach Transmigration zeigte eine höhere monozytäre Interleukin-1β - Induktion nach Transmigration im Vergleich zur Adhärenz sowohl bei stimulierten als auch unstimulierten Endo- und Epithelzellen. Damit werden die Ergebnisse der Zytokinmessung im Kulturüberstand mittels ELISA-Technik durch eine zweite kulturunabhängige Methode bestätigt.

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass inflammatorisch rekrutierte Monozyten und hieraus differenzierende Alveolarmakrophagen die pulmonale Entzündung durch Zytokinfreisetzung, die durch Interaktion mit pulmonalem Endothel und Epithel im Transmigrationsprozess induziert wird, erheblich beeinflussen können. Es konnte gezeigt werden, dass die monozytäre Zytokinsynthese quantitativ und qualitativ abhängig von Zell-Zell-Kontakten mit Endothel und Epithel differiert. Die Ergebnisse sind weitere Bausteine zur Entwicklung pathophysiologisch fundierter Therapiekonzepte des akuten Lungenversagens.

8 Abstract

Recruitment of PBMCs into the alveolar space of the lung driven by inflammation is characterized by monocyte transmigration across the pulmonal capillary endothelial and epithelial barrier. A chemotactic effective MCP-1/CCL-2 gradient triggered by pulmonal inflammation is essentially involved in monocyte transmigration. On its way to the alveolar space an “activation” of monocytes can be observed within the means of an inflammatory modulation. Cell-cell interactions like monocyte adhesion to pulmonal endo-/epithelium as well as the influx of soluble factors may contribute to this modulation.

To investigate the transmigration-associated modulation of human monocytes we imitated the monocyte adhesion to endo-/epithelial cells as well as the transmigration process in an in vitro model. Monocytes transmigrated through physiological directed HMVEC-L – endothelial / A549 – epithelial barriers in presence of an MCP-1/CCL-2 gradient. For this we used transwells covered with confluent endo-/epithelial monolayers, also culture plates used for adhesion experiments. Vitality and apoptotic behavior of monocytes in the different transwell compartments have been evaluated by flow cytometric analysis. Following a 4- hour adhesion- / transmigration process, migrated monocytes were cultivated for 16 hours. Supernatants containing the liberated proinflammatoric cytokines IL-1β, TNF-α in few trials IL-6 and IL-8 during this period were quantified applying ELISA-technique. Furthermore intracellular IL-1β concentration has been determined straight after Transmigration/Adhesion procedure.

The migrated monocyte population showed a higher vitality / minor apoptotic ratio compared with non migrated monocytes resting in the insert. The percentage of apoptotic cells in the whole transwell model compared with only cultivated monocytes revealed no difference within the same period. Therefore an anti-apoptotic effect caused by transmigration appears improbable. One can hypothesize an accumulation of vital monocytes in the migrated population assuming monocytes undergoing apoptotic processes to migrate less effectively.

MCP-1/CCL-2 derived monocyte transmigration in vitro through endo-/epithelial bilayer induced the proinflammatoric cytokines IL-1β, TNF-α, IL-6 and IL-8 in transmigrated mononuclear phagocytes. An inflammatory influenced endo-/epithelial barrier imitated by pre-stimulation of the bilayer with IL-1β enhances monocytotic liberation of IL-1β/TNF-α after transmigration compared with unstimulated barriers.

Also CCL2 driven transmigration through endo-/epithelial monolayers induced synthesis of proinflammatoric cytokines in monocytes, however usually by minor scale compared with the bilayer model. In particular the increased liberation of cytokines in monocytes migrating through IL-1β pre-stimulated endo- and epithelial monolayers was clearly found on a minor extend compared with a pre-stimulated bilayer. Though adherence to endo-/epithelial cells without following transmigration already induced an augmented synthesis of IL-1β and TNF-α this cytokine induction however was found on a lower level than the transmigration-triggered cytokine-liberation. An exception was the adherence to endothelium which showed a comparable extend of IL-1β induction. Even after IL-1β pre-stimulation of the barriers transmigration induced a higher IL-1β production in monocytes compared with adherence. Vice versa monocytes synthesized more TNF-α after endo-/epithelial adhesion than after transmigration.

Also intracellular concentration of IL-1β in monocytes directly after transmigration revealed a higher induction of this cytokine compared with adherence in both native and pre-stimulated endo-/epithelial cells. This intracellular measurement represents a second cell-culture independent method to confirm the results of the liberated IL-1β in supernatants by ELISA-technique.

In conclusion these results point to a considerable contribution of inflammatorically recruited monocytes / alveolar macrophages to pulmonal inflammation initiated by cytokine liberation triggered by interaction with pulmonal endothelium and epithelium within the transmigration process. We pointed out that cytokine synthesis of monocytes depends on cell-cell interaction with endothelium and epithelium quantitatively as well as qualitatively. These findings could be seen as a further contribution to develop pathophysiologically founded therapeutic concepts for treatment of acute lung failure.

9 Literatur

1. **Abe Y., Hashimotou S. and Horie T.** Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacol Res. 39(1):41-7, 1999*

2. **Alon R., Kassner P.D., Carr M.C., Finger E.B., Hemler M.E., Springer T.A.** The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol. 128(6): 1243-53, 1995*

3. **Arnold R., König W.** Respiratory syncytial virus infection of human lung endothelial cells enhances selectively intercellular adhesion molecule-1 expression. *J Immunol. 174(11): 7359-67, 2005*

4. **Baqui A.A., Jabra-Rizk M.A., Kelley J.I., Zhang M., Falkler W.A. Jr., Meiller T.F.** Enhanced interleukin-1beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production by LPS stimulated human monocytes isolated from HIV+ patients. *Immunopharmacol Immunotoxicol. 22(3): 401-21, 2000*

5. **Beck-Schimmer B., Madjdpour C., Kneller S., Ziegler U., Pasch T., Wuthrich R.P., Ward P.A., Schimmer R.C.** Role of alveolar epithelial ICAM-1 in lipopolysaccharide-induced lung inflammation. *Eur Respir J. 19(6): 1142-50, 2002*

6. **Benfield T.L., Lundgren B., Shelhamer J.H. and Lundgren J.D.** Pneumocystis carinii major surface glycoprotein induces interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 release from a human alveolar epithelial cell line *Eur J Clin Invest. 29(8): 717–22, 1999*

7. **Bermudez L.E., Sangari F.J., Kolonoski P., Petrofsky M., Goodman J.** The efficiency of the translocation of Mycobacterium tuberculosis across a bilayer of epithelial and endothelial cells as a model of the alveolar wall is a consequence of transport within mononuclear phagocytes and invasion of alveolar epithelial cells. *Infect Immun. 70(1): 140-6, 2002*

8. **Birkness K.A., Deslauriers M., Bartlett J.H., White E.H., King C.H., Quinn F.D.** An in vitro tissue culture bilayer model to examine early events in Mycobacterium tuberculosis infection. *Infect Immun. 67(2): 653-8, 1999*

9. **Bless N.M., Huber-Lang M., Guo R.F., Warner R.L., Schmal H., Czermak B.J., Shanley T.P., Crouch L.D., Lentsch A.B., Sarma V., Mulligan M.S., Friedl H. P. and Ward P.A.** Role of CC chemokines (Macrophage Inflammatory Protein-1b, Monocyte Chemoattractant Protein-1, RANTES) in acute lung injury in rats. *J Immunol., 164: 2650–9, 2000*

10. **Bøyum A.,** Separation of white blood cells. *Nature 204: 793-4, 1964*

11. **Center D.M.** A role for the alveolar epithelium in recruitment of mononuclear cells into the lung. *J Clin Invest. 106(6): 741-3, 2000*

12. **Chaly Y.V., Selvan R.S., Fegeding K.V., Kolesnikova T.S., Voitenok N.N.** Expression of IL-8 gene in human monocytes and lymphocytes: differential regulation by TNF and IL-1. *Cytokine 12(6): 636–43, 2000*

13. **Chuluyan H.E., Osborn L., Lobb R., Issekutz A.C.** Domains 1 and 4 of vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) both support very late activation antigen-4 (CD49d/CD29)-dependent monocyte transendothelial migration. *J Immunol. 155(6): 3135-4, 1995*

14. **Chuluyan H.E., Issekutz A.C.** VLA-4 integrin can mediate CD11/CD18-independent transendothelial migration of human monocytes. *J Clin Invest. 92(6): 2768-77, 1993*

15. **Coldren C.D., Nick J.A., Poch K.R., Woolum M.D., Fouty B.W., O'Brien J.M., Gruber M.P., Zamora M.R., Svetkauskaite D., Richter D.A., He Q., Park J.S., Overdier K.H., Abraham E., Geraci M.W.**
Functional and genomic changes induced by alveolar transmigration in human neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 291(6): 1267-76, 2006*

16. **Crestani B., Cornillet P., Dehoux M., Rolland C., Guenounou M., Aubier M.**
Alveolar type II epithelial cells produce interleukin-6 in vitro and in vivo.
Regulation by alveolar macrophage secretory products. *J Clin Invest. 94(2): 731-40, 1994*

17. **De Rossi L.W., Horn N., Weingartz E., Buhre W., Rossaint R.**
Effect of isoflurane on monocyte adhesion molecule expression in human whole blood
Acta Anaesthesiol Scand. 47(5): 559-63, 2003

18. **Dietel M., Dudenhausen J., Suttorp N.** (Herausg.) Harrisons Innere Medizin: Störungen der Granulozyten und Monozyten. *1(2): 415-6* und Erkrankungen v. Immunsystem, Bindegewebe u. Gelenken. *(2)12: 1984-2006, 15.Aufl., ABW Wissenschaftsverlag 2003*

19. **Doherty D.E., Haslett C., Tonnesen M.G., Henson P.M.** Human monocyte adherence: A primary effect of chemotactic factors on the monocyte to stimulate adherence to human endothelium. *J Immunol. 138(6): 1762-71, 1987*

20. **Eger G., Kalden J.**: Immunologie internistischer Erkrankungen aus: **Schettler G.**, **Greten H.** *Innere Medizin, S. 1177-88, 9. Aufl., Thieme Verlag 1998*

21. **Eghtesad M., Jackson H. E. & Cunningham A. C.** Primary human alveolar epithelial cells can elicit the transendothelial migration of CD14+ monocytes and CD3+ lymphocytes. *Immunology 102: 157-64, 2001*

22. **Eissner G., Lindner H., Konur A., Kreutz M., Andreesen R. & Holler E.**
Naive monocytes can trigger transendothelial migration of peripheral blood cells through the induction of endothelial Tumour Necrosis Factor-α
Scand J Immunol. 51(3): 251-61, 2000

23. **Ellmerich S., Djouder N., Schöller M., Klein J.-P.** Production of cytokines by monocytes, epithelial and endothelial cells activated by streptococcus bovis *Cytokine 12(1): 26–31, 2000*

24. **Emmler J., Hermanns M.I., Steinritz D., Kreppel H., Kirkpatrick C.J., Bloch W., Szinicz L., Kehe K.** Assessment of alterations in barrier functionality and induction of proinflammatory and cytotoxic effects after sulfur mustard exposure of an in vitro coculture model of the human alveolo-capillary barrier. *Inhal Toxicol. 19(8): 657-65, 2007*

25. **Engvall E., Perlman P.** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry Bd. 8: 871-74, 1971*

26. **Estcourt C., Rousseau Y., Sadeghi H.M., Thieblemont N., Carreno M.-P., Weiss L. and Haeffner-Cavaillon N.** Flow-cytometric assessment of in vivo cytokine-producing monocytes in HIV-infected patients. *Clin Immunol Immunpathol. 83(1): 60 –7, 1997*

27. **Eue I., Pietz B., Storck J., KIempt M. and Sorg C.** Transendothelial migration of $27E10^{+}$ human monocytes. *Int Immunol. 12(11): 1593-604, 2000*

28. **Fakler C. R., Wu B., McMicken H.W., Geske R. S. and Welty S. E.** Molecular mechanisms of LPS induced ICAM-1 expression in A549 cells *Inflamm Res. 49(2): 63–72, 2000*

29. **Foster K. A., Oster C. G., Mayer M. M., Avery M. L. and Audus K. L.** Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Exp Cell Res. 243(2): 359–66, 1998*

30. **Fowler A. A., Hyers T.M., Fisher B.J., Bechard D.E., Centor R.M., Webster R.O.** The adult respiratory distress syndrome. Cell populations and soluble mediators in the air spaces of patients at high risk. *Am Rev Respir Dis. 136(5): 1225-31, 1987*

31. **Fritsch G., Ströbel T., Dworzak M.D., Buchinger P., Printz D., Gadner H.** Single and multicolor flow cytometric CD34 analysis in different cell sources. *Prog Clin Biol Res. 389: 325-30, 1994*

32. **Frokjaer J., Deleuran B., Lind M., Overgaard S., Soballe K., Bunger C.** Polyethylene particles stimulate monocyte chemotactic and activating factor production in synovial mononuclear cells in vivo. An immunohistochemical study in rabbits. *Acta Orthop Scand. 66(4): 303-7, 1995*

33. **Fuentes M.E., Durham S.K., Swerdel M.R., Lewin A.C., Barton D.S., Megill J.R., Bravo R. and Lira S.A.** Controlled recruitment of monocytes and macrophages to specific organs through transgenic expression of monocyte chemoattractant protein-1. *J Immunol. 155(12): 5769-76, 1995*

34. **Giard D.J., Aaronson S.A., Todaro G.J., Arnstein P., Kersey J.H., Dosik H., Parks W.P.** In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst. 51(5): 1417-23, 1973*

35. **Giuffre L., Cordey A.-S., Monai N., Tardy Y., Schapira M. and Spertini O.** Monocyte adhesion to activated aortic endothelium: role of L-Selectin and heparan sulfate proteoglycans. *J Cell Biol. 136(4): 945–56, 1997*

36. **Goodman R.B., Pugin J., Lee J.S., Matthay M.A.** Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. *Cytokine Growth Factor Rev. 14(6): 523-35, 2003*

37. **Grisar J., Aringer M., Koller M.D., Stummvoll G.H., Eselbock D., Zwolfer B., Steiner C.W., Zierhut B., Wagner L., Pietschmann P., Smolen J.S.** Leflunomide inhibits transendothelial migration of peripheral blood mononuclear cells. *Ann Rheum Dis. 63(12): 1632-7, 2004*

38. **Gunn M.D., Nelken N.A., Liao X. and Williams L.T.** Monocyte chemoattractant protein-1 is sufficient for the chemotaxis of monocytes and lymphocytes in transgenic mice but requires an additional stimulus for inflammatory activation. *J Immunol 158(1): 376-83, 1997*

39. **Hakkert B.C., Kuijpers T.W., Leeuwenberg J.F.M., van Mourik J.A., Roos D.** Neutrophil and monocyte adherence to and migration across monolayers of cytokine-activated endothelial cells: The contributions of CD18, ELAM-1, and VLA-4. *Blood 78(10): 2721-6, 1991*

40. **Haller D., Serrant P., Granato D., Schiffrin E. J., Blum S.** Activation of human NK cells by staphylococci and lactobacilli requires cell contact-dependent costimulation by autologous monocytes. *Clin Diagn Lab Immunol. 9(3): 649–57, 2002*

41. **Hasleton P.S., Roberts T.E.** Adult respiratory distress syndrome - an update. *Histopathology 34(4): 285-94, 1999*

42. **Herbein G., Doyle A.G., Montaner L.J., Gordon S**. LPS down-regulates CD4 expression in primary human macrophages through induction of endogenous tumour necrosis factor (TNF) and IL-1β. *Clin Exp Immunol. 102(2): 430-7, 1995*

43. **Hermanns M.I., Unger R.E., Kehe K., Peters K., Kirkpatrick C.J.** Lung epithelial cell lines in coculture with human pulmonary microvascular endothelial cells: development of an alveolo-capillary barrier in vitro. *Lab Invest. 84(6): 736-52, 2004*

44. **Herold S., von Wulffen W., Steinmueller M., Pleschka S., Kuziel W.A., Mack M., Srivastava M., Seeger W., Maus U.A., Lohmeyer J.** Alveolar epithelial cells direct monocyte transepithelial migration upon influenza virus infection: impact of chemokines and adhesion molecules. *J Immunol. 177(3): 1817-24, 2006*

45. **Hoffmann G., Grote J., Friedrich F.** The pulmonary epithelial cell line L2 as a new model for an inducible nitric oxide synthase expressing distal airway epithelial cell. *Biochem Biophys Res Commun.; 217(2): 575-83, 1995*

46. **Hoffmann G., Rieder J., Smolny M., Seibel M., Wirleitner B., Fuchs D. & Schobersberger W.** Neopterin-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in typeII-like alveolar epithelial cells *Clin Exp Immunol. 118(3): 435-40, 1999*

47. **Hu M., Lin X., Du Q., Miller E.J., Wang P., Simms H.H.** Regulation of polymorphonuclear leukocyte apoptosis: role of lung endothelium-epithelium bilayer transmigration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 288: 266-74, 2005*

48. **Isler P., Galve de Rochemonteix B., Songeon F., Boehringer N.and Nicod L.P.** Interleukin-12 production by human alveolar macrophages is controlled by the autocrine production of interleukin-10. *Am J Respir Cell Mol Biol. 20(2): 270–78, 1999*

49. **Issekutz T.B.** In vivo blood monocyte migration to acute inflammatory reactions, IL-1α, TNF-α, IFN-γ, and C5a utilizes LFA-1, Mac-1, and VLA-4. *J Immunol. 154(12): 6533-40, 1995*

50. **Jones D.A., Smith C.W., Picker L.J., McIntire L.V.** Neutrophil adhesion to 24 hour IL-1-stimulated endothelial cells under flow conditions. *J Immunol. 157(2): 858-63, 1996*

51. **Jung T., Schauer U., Heusser C., Neumann C., Rieger C.** Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods 159(1-2): 197-207, 1993*

52. **Kahler C.M., Kaufmann G., Hogue-Angeletti R., Fischer-Colbrie R., Dunzendorfer S., Reinisch N., Wiedermann C.J.** A soluble gradient of the neuropeptide secretoneurin promotes the transendothelial migration of monocytes in vitro. *Eur J Pharmacol. 365(1): 65–75, 1999*

53. **Kasahara K., Strieter R.M., Chensue S.W., Standiford T.J., Kunkel S.L.** Mononuclear cell adherence induces neutrophil chemotactic factor/interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol. 50(3): 287-95, 1991*

54. **Katoh N., Kraft S., Weßendorf J.H.M.and Bieber T.** The high-affinity IgE receptor (FceRI) blocks apoptosis in normal human monocytes. *J Clin Invest. 105(2): 183–90, 2000*

55. **Kopydlowski K.M., Salkowski C.A., Cody M.J., van Rooijen N., Major J.,Hamilton T.A. and Vogel S.N.** Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. *J Immunol. 163(3): 1537–44, 1999*

56. **Koyama S., Sato E., Nomura H., Kubo K., Miura M., Yamashita T., Nagai S., Izumi T.** Monocyte chemotactic factors released from type II pneumocytelike cells in response to TNF-a and IL-1a. *Eur Respir J. 13(4): 820-8, 1999*

57. **Koyama S., Sato E., Nomura H., Kubo K., Miura M., Yamashita T., Nagai S., Izumi T.** The potential of various lipopolysaccharides to release monocyte chemotactic activity from lung epithelial cells and fibroblasts. *Eur Resp J. 14(3): 545-52, 1999*

58. **Krampera M., Tavecchia L., Benedetti F., Nadali G., Pizzolo G.** Intracellular cytokine profile of cord blood T-, and NK- cells and monocytes. *Haematologica 85(7): 675-9, 2000*

59. **Kukreti S., Konstantopoulos K., Smith C.W., McIntire L.V.** Molecular mechanisms of monocyte adhesion to interleukin-1 beta-stimulated endothelial cells under physiologic flow conditions. *Blood 89(11): 4104-11, 1997*

60. **Landsman L., Jung S.** Lung macrophages serve as obligatory intermediate between blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol. 179(6): 3488-94, 2007*

61. **Leonard E.J., Yoshimura T.** Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol Today 11(3): 97-101, 1990*

62. **Levitz S. M., North E.A., Jiang Y., Nong S.-H., Kornfeld H., Harrison T.S.** Variables affecting production of monocyte chemotactic factor 1 from human leukocytes stimulated with cryptococcus neoformans. *Infect Immun. 65(3): 903–8, 1997*

63. **Li W., Chung S.C.** Flow cytometric evaluation of leukocyte function in rat whole blood. *In Vitro Cell Dev Biol Anim. 39(10): 413-9, 2003*

64. **Lieber M., Smith B., Szakal A., Nelson-Rees W., Todaro G.** A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer 17(1): 62-70, 1976*

65. **Liebler J.M., Kunkel S.L., Burdick M.D., Standiford T.J., Rolfe M.W. and R.M.** Production of IL-8 and monocyte chemotactic peptide-1 by peripheral blood monocytes. Disparate responses to phytohemagglutinin and lipopolysaccharide *J Immunol. 152(1): 241-9, 1994*

66. **Luhrmann A., Bargsten G., Kuzu M., Koslowski R., Pabst R., Tschernig T.** The alveolar epithelial type I-like cell line as an adequate model for leukocyte migration studies in vitro. *Exp Toxicol Pathol. 58(5): 277-83, 2007*

67. **Lukacs N.W., Strieter R.M., Elner V., Evanoff H.L., Burdick M.D., Kunkel S.L.** Production of chemokines, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 during monocyte endothelial cell interactions. *Blood 86: 2767–73, 1995*

68. **Luscinskas F.W., Ding H., Tan P., Gumming D., Tedder T.F. and Gerritsens M.E.** L- and P-Selectins, but not CD49d (VLA-4) Integrins, mediate monocyte initial attachment to TNF-a-activated vascular endothelium under flow *in vitro* *J Immunol. 157(1): 326-35, 1996*

69. **Madjdpour C., Oertli B., Ziegler U., Bonvini J.M., Pasch T. and Beck-Schimmler B.** Lipopolysaccharide induces functional ICAM-1 expression in rat alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 278(3): 572-79, 2000*

70. **Maino V.C., Picker L.J.** Identification of functional subsets by flow cytometry: intracellular detection of cytokine expression. *Cytometry 34(5): 207-15, 1998*

71. **Matsushima K., Baldwin E.T., Mukaida N.**
Interleukin-8 and MCAF: novel leukocyte recruitment and activating cytokines.
Chem Immunol. 51: 236-65, 1992

72. **Maus U.A., Herold S., Schlingensiepen K.H., Schlingensiepen R., Dormayr T., Rosseau S., Maus R., Seeger W., Lohmeyer J.** Antisense oligomers for selective suppression of MCP-1 synthesis in human pulmonary endothelial cells.
Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 10(3): 185-93, 2000

73. **Maus U., Huwe J., Ermert L., Ermert M., Seeger W.and Lohmeyer J.**
Molecular pathways of monocyte emigration into the alveolar air space of intact mice
Am J Respir Crit Care Med. 165(1): 95–100, 2002

74. **Maus U., Herold S., Muth H., Maus R., Ermert L., Ermert M., Weissmann N., Rosseau S., Seeger W., Grimminger F.and Lohmeyer J.** Monocytes recruited into the alveolar air space of mice show a monocytic phenotype but upregulate CD14.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 280(1): 58-68, 2001

75. **Mc Gettrick H.M., Lord J.M., Wang K.Q., Rainger G.E., Buckley C.D., Nash G.B.** Chemokine- and adhesion-dependent survival of neutrophils after transmigration through cytokine-stimulated endothelium. *J Leukoc Biol. 79: 779-88, 2006*

76. **Mc Gilvray I.D., Tsai V., Marshall J.C., Dackiw A.P., Rotstein O.D.** Monocyte adhesion and transmigration induce tissue factor expression: role of the mitogen-activated protein kinases. *Shock 18(1): 51-7, 2002*

77. **Meerschaert J., Furie M.B.** The adhesion molecules used by monocytes for migration across endothelium include CD11a/CD18, CD11b/CD18, and VLA-4 on monocytes and ICAM-1, VCAM-1, and other ligands on endothelium.
J Immunol. 154(8): 4099-112, 1995

78. **Mühl H. and Dinarello C.A.**
Macrophage inflammatory protein-1α production in lipopolysaccharide-stimulated human adherent blood mononuclear cells is inhibited by the nitric oxide synthase inhibitor N-Monomethyl-L-Arginine. *J Immunol. 159(10): 5063-69, 1997*

79. **Muller W.A., Randolph G.J.**
Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes *J Leukoc Biol. 66(5): 698-704, 1999*

80. **Muller W.A., Weigl S.A.**
Monocyte-selective transendothelial migration: dissection of the binding and transmigration phases by an in vitro assay. *J Exp Med. 176(3): 819-28, 1992*

81. **Nomura H., Sato E., Koyama S., Haniuda M., Kubo K., Nagai S.and Izumi T.**
Histamine stimulates alveolar macrophages to release neutrophil and monocyte chemotactic activity. *J Lab Clin Med. 138(4): 226-35, 2001*

82. **Odrljin T.M., Haidaris C.G., Lerner N.B. and Simpson-Haidaris P.J.**
Integrin avβ3-mediated endocytosis of immobilized fibrinogen by A549 lung alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol 24(1): 12–21, 2001*

83. **Padura I.M., Lostaglio S., Schneemann M., Williams L., Romano M., Fruscella P., Panzeri C., Stoppacciaro A., Ruco L., Villa A., Simmons D., Dejana E.**
Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration
J Cell Biol. 142(1): 117–27, 1998

84. **Paine R., Rolfe M.W., Standiford T.J., Burdick M.D., Rollins B.J. and Stricter R.M.**
MCP-1 expression by rat type II alveolar epithelial cells in primary culture.
J Immunol. 150(10): 4561-70, 1993

85. **Pan L.H., Ohtani H., Yamauchi K., Nagura H.** Co-expression of TNF alpha and IL-1 beta in human acute pulmonary fibrotic diseases: an immunohistochemical analysis.
Pathol Int. 46(2): 91-9, 1996

86. **Papst R.** Das mononukleäre Phagozytensystem aus: **Drenckhahn D., Zenker W.** Benninghoff-Anatomie (Band 1), *S. 755-6, 15. Aufl. Urban & Schwarzenberg 1994*

87. **Picker L.J., Singh M.K., Zdraveski Z., Treer J.R., Waldrop S.L., Bergstresser P.R., Maino V.C.** Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry. *Blood 86(4): 1408-19, 1995*

88. **Pottratz S.T., Reese S. and Sheldon J. L.** Pneumocystis carinii induces interleukin 6 production by an alveolar epithelial ceIl line
Eur J Clin Invest. 28(5): 424-29, 1998

89. **Reymond N., Imbert A.M., Devilard E., Fabre S., Chabannon C., Xerri L., Farnarier C., Cantoni C., Bottino C., Moretta A., Dubreuil P., Lopez M.** DNAM-1 and PVR regulate monocyte migration through endothelial junctions.
J Exp Med. 199(10): 1331-41, 2004

90. **Reynolds H.Y.** Modulating airway defenses against microbes
Curr Opin Pulm Med. 8(3): 154-65, 2002

91. **Rintahaka J., Wiik D., Kovanen P.E., Alenius H., Matikainen S.**
Cytosolic antiviral RNA recognition pathway activates caspases 1 and 3.
J Immunol. 180(3): 1749-57, 2008

92. **Rogers P.D., Stiles J.K., Chapman S.W. and Cleary J.D.**
Amphotericin B induces expression of genes encoding chemokines and cell adhesion molecules in the human monocytic cell Line THP-1
J Infect Dis. 182(4): 1280–3, 2000

93. **Rosseau S., Hammerl P., Maus U., Walmrath H.-D., Schütte H., Grimminger F., Seeger W. and Lohmeyer J.** Phenotypic characterization of alveolar monocyte recruitment in acute respiratory distress syndrome
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 279(1): 25-35, 2000

94. **Rosseau S., Selhorst J, Wiechmann K., Leissner K., Maus U., Mayer K., Grimminger F., Seeger W., Lohmeyer J.** Monocyte migration through the alveolar epithelial barrier: adhesion molecule mechanisms and impact of chemokines *J Immunol 164(1): 427-35, 2000*

95. **Rosseau S., Suttorp N.** Ambulant erworbene Infektionen der Atemwege und des Lungenparenchyms - Klinische und experimentelle Aspekte *Der Internist 41: 1158-69, 2000*

96. **Sar B., Oishia K., Wadab A., Hirayamab T., Matsushimac K.& Nagatakea T.** Induction of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) production by Pseudomonas nitrite reductase in human pulmonary type II epithelial-like cells *Microbial Pathogenesis 28: 17–23, 2000*

97. **Schuerwegh A.J., Stevens W.J., Bridts C.H., De Clerck L.S.** Evaluation of monensin and brefeldin A for flow cytometric determination of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in monocytes. *Cytometry 46(3): 172-6, 2001*

98. **Schumann R.R.,Belka C.,Reuter D., Lamping N., Kirschning C.J.,Weber J.R., Pfeil D.** Lipopolysaccharide activates caspase-1 (interleukin-1–converting enzyme) in cultured monocytic and endothelial cells. *Blood 91(2): 577-84, 1998*

99. **Selhorst J., Rosseau S., Fischer T., Meyer J.K., Moderer S., Grimminger F., Seeger W., Lohmeyer J.** Monocyte migration through endothelial/epithelial bilayer in vitro. *Am J Resp Crit Care Med. 163(5): suppl. A987, 2001*

100. **Shang X.Z., Lang B.J., and Issekutz A.C.** Adhesion molecule mechanisms mediating monocyte migration through synovial fibroblast and endothelium barriers: role for CD11/CD18, very late antigen-4 (CD49d/CD29), very late antigen-5 (CD49e/CD29), and vascular cell adhesion molecule-1 (CD106). *J Immunol. 160(1): 467-74, 1998*

101. **Standiford T.J., Kunkel S.L., Phan S.H., Rollins B.J. and Strieter R.M.** Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. *J Biol Chem. 266(15): 9912-18, 1991*

102. **Steube K.G., Meyer C., Drexler H.G.** Constitutive protein expression of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) by myelomonocytic cell lines and regulation of the secretion by anti- and proinflammatory stimuli. *Leuk Res. 23(9): 843–49, 1999*

103. **Strey A., Janning A., Barth H., Gerke V.** Endothelial Rho signaling is required for monocyte transendothelial migration. *FEBS Lett. 517(1-3): 261-6, 2002*

104. **Takabayshi K., Corr M., Hayashi T., Redecke V., Beck L., Guiney D., Sheppard D., Raz E.** Induction of a homeostatic circuit in lung tissue by microbial compounds. *Immunity 24(4):* 475-87, *2006*

105. **Takahashi M., Ikeda U., Kasahara T., Kitagawa S., Takahashi Y., Shimada K., Kano S., Morimoto C., Masuyama J.** Activation of human monocytes for enhanced production of interleukin 8 during transendothelial migration in vitro. *J Clin Immunol. 17(1): 53-62, 1997*

106. **Takahashi M., Masuyama J., Ikeda U., Kasahara T., Kitagawa S., Takahashi Y., Shimada K., Kano S.** Induction of monocyte chemoattractant protein-1 synthesis in human monocytes during transendothelial migration in vitro. *Circ Res. 1995 May;76(5):750-7*

107. **Takeuchi O., Sato S., Horiuchi T., Hoshino K., Takeda K., Dong Z., Modlin R.L., Akira S.** Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol. 169(1): 10-4, 2002*

108. **Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C.** A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods 184(1): 39-51, 1995*

109. **Vestweber D.** Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. *Immunol Rev. 218: 178-96, 2007*

110. **Wang Z.M, Liu C.and Dziarski R**. Chemokines are the main proinflammatory mediators in human monocytes activated by staphylococcus aureus,peptidoglycan and endotoxin.
J Biol Chem. 275(27): 20260–67, 2000

111. **Welsh D.A., Mason C.M.** Host defense in respiratory infections
Med Clin North Am. 85(6): 1329-47, 2001

112. **Willis C., Morris J.M., Danis V., Gallery E.D**. Cytokine production by peripheral blood monocytes during the normal human ovulatory menstrual cycle.
Hum Reprod. 18(6): 1173-8, 2003

113. **Wood E.M., Colton E., Yomtovian R.A., Currie L.M., Connor J., Anderson J.M.** Prevention of monocyte adhesion and inflammatory cytokine production during blood platelet storage: an in vitro model with implications for transfusion practice**.**
J Biomed Mater Res. 51(2): 147-54, 2000

114. **Yamada A.; Hara A.; Inoue M.; Kamizono S.; Higuchi T.; Itoh K.** β2-integrin-mediated signal up-regulates counterreceptor ICAM-1 expression on human monocytic cell line THP-1 through tyrosine phosphorylation
Cell Immunol. 178(1): 9-16, 1997

115. **Yano S., Yanagawa H., Nishioka Y., Mukaida N., Matsushima K.and Sone S.** T helper 2 cytokines differently regulate monocyte chemoattractant protein-1 production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages
J Immunol. 157(6): 2660-65, 1996

116. **Zapolska-Downar D., Zapolski-Downar A., Markiewski M., Ciechanowicz A., Kaczmarczyk M. and Naruszewicz M.** Selective inhibition by α-tocopherol of vascular cell adhesion molecule-1 expression in human vascular endothelial cells
Biochem Biophys Res Commun. 274(3), 609-15, 2000

117. **Zhou Y., Yang Y., Warr G. and Bravo R.** LPS down-regulates the expression of chemokine receptor CCR2 in mice and abolishes macrophage infiltration in acute inflammation. *J Leukoc Biol. 65(2): 265-9, 1999*

10 Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt zu haben, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus – Liebig – Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

(gez. T. Fischer)

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Lohmeyer ganz herzlich für die Überlassung des Themas sowie die Unterstützung und Diskussionsbereitschaft bei der Erstellung der Arbeit danken.

Den fachlichen Betreuern Frau Dr. Rosseau und Herrn Dr. Selhorst gilt mein Dank, insbesondere Herrn Dr. Selhorst für die Etablierung, Bereitstellung und intensive Einführung in die experimentellen Versuchsanordnungen sowie Methoden auf deren Grundlagen die Ergebnisse dieser Arbeit basieren.

Ebenso danken möchte ich Frau Lohmeyer, Frau Moderer, Frau Maus und Herrn Dr. Maus sowie Frau Mansouri für die routinierte (labor-)technische Unterstützung wie Zellkultivierung, Bestellung verschiedener Materialien und vielerlei unentbehrliche Tipps.

Herrn Prof. Dr. Seeger und seinen Mitarbeitern danke ich für die Bereitstellung von Geräten, Materialien und die kollegiale Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft in den Laboratorien.

Meiner Frau Birgit möchte ich ganz besonders Danken für die mir entgegengebrachte Geduld und die Entlastung von der täglich anfallenden häuslichen Arbeit in der Zeit vor der Fertigstellung dieser Arbeit.