

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

**Caspase-1 abhängige-/unabhängige Freisetzung
von Interleukin-1 β (IL-1 β) durch Einsatz der
experimentellen Photopherese**

eingereicht im Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

von
Erhan Yakut
aus Lünen

Gießen, 2013

Mit Genehmigung des Fachbereichs der Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:

Prof. Dr. H. Zorn

Gutachter:

Prof. Dr. H. Hackstein

Prof. Dr. M. U. Martin

Tag der Disputation:

*„Verzicht auf das Wagnis,
einmal zur Gewöhnung geworden, bedeutet im geistigen Bezirk immer den
Tod“*

Max Frisch

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	SUMMARY	3
3	EINLEITUNG	4
3.1	DAS IMMUNSYSTEM	4
3.1.1	<i>Angeborenes Immunsystem</i>	<i>4</i>
3.1.1.1	Zelluläre Erkennungsrezeptoren.....	5
3.1.1.2	Inflammasom.....	6
3.1.1.2.1	Zusammenbau und Aktivierung der Inflammasome	7
3.1.1.3	Interleukin-1 β (IL-1 β).....	12
3.1.2	<i>Dendritische Zellen (DZ).....</i>	<i>13</i>
3.2	EXTRAKORPORALE PHOTOPHERESE (ECP)	15
3.2.1	<i>Ultraviolette Strahlung (UV-Licht).....</i>	<i>16</i>
3.2.2	<i>Psoralen</i>	<i>17</i>
3.2.3	<i>Klinische Durchführung der ECP.....</i>	<i>18</i>
3.2.4	<i>Mechanismen der ECP / Immunmodulatorische Effekte der ECP.....</i>	<i>19</i>
3.3	ZIELSETZUNG	21
4	MATERIAL UND METHODEN.....	22
4.1	MATERIALIEN	22
4.1.1	<i>Geräte und Zubehör.....</i>	<i>22</i>
4.1.2	<i>Verbrauchsmaterial</i>	<i>23</i>
4.1.3	<i>Antikörper.....</i>	<i>24</i>
4.1.4	<i>Micro-Beads</i>	<i>25</i>
4.1.5	<i>Chemikalien.....</i>	<i>25</i>
4.1.6	<i>Weitere Reagenzien.....</i>	<i>27</i>
4.1.7	<i>Zytokine</i>	<i>27</i>
4.2	METHODEN	28
4.2.1	<i>Murine Zellisolationmethoden</i>	<i>28</i>
4.2.1.1	Gewinnung von Leukozyten aus der Milz	28
4.2.1.2	Anreicherung von murinen Monozyten mit Hilfe der <i>Magnetic Cell Separation</i> . (MACS)	29
4.2.1.3	Gewinnung von Peritoneal-Makrophagen durch Adhärenz	30
4.2.1.4	Differenzierung von Makrophagen aus dem Knochenmark mit L929-Überstand	31
4.2.1.5	In-Vitro Expansion von murinen dendritischen Zellen.....	32
4.2.2	<i>Anreicherung von peripheren humanen mononukleären Leukozyten (PBMCs).....</i>	<i>32</i>

4.2.3	<i>Klinische Proben</i>	34
4.2.4	<i>Versuchsaufbau der experimentellen Photopherese</i>	34
4.2.5	<i>Biochemische und immunologische Methoden</i>	35
4.2.5.1	Apoptose-Messung	35
4.2.5.2	Zellzahlbestimmung	36
4.2.5.3	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) zum Nachweis von „mature“-</i> und pro-IL-1 β	36
4.2.5.4	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) IL-18</i>	37
4.2.5.5	Durchflusszytometrie.....	38
4.2.5.6	Western Blot.....	39
4.2.6	<i>Statistik</i>	40
5	ERGEBNISSE	41
5.1	VALIDIERUNG DER EXPERIMENTELLEN PHOTOPHERESE.....	41
5.1.1	<i>Apoptoseinduktion</i>	41
5.2	MODULATION DER IL-1B FREISETZUNG IN MURINEN ZELLEN DURCH EXPERIMENTELLE PHOTOPHERESE	44
5.2.1	<i>Vorversuche in Milz-Zellen und CD11b⁺-Zellen</i>	44
5.2.2	<i>Peritoneal-Makrophagen</i>	45
5.2.3	<i>Makrophagen aus Knochenmark</i>	46
5.2.4	<i>Dendritische Zellen</i>	48
5.2.4.1	Durchflusszytometrische Kontrolle der DZ-Differenzierung	48
5.2.4.2	IL-1 β Freisetzung in Anwesenheit von LPS	49
5.2.4.2.1	Western Blot Analyse zu C57BL6/N Wildtyp-Maus	51
5.2.4.2.2	Einfluss der ATP-Hydrolyse	52
5.2.4.3	IL-1 β Freisetzung in Abwesenheit von LPS	55
5.2.5	<i>Untersuchung von gendefizienten Mäusen</i>	58
5.2.5.1	Western-Blot Analysen mit ASC- und Caspase-1 Knockout-Mäusen	64
5.3	MODULATION DER IL-1B UND IL-18 FREISETZUNG IN HUMANEN ZELLEN DURCH EXPERIMENTELLE PHOTOPHERESE.....	67
5.3.1	<i>Humane mononukleäre Leukozyten (PBMCs) in Anwesenheit von LPS</i>	67
5.3.2	<i>Western Blot Analysen zur IL-1β Freisetzung</i>	70
5.3.3	<i>Einfluss des Caspase-1- (z-YVAD-FMK) Inhibitors auf die IL-18 Freisetzung</i>	72
5.4	UNTERSUCHUNG KLINISCHER PROBEN	73
6	DISKUSSION	78
6.1	APOPTOSEINDUKTION IN MURINEN LEUKOZYTEN NACH EXPERIMENTELLER PHOTOPHERESE BEHANDLUNG	78

6.2	EINFLUSS DER EXPERIMENTELLEN PHOTOPHERESE AUF DIE ZYTOKINFREISETZUNG.....	79
6.2.1	<i>LPS-geförderte IL-1β Freisetzung in murinen Peritoneal-Makrophagen, L929-generierten Makrophagen und DZ.....</i>	80
6.2.2	<i>LPS-unabhängige IL-1β Freisetzung in murinen DZ.....</i>	86
6.2.3	<i>Einfluss der experimentellen Photopherese auf die IL-1β und IL-18 Freisetzung in humanen Zellen.....</i>	87
6.2.4	<i>Vergleich der IL-1β Freisetzung in murinen und humanen Zellen.....</i>	88
6.2.5	<i>Bestätigende Untersuchungen anhand klinischer Proben.....</i>	89
6.3	EINGRENZEN DES SIGNALWEGS MIT GENDEFIZIENTEN MÄUSEN.....	90
7	LITERATURVERZEICHNIS	95
8	ANHANG.....	106
8.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	106
8.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	110
8.3	TABELLENVERZEICHNIS	112
8.4	DANKSAGUNG.....	113
8.5	EIDESSTAATLICHE ERKLÄRUNG	114

1 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die zellulären Wirkmechanismen der extrakorporalen Photopherese aufzuklären. Primär ging es darum, die zellulären Aktivierungswege aufzuklären, welche durch Einsatz der experimentellen Photopherese, zu einer Zytokinfreisetzung in Leukozyten führten. Dafür erfolgten in-vitro Versuche mit humanen- als auch murinen-Zelltypen, sowie klinischen Proben. Im Verlauf der Versuche stellte sich heraus, dass durch Einsatz der experimentellen Photopherese die eingesetzten Zellen soweit moduliert werden konnten, dass sie Interleukin-1 β freisetzen konnten. Es erfolgten Versuchsreihen in An- bzw. Abwesenheit der „*Priming*-Substanz“ LPS. Dabei konnte beobachtet werden, dass der Einsatz der experimentellen Photopherese in beiden Versuchsanordnungen in der Lage war eine IL-1 β Freisetzung zu verstärken. Die Freisetzungsrates war in Anwesenheit von LPS höher als in Abwesenheit. Jedoch konnte durch Versuche ohne LPS gezeigt werden, dass die experimentelle Photopherese die Freisetzung von IL-1 β verstärken kann, und somit als eine weitere Substanz identifiziert wurde die neben den aus der Literatur bekannten Substanzen auch in der Lage ist eine Entzündung hervorzurufen. Um bestimmen zu können, über welche zellulären Mechanismen bzw. über welchen Signalweg die Freisetzung erfolgte, wurden ausgewählte Knockout-Mäuse eingesetzt. Es stellte sich heraus, dass der Einsatz der experimentellen Photopherese die zur Prozessierung der pro-IL-1 β Form nötige Caspase-1 aktivieren kann, über die anschließend die Prozessierung anhand durchgeführter Western-Blots auch gezeigt werden konnte. Damit stellte sich die Frage, ob es sich bei diesem Prozess um eine Inflammasom-abhängige Freisetzung von IL-1 β handelt. Um die Frage beantworten zu können, wurden ASC- sowie AIM2-KO Mäuse in Anwesenheit von LPS mit experimenteller Photopherese behandelt. So konnte anhand von Western-Blot Analysen sowohl eine Caspase-1-Aktivierung als auch eine pro-IL-1 β -Prozessierung aufgezeigt werden. Die in Western-Blot erzielten Daten deckten sich somit mit aus dem Überstand mittels ELISA erzielten Zytokinmessungen, bei denen in allen eingesetzten Knockout-Mäusen eine IL-1 β Freisetzung nachweisbar war. Da eine Freisetzung maturen-IL-1 β auch in der Caspase-1-KO Maus nachgewiesen werden konnte, kann spekuliert werden, dass es sich bei der Prozessierung nicht nur um eine Caspase-1-abhängige, sondern

auch um eine Caspase-1-unabhängige Prozessierung handeln könnte. Die Ergebnisse belegen, dass die experimentelle Photopherese, sowohl über Caspase-1-abhängige als auch Caspase-1-unabhängige Signalwege die IL-1 β Freisetzung verstärkt.

Die Wirkung der experimentellen Photopherese auf die IL-1 β Freisetzung konnte auch anhand klinischer Proben bestätigt werden. So war es möglich im Vergleich zu unbehandelten Proben, eine erhöhte IL-1 β Freisetzung in ECP-behandelten Leukapheresat- und Vollblut-Proben von Patienten nachzuweisen.

2 Summary

The aim of the present work was to clarify the cellular mechanisms of action of the extracorporeal photopheresis, to try to explain the cellular activation pathways which, through the use of the experimental photopheresis, lead to cytokine release in leukocytes. In-vitro experiments were made with human and murine-cell types as well as with clinical samples. They revealed that the use of the experimental photopheresis modulates the cells to release interleukin-1 β . Experiments were made with and without the priming substance LPS. Both experimental setups showed that the application of the experimental photopheresis was able to promote IL-1 β release. The release rate was higher in the presence of LPS than in its absence. It was demonstrated however, that without LPS the experimental photopheresis can promote the release of IL-1 β and therefore, besides the substances known from the literature, reveal another substance that is also able to cause inflammation. Knockout mice were selected in order to be able to determine which cellular mechanisms or which signal pathway triggered the release. It turned out that the experimental photopheresis activates the caspase-1 which is necessary for the processing of the pro-IL-1 β form. This processing could be confirmed through western-blot. The question was raised then, whether this process was an inflammasome-dependent release of IL-1 β . To answer this question, ASC- and AIM2-KO mice were tested with experimental photopheresis in presence of LPS. Western-blot analyses revealed both a caspase-1 activation and a pro-IL-1 β -processing. These results were confirmed through ELISA cytokine measurements where a release of IL-1 β was detected in all the tested knockout mice. Since the release of mature-IL1 β was also demonstrated in the caspase-1-KO mice, one may speculate that the processing may not be exclusively caspase-1-dependent but also caspase-1-independent. It indicates that experimental photopheresis increases the IL-1 β release both through caspase-1-dependent and caspase-1-independent pathways.

We could confirm the effect of the experimental photopheresis on IL-1 β release also with the help of clinical samples. Thus it was possible to demonstrate that samples showed a raised IL-1 β release in ECP treated blood-leukapheresis and full blood-tests of patients after LPS priming when compared to controls.

3 Einleitung

3.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem dient der Abwehr von Krankheitserregern (wie Viren, Bakterien und Parasiten) und schädlichen Substanzen, mit denen der Organismus in Berührung kommt. Es ist ein Netzwerk humoraler und zellulärer Komponenten, die im Zusammenspiel den Organismus vor gesundheitsbedrohlichen Veränderungen schützt. Es ist zusammengesetzt aus einer schnellen angeborenen- und einer adaptiven Immunantwort (langsamer und antigenspezifischer).

3.1.1 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist eine schnell reagierende Form der Immunabwehr, welches vor allem bei der Bekämpfung von Infektionen entscheidend ist. Es ist phylogenetisch älter als das adaptive Immunsystem und sofort verfügbar. Zu den zellulären Bestandteilen gehören neben den phagozytierenden Zellen wie Monozyten/Makrophagen und neutrophilen Granulozyten auch zytotoxische Zellen wie die natürlichen Killerzellen. Des Weiteren besitzt es lösliche Faktoren, wie das Komplementsystem sowie Zytokine und Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen. Als Reaktion auf Eindringlinge, Verletzungen oder intrazellulären Stress kommt es zu einer Entzündungsreaktion. Diese Reaktion erfolgt schnell, und wird u.a. durch pro-inflammatorische Zytokine wie z.B. Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) oder Interleukin-1 β (IL-1 β) hervorgerufen. Damit das IL-1 β prozessiert und freigesetzt werden kann, ist die Ausbildung eines sogenannten Inflammasoms notwendig (Martinon et al., 2002).

Das Immunsystem ist ständig mit einer Vielzahl von potentiell pathogenen Erregern konfrontiert. Vertebraten als auch Insekten und Pflanzen besitzen sogenannte Muster-Erkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, „PRRs“). Mit Hilfe dieser Rezeptoren ist das Immunsystem in der Lage, eindringende Erreger aufzuspüren. Dabei werden hochgradig konservierte mikrobielle Molekularstrukturen (*pathogen-associated molecular patterns*, „PAMPs“) erkannt und gebunden. Die PRRs werden von phagozytierenden Zellen, wie z.B. Makrophagen oder Dendritische Zellen (DZ), des Immunsystems

auf ihrer Zelloberfläche exprimiert. Diese Zellen sind so in der Lage pathogene Motive wie *Lipopolysaccharide* („LPS“, Endotoxin aus der äußeren Wand Gram-negativer Bakterien), Peptidoglycan oder virale Produkte zu erkennen.

3.1.1.1 Zelluläre Erkennungsrezeptoren

Das angeborene Immunsystem hat zur Erkennung von mikrobiellen pathogenen und endogenen Signalen vier verschiedene PRRs ausgebildet: das Toll-like Rezeptor System (TLRs), die RIG-I-like Rezeptoren, die C-type lectin Rezeptoren (CLRs) sowie die *nucleotide-binding domain leucine-rich repeats* (NLRs) (Bauernfeind et al., 2011). Die wohl bekannteste Gruppe von PRR ist die der Toll-like receptors (TLR). Beim Menschen sind bis dato zehn Rezeptoren (TLR1-TLR10) auf Proteinebene charakterisiert worden (Kawai & Akira, 2007). TLR erkennen und binden extrazelluläre PAMPs oder DAMPs (*danger signals or damage-associated molecular patterns*) und führen zu Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden. TLR4 erkennt zum Beispiel LPS, worauf in der vorliegenden Arbeit ein besonderes Augenmerk liegt. Als DAMPs werden endogene Moleküle bezeichnet, welche bei Zellstress bzw. Zellschädigung gebildet werden (Matzinger, 2007). Die äußere Domäne aller TLRs besteht aus leucinreichen Repeats (LRRs), die zur Erkennung pathogener Strukturen dienen. Deren intrazelluläre Domäne weist eine sogenannte Toll/Interleukin-1 interagierende (TIR) Domäne auf (Trendelenburg, 2008).

Nachdem zum Beispiel ein PAMP von einem TLR4 erkannt wurde, können intrazellulär zwei verschiedene Wege zur Signaltransduktion eingeleitet werden. Es ist der MyD88 (*myeloid differentiation marker 88*)-abhängige und – unabhängige aber TRIF (*Toll IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing interferon*) -abhängige Weg. MyD88, TRIF, TIRAP (*TIR-associated protein*) und TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) sind Adaptorproteine die als Module fungieren an die intrazelluläre Kinasen und andere Enzyme binden (Land, 2010). Die Rekrutierung der Adaptorproteine ist dabei TLR abhängig, d.h. andere TLR rekrutieren bei Erkennung von anderen PAMPs auch andere Adaptorproteine. Die Adaptorproteine leiten die Signale weiter an verschiedene Kinasen wie z.B. IRAK- (*interleukin receptor-associated kinase*) oder MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein kinases*). Der Signalweg mündet schließlich in der Nuclear Factor-Kappa B

(NF- κ B)-vermittelten Transkription des pro-IL-1 β Gens, sowie der Expression der NALP-Proteine (NACHT-, LRR- and PYD-containing protein). Die NALP-Proteine stellen im Zusammenschluss einen Multiproteinkomplex namens Inflammasom dar.

3.1.1.2 Inflammasom

Inflammasome sind große zytosolische Multiproteinkomplexe, die sich als Antwort auf verschiedene Fremd- und Gefahrensignale im Zytosol formieren, und daraufhin entzündliche Caspasen aktivieren. Caspasen sind Zymogene. Diese werden als inaktive Vorstufen synthetisiert (Pro-Caspasen), und können erst nach spezifischer proteolytischer Spaltung ihre enzymatische Wirkung entfalten. Die Caspase-1 ist die am besten charakterisierte Caspase. Sie führt zur proteolytischen Aktivierung inaktiver Vorstufen der IL-1-Zytokinfamilie (Gadola, 2009). Inflammasome sind zusammengesetzt aus Mitgliedern der NLR-Familie (NLRP1, NLRP3, NLRC4 und AIM2), dem Adaptorprotein ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) und der Caspase-1 (Martinon & Tschopp, 2007). Es kann das angeborene Immunsystem aktivieren, aber auch zum apoptotischen Zelluntergang führen. Gebildet wird es hauptsächlich in Monozyten, Makrophagen aber auch in myeloiden DZ und neutrophilen Granulozyten. Es ist ein Zusammenschluss verschiedener Proteine, die mit Hilfe des ASC-Adaptorproteins miteinander verbunden sind. ASC ist ein duales Brückenmolekül mit einer N-terminalen Pyrin- und einer C-terminalen CARD-Domäne. Mit Hilfe der Pyrin-Domäne werden die Proteine der NLR-Familie, und mit Hilfe der CARD-Domäne die Caspase-1 gebunden. Die Caspase-1 besitzt seinerseits eine CARD-Domäne. Aufgrund dessen wurde die ASC auch als überbrückendes Molekül gewertet, welches für die Assoziation zwischen einigen NLR-Rezeptoren und Caspase-1 verantwortlich ist. Die Caspase-1 wird auch als „IL-1 β -converting enzyme“ oder kurz ICE bezeichnet. Die Inflammasome NLRP1, NLRP3 sowie AIM2 (*absent in melanoma 2*) aktivieren die Caspase-1 über das ASC. Lediglich das NLRC4 Inflammasom aktiviert die Caspase-1 auch ohne ASC. Mitglieder der NLR-Familie wie z.B. NLRP3 und NLRC4 umfassen entweder eine N-terminale PYD- oder CARD-Domäne, die für die Signaltransduktion zuständig ist, sowie eine zentrale *nucleotide binding domain* (NBD), das auch bekannt ist als NACHT Domäne und für die Oligomärisierung zuständig ist. Die LRR (*leucine rich*

repeat domain) befindet sich am C-terminalen Ende, agiert als eine auto-inhibitorische Domäne und dient der Erkennung pathogener Strukturen und „triggert“ die Zusammensetzung des Inflammasoms (Brodsky & Monack, 2009).

Der Aufbau bzw. Struktur der bekanntesten Inflammasome ist folgend dargestellt:

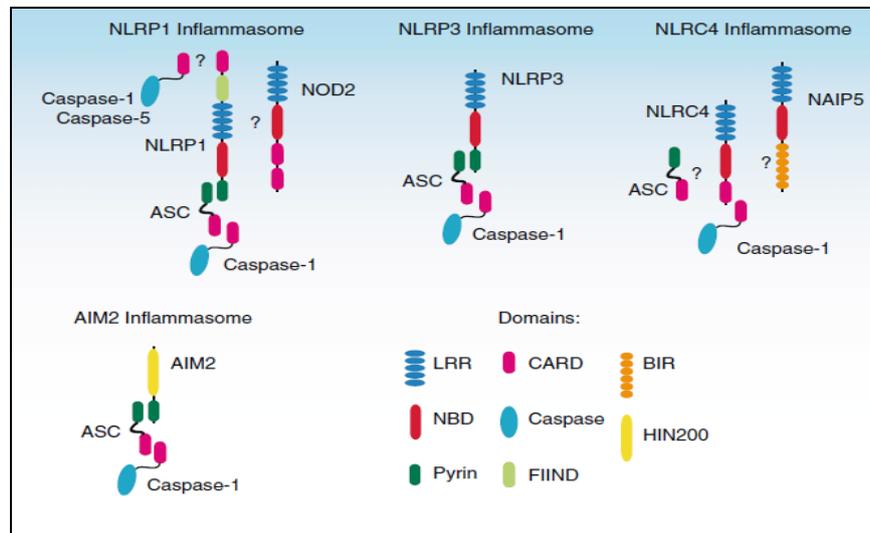


Abb. 1. *Inflammasome: Zusammenschluss verschiedener Proteine (Bauernfeind et al., 2011).*

3.1.1.2.1 Zusammenbau und Aktivierung der Inflammasome

Der Zusammenbau und somit die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms erfolgt über zwei voneinander unabhängige Wege. Das erste Signal, welches auch „*priming*“ genannt wird, kann TLR-, IL-1R- und TNFR-abhängig sein. Dieser erfolgt, wie oben bereits beschrieben, über die Bindung eines PAMPs oder DAMPs an eines der erwähnten Rezeptoren, und mündet in der NF- κ B-vermittelten Transkription des pro-IL-1 β -Gens, sowie der Expression der NLRP-Proteine. Die inaktive pro-IL-1 β Form sowie die NALP-Proteine werden somit in der Zelle akkumuliert, bis ein weiteres Signal den Zusammenbau der Inflammasom-Komponenten „triggert“. Nach der Zusammenlagerung des Inflammasoms durch ein zweites Signal erfolgt die autokatalytische Spaltung der Pro-Caspase-1 (45kDa). Diese wird dadurch aktiviert, und kann nun ihrerseits die inaktive pro-IL-1 β in die biologisch aktive Form IL-1 β prozessieren. Bekannte Substrate die durch die Caspase-1 prozessiert werden sind IL-1 β , IL-18 und IL-1F7 (Dinarello, 2009). Die Aktivierung bzw. Spaltung der erwähnten „Prozytokine“ kann sowohl intra- als auch extrazellulär erfolgen. Für die extrazelluläre

Aktivierung ist ein bereits etabliertes entzündliches Infiltrat mit aktivierten Granulozyten (sezernieren pro-IL-1 β), sowie ins Entzündungsgewebe sezernierten Proteasen notwendig (Gadola, 2009). Daher erfolgt die Aktivierung der Prozytokine wahrscheinlich hauptsächlich intrazellulär durch das Inflammasom. Wie anhand Tab. 1 zu erkennen ist, wurden bisher zahlreiche Signale zur Inflammasom-Aktivierung beschrieben. Für das NLRP3-Inflammasom sind die meisten Aktivierungssignale bekannt.

Tab. 1. Inflammasome und deren Aktivierungssignale (nach Bauernfeind et al., 2011).

Inflammasom	Aktivierungssignal
NLRP1	Anthrax lethal toxin
	MDP
NLRP3	Pore-forming agents
	Listeriolysin O
	Streptolysin
	Nigericin
	Maitotoxin
	Saponin
	Hemolysins
	Ion channels or their activators
	P2X7
	Influenza virus M2 channel protein
	Phagocytosed materials (crystals, crystalline material, particles, protein aggregates)
	Monosodium uric acid crystals
	Asbestos fibers
	Silica
	Aluminum salts
Hemozoin crystals	
NLRC4	Cholesterol crystals
	Poly lactide-co-glycolide and polystyrene microparticles
	Amyloid beta
AIM2	Hyaluronan
	Flagellin
	Components of the T3SS
	Double stranded DNA

Anhand des Endotoxins LPS soll nun die Aktivierung von zwei Inflammasomen (NLRP3 und AIM2) näher dargestellt werden.

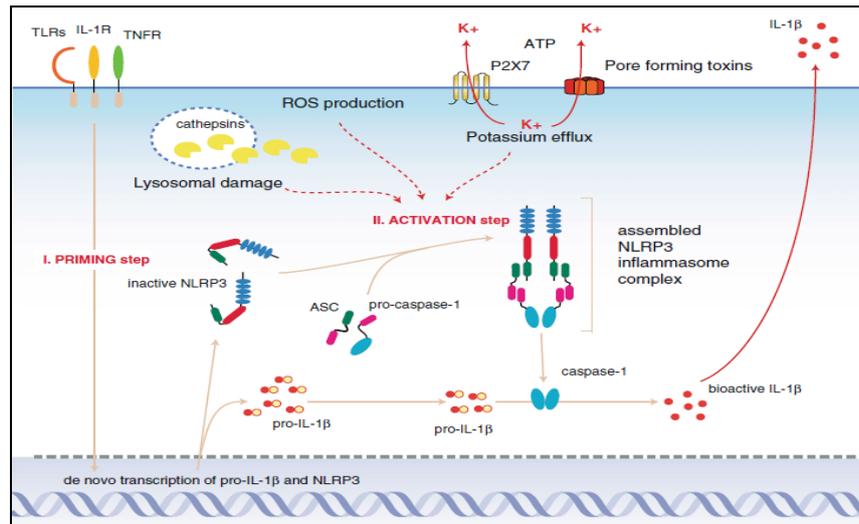


Abb. 2. Inflammasom-Aktivierung und IL-1 β Freisetzung dargestellt anhand des NLRP3-Inflammasoms (Bauernfeind et al., 2011).

Die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms erfolgt über zwei voneinander unabhängige Wege. Es ist zum einen der „Priming Step“ und zum anderen der „Activation Step“. Nachdem ein PAMP wie z.B. das Endotoxin LPS sich an TLR (TLR4) gebunden hat, erfolgt das sogenannte „Primen“ der Zelle. Der erste Schritt der Inflammasom-Aktivierung mündet in der NF- κ B vermittelten Transkription des pro-IL1 β Gens und der Expression der NLRP-Proteine. Dadurch kommt es zu einer Anhäufung inaktiver pro-IL1 β - und NLRP-Proteine innerhalb des Zytosols. Das erste Signal reicht jedoch nicht aus, um den Zusammenbau und somit die Aktivierung des Inflammasoms zu „triggern“. Dafür ist ein weiteres Signal notwendig. Das zweite Signal führt zum Zusammenbau des Inflammasoms, zur Caspase-1 Aktivierung und schließlich zur IL-1 β Sekretion. Es werden drei Wege postuliert, die zur Aktivierung des NLRP3 führen können. Zum einen ist es der Ausstrom von K⁺-Ionen aus der Zelle, welches durch porenbildende Agentien wie z.B. Nigericin oder ATP initiiert wird, zum anderen der Zusammenfall der Membran oder aber Liganden-gesteuerte Kanäle (Bauernfeind et al., 2011).

ATP ist eines der pleiotropsten Aktivatoren des NLRP3-Inflammasoms, welches von gestressten Zellen freigesetzt wird (Ghiringhelli et al., 2009). Der ATP Effekt wird durch den purinergen P2X7-Rezeptor vermittelt, welcher einen zügigen K⁺-Ausstrom aus dem Zytosol herbeiführt. Die rapide Abnahme der intrazellulären K⁺ Konzentration ist für das Inflammasom ein Aktivierungssignal, und veranlasst das Inflammasom somit zum Zusammenbau der Komponenten und dessen Aktivierung. Der Ausstrom führt zur autokatalytischen Spaltung der inaktiven Pro-

Caspase-1 in Ihre aktive Form. Die Bindung von ATP an den extrazellulären P2X7-Rezeptor führt zu einer raschen Öffnung des nicht-selektiven Kationen-Kanals, mit anschließender schrittweiser Öffnung einer größeren Pore, dem Pannexin-1. Es kommt zu dem oben erwähnten Kalium-Efflux, wobei es dadurch auch zu einem Influx von NLR-aktivierenden Liganden ins Zytosol kommen kann. Das Inflammasom kann neben der Produktion von IL-1 β auch über die Aktivierung protektiver Mechanismen zur Verbesserung des zellulären Überlebens beitragen.

Der genaue Mechanismus, über den die Ausschleusung von IL-1 β aus der Zelle erfolgt, ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Einige der Wege wären zum Beispiel die Exozytose von sekretorischen Lysosomen, die Absonderung von Plasmamembran-Vesikeln oder aber der direkte Austritt über die Plasmamembran. Für alle erwähnten Mechanismen ist ein Ca²⁺ Einstrom in das Zytosol über die Plasmamembran oder durch dessen Freisetzung aus Lysosomen und dem Endoplasmatischen Retikulum nötig (Qu et al., 2007).

Ein weiterer Mechanismus über den das Inflammasom aktiviert wird, erfolgt über die Freisetzung von Bestandteilen aus den Lysosomen. Zellen binden und phagozytieren Kristalle, Partikel oder Proteinaggregate wie Harnsäurekristalle, Cholesterol-Kristalle oder Hemozoin-Kristalle. Durch die Aufnahme dieser Partikel kommt es im weiteren Verlauf der Zersetzung zu einem Anschwellen und einer Destabilisierung der Lysosome. Dies führt schließlich zur Freisetzung von lysosomalen Bestandteilen wie z.B. der Protease Cathepsin B, welche eine wichtige Rolle in der Aktivierung zu spielen scheint. Die direkte Verbindung zwischen Cathepsin B und der NLRP3-Inflammasom Aktivierung ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt (Bauernfeind et al., 2011). Es ist daher anzunehmen, dass noch weitere lysosomale Proteasen in der Aktivierung eine Rolle spielen. Ein weiterer Mechanismus, welches zur Aktivierung des Inflammasoms beitragen könnte, betrifft die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale (ROS). Es ist möglich, dass die Entstehung von ROS zur Destabilisierung von Lysosomen beitragen könnte. Auf der anderen Seite kann die Freisetzung des Inhalts der Lysosomen einen Einfluss auf die ROS-Entstehung haben. Es konnte von der Arbeitsgruppe um Tschopp gezeigt werden, dass eine direkte Beziehung zwischen NLRP3 und Thioredoxin-interagierenden Proteinen (TXNIP) vorliegt, Proteine welche mit der Insulin-Resistenz in Verbindung stehen. Inflammasomaktivatoren wie zum Beispiel

Harnsäurekristalle induzieren die Dissoziation von TXNIP vom Thioredoxin in einer ROS-sensitiven Weise, und erlauben so die Bindung des TXNIP an NLRP3. Dies führt schließlich zur Aktivierung des Inflammasoms (Bauernfeind et al., 2011). Keines der erwähnten Mechanismen scheint in der Lage zu sein, das zweite Signal, das zur Inflammasom-Aktivierung benötigt wird, alleine zu liefern. Daher ist es möglich, dass die Aktivierung aus dem Zusammenspiel dieser drei Mechanismen resultiert.

Ein weiteres Beispiel zur Aktivierung des Inflammasoms sei hier anhand des AIM2-Inflammasoms dargestellt. Der Unterschied zum zuvor vorgestellten NLRP3-Inflammasom liegt darin, dass das AIM2 Inflammasom zur Aktivierung lediglich ein Signal benötigt, wohingegen das NLRP3 Inflammasom zwei Signale benötigt.

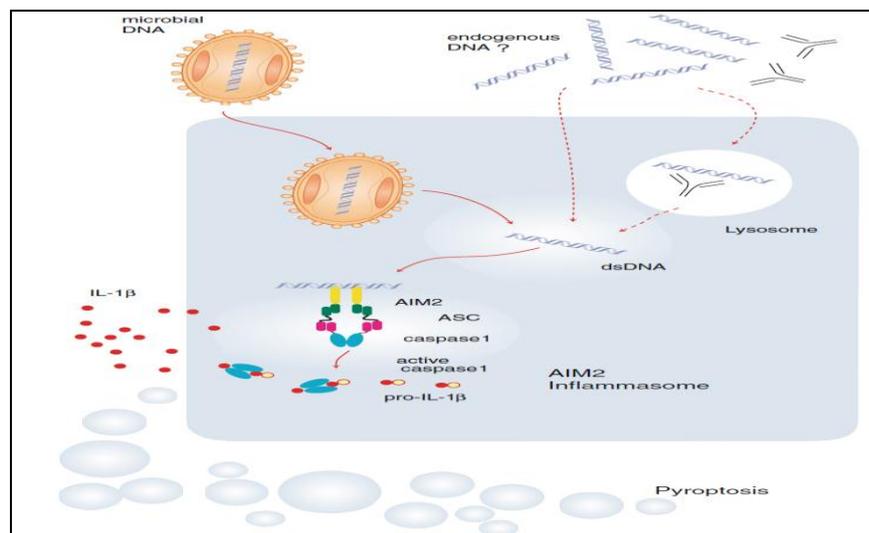


Abb. 3. Inflammasom-Aktivierung und IL-1 β Freisetzung exemplarisch dargestellt anhand des AIM2-Inflammasoms (Bauernfeind et al., 2011).

Das AIM2-Inflammasom wurde vor etwa 10 Jahren entdeckt. Es fehlt in manchen Hautkrebszellen, und hat daher auch den Namen „*absent in melanoma*“ erhalten. Das AIM2-Inflammasom wurde als ein neuer Rezeptor für zytoplasmatische DNA identifiziert. Es gehört zur Familie der HIN200 Proteine mit einer aminoterminalen (N-terminalen) Pyrin- (PYD) und einer carboxyterminalen (C-terminalen) HIN-Domäne. Mit der HIN200-Domäne bindet es direkt an seinen Liganden, der doppelsträngigen DNA (dsDNA). Mit der N-terminalen PYN-Domäne bindet es an das Adaptormolekül ASC um die NF- κ B vermittelte Expression und die Caspase-1 zu aktivieren (Hornung et al., 2009). Durch die Aktivierung der Caspase-1, über

autokatalytische Spaltung der Pro-Caspase-1, erfolgt die Spaltung von pro-IL-1 β in die aktive IL-1 β Form. Es wurden bis dato verschiedene exogene Trigger für das AIM2-Inflammasom beschrieben, wie z.B. das Vakzinia Virus, Maus Cytomegalovirus, *Listeria monocytogenes* und *Francisella tularensis*. Man könnte spekulieren, ob DNA endogenen Ursprungs, wie z.B. DNA-Antikörper-Komplexe die in Autoimmunerkrankungen entdeckt wurden oder von phagozytierten apoptotischen Zellen freigelassene DNA, ebenfalls das AIM2 aktivieren können (Bauernfeind et al., 2011). Die Aktivierung des Inflammasoms über das ASC-Adaptormolekül mit der damit verbundenen Caspase-1 Aktivierung führt schließlich zum Zelltod durch Pyroptose (Hornung et al., 2009). Pyroptose ist eine Art pro-inflammatorischer programmierter Zelltod das mit der Inflammasom-Aktivierung zusammenhängt. Im Gegensatz zu Apoptose benötigt es die Funktion der Caspase-1.

3.1.1.3 Interleukin-1 β (IL-1 β)

Der Begriff Interleukin-1 beschreibt zwei unterschiedliche Genprodukte: IL-1 α und IL-1 β . Der Subtyp auf den in dieser Arbeit besonders eingegangen wird, ist das Interleukin-1 β . Es ist eines der wichtigsten pro-inflammatorischen Zytokine. Es ist in der Lage das angeborene Immunsystem entweder direkt oder über die Induktion anderer Zytokine wie IL-6 oder TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor- α) zu aktivieren. IL-1 β ist der Prototyp eines pro-inflammatorischen Zytokins und wird von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen als Reaktion auf unterschiedliche Stimuli sezerniert. Die Wirkungen von IL-1 β sind pleiotrop. Es ist in der Lage, die Genexpression und Synthese von Cyclooxygenase-2, Phospholipase A2 und induzierbarer Stickstoffmonoxid-(NO-)-Synthase (iNOS) zu induzieren. Dies führt schließlich über die Produktion von Prostaglandinen, plättchenaktivierendem Faktor und NO zu den Zeichen einer Entzündung wie z.B. Fieber, Vasodilatation, Blutdruckabfall und erniedrigter Schmerzschwelle (Gadola, 2009). Eine weitere Wirkung von IL-1 β ist die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen. Dadurch wird die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen gefördert, und die Bildung eines entzündlichen Gewebeeinfiltrats unterstützt (Bauernfeind et al., 2011). Neben den Effekten auf das angeborene Immunsystem sind auch Effekte auf das adaptive Immunsystem bekannt. Es hat eine direkte Wirkung auf Lymphozyten, und ist in der Lage, unreife B-Zellen zur

Differenzierung und zur Expression von IgM anzuregen. Zur Unterstützung der Abwehr gegenüber Pilzen und Bakterien erfolgt durch IL-1 β die Induktion und Erhaltung der dafür nötigen Interleukin-17 produzierenden CD4⁺ T-Helfer-Zellen, die sogenannten TH₁₇-Lymphozyten (Acosta-Rodriguez et al., 2007). IL-17 induziert die Produktion von Chemokinen und antimikrobiellen-Peptiden, und führt zu Anhäufung von Neutrophilen, und Entzündung (Weaver et al., 2007). TH-₁₇ Zellen werden mit einigen Autoimmun-Erkrankungen in Verbindung gebracht. In Versuchstiermodellen wurde gezeigt, dass die IL-17 produzierenden T-Zellen für Autoimmun-Encephalitis, Kollagen-induzierte Arthritis, Koilitis und Psoriasis mitverantwortlich sind (Acosta-Rodriguez et al., 2007). Zusätzlich zu IL-1 β können TGF- β und IL-6 die TH-₁₇-Differenzierung steigern (Cho et al., 2006).

Nach Entdeckung von IL-1 β und dem Bekanntwerden, dass zur Aktivierung die pro-IL-1 β Form zunächst prozessiert werden muss, stellte sich die Frage, ob neben der Caspase-1 noch weitere Enzyme existieren die in der Lage sind die pro-Form zu prozessieren (Netea et al., 2010). Die Caspase-1 gehört zu den Cysteinproteasen, und stellt lediglich ein Mechanismus dar, über die die Prozessierung stattfinden kann. Coeshott et al. (1999) und Dinarello (1996) konnten in Gegenwart von Inhibitoren aufzeigen, dass neutrophile Serinproteasen wie Cathepsin-G (CatG), Proteinase-3 (PR3) und die Elastase ebenfalls in der Lage sind, die pro-IL-1 β Form in ihre aktive Form zu prozessieren. Serinproteasen werden während der Neutrophilen-Entwicklung im Knochenmark gebildet, und in azurophilen Granula reifer Neutrophilen gespeichert (Hiemstra et al., 1998 & Stehlik, 2009). Diese entsprechen den Lysosomen, und werden durch Stimulation freigelassen. Neutrophile Serinproteasen spielen neben der Prozessierung von pro-IL1 β auch eine Rolle in der Prozessierung von pro-TNF- α (Pham, 2006). Robache-Gallea et al. (1995) konnten zeigen, dass die PR3 pro-TNF- α in die biologisch aktive Form prozessieren kann.

3.1.2 Dendritische Zellen (DZ)

Dendritische Zellen stellen eine heterogene Population professioneller antigenpräsentierender Zellen (APZ) dar, die die Fähigkeit besitzen, eine Immunantwort zu initiieren und zu regulieren (Ardavin et al., 2004). Sie entstehen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen (CD34+) des Knochenmarks, und können

beim Menschen in mindestens drei verschiedene Subpopulationen differenziert werden: die myeloiden DZ Typ 1 und Typ 2 sowie die plasmazytoiden DZ (Shortman & Liu, 2002). Die erste Beschreibung DZ in der Literatur fand durch Paul Langerhans im Jahre 1868 statt. Nach ihm wurden die von ihm in der Haut entdeckten DZ benannt, die sogenannten Langerhans-Zellen. Ungefähr ein Jahrhundert später, im Jahre 1973, wurden die DZ durch Steinman und Cohn in der Milz von Mäusen beschrieben. Anhand ihres mikroskopischen Erscheinungsbildes mit ihren zahlreichen astförmigen Ausläufern erhielten sie durch Steinman und Cohn ihren heutigen Namen (griechisch: *dendros*, deutsch: Baum) (Steinman & Cohn, 1973). In den darauffolgenden Jahren konnten sie auch in anderen lymphatischen Organen und nichtlymphatischen Geweben nachgewiesen werden, wo sie durch die Ausbildung eines dichten Netzwerks eine Art Wächterfunktion übernehmen. Dafür tragen sie auf ihrer Oberfläche Rezeptoren für eine Vielzahl von Gefahrensignalen. Diese können von Mikroorganismen, körpereigenen freigesetzten Mediatoren oder aktivierten T-Zellen stammen. DZ nehmen extrazelluläre Bestandteile durch Phagozytose oder Endozytose auf, und analysieren somit ihre Umgebung auf Pathogene bzw. Gefahrensignale (Schnurr et al., 2002). Ihre Hauptaufgabe besteht darin, die aufgenommenen Proteine intrazellulär zu prozessieren, diese als Antigene auf MHC-Komplexen (*major histocompatibility complex*) an die Zelloberfläche zu transportieren, und den Lymphozyten zu präsentieren. Dafür migrieren die „beladenen“ DZ in die T-Zell-Zone der sekundären lymphatischen Organe, und interagieren mit naiven T-Zellen. Während ihrer Wanderung zu den Lymphknoten beginnt der Reifungsprozess der DZ, und sie verlieren im ausgereiften Zustand ihre Fähigkeit zur Phagozytose. Während des Reifungsprozesses haben die DZ ihre MHC-Moleküle hochreguliert, so dass eine verbesserte Präsentation der zuvor prozessierten Peptidantigene auf ihrer Zelloberfläche stattfinden kann. Die Zelloberfläche der DZ wird durch T-Zellen abgetastet. Die Erkennung eines spezifischen präsentierten Peptidantigens erfolgt über den T-Zell-Rezeptor (TZR) auf der Oberfläche der naiven T-Zellen. Mit Hilfe dieser Rezeptoren sind die T-Zellen in der Lage, an die zuvor ausgebildeten MHC-Peptid-Komplexe der DZ zu binden. Um die entstandene Bindung zu festigen, erfolgt die Ausbildung zusätzlicher Moleküle, den sogenannten Adhäsionsmolekülen und kostimulatorischen Molekülen wie z.B. CD40 auf den DZ, welches mit dem CD40-

Liganden (CD40L) auf den T-Zellen eine Bindung eingeht, sowie die Bindung zwischen CD80/CD86 auf den DZ mit CD28 auf T-Zellen. Somit können über diese Moleküle ein Aktivierungssignal an die T-Zelle übermittelt werden (Steinman et al., 1993). Durch die Bindung von DZ an T-Zellen erfolgt die Verstärkung der klonalen Proliferation, Zytokinsekretion und Effektor Funktion von CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten. Die CD8-T-Zellen entwickeln sich zu zytotoxischen T-Lymphozyten. Sie sind nun in der Lage mit Hilfe ihrer T-Zell-Rezeptoren fremde Peptide auf MHC-Klasse I Molekülen zu binden, und so die Zelle zu eliminieren. Das Immunsystem ist in der Lage verschiedenen Erregern Herr zu werden. So führt die Erkennung von intrazellulären Erregern zur Produktion von T-Helferzellen vom Typ 1 (Th1), die Interferon- γ produzieren, und das Registrieren von extrazellulären Organismen führt zur Ausdifferenzierung naiver T-Helferzellen zu Th2 Zellen, welche Interleukin-4, -5 und -10 produzieren. Die Aktivierung von CD4- bzw. CD8-T-Zellen wird durch die Art der MHC-Moleküle bestimmt. So werden intrazelluläre Antigene von MHC-Klasse-I Molekülen präsentiert, und von naiven CD8⁺-T-Lymphozyten erkannt. Diese Bindung initiiert eine CD8-T-Zell-Immunantwort. Beim Auftreten extrazellulärer Antigene die durch Phagozytose oder Endozytose aufgenommen werden, erfolgt die Präsentation über MHC-Moleküle der Klasse II. Die Klasse II Moleküle werden im Gegensatz zur Klasse I Molekülen von CD4⁺-T-Lymphozyten erkannt.

3.2 Extrakorporale Photopherese (ECP)

Die orale Verabreichung von Psoralen kombiniert mit UVA-Bestrahlung (PUVA) der Haut wurde in den 1970er Jahren für die Behandlung von Psoriasis („Schuppenflechte“), und heutzutage bei der Behandlung vieler weiterer Hauterkrankungen sowie dem kutanem T-Zell-Lymphom (CTCL) eingesetzt. Die ECP stellt die erste zelltherapeutische Methode dar, die von der FDA (*US Food and Drug Administration*) für die Behandlung von Krebs zugelassen wurde (Marshall, 2006). Es zeigte sich jedoch, dass die PUVA-Therapie bei CTCL nicht das gewünschte Ergebnis erbrachte sobald ein systemischer Progress der Lymphome stattfand. Im Jahre 1987 folgerte Edelson daraus, dass die Behandlung der Tumor-Zellen direkt im Blut vielleicht einen größeren Erfolg erzielen könnte. Seine erste Publikation zeigte, dass die extrakorporale

Photopherese (Kombination aus PUVA-Therapie und Leukopherese) in manchen Patienten eine vollständige Abnahme, und in anderen eine Reduktion des Tumor-Befalls erzielen konnte (Edelson et al., 1987). Die ECP-Methode wurde in den darauffolgenden Jahren weiterentwickelt und bei Autoimmun-Erkrankungen eingesetzt. Sie stellt somit eine Weiterentwicklung der PUVA-Therapie dar. Einige der Erkrankungen, bei der die ECP zum Einsatz kommt, sind erythrodermatische Formen des kutanen T-Zell-Lymphoms, die steroidrefraktäre GvHD (*graft versus host disease*) und die Abstoßungsreaktion nach Herztransplantationen. Einige weitere Erkrankungen bei denen die ECP zum Einsatz kommt, sind folgend aufgelistet. Auf Grund des geringen Spektrums an Nebenwirkungen wird die ECP heutzutage weltweit in 200 Zentren als Mono- oder Kombinationstherapie durchgeführt (Knobler et al., 2009).

Einige mit ECP behandelte Erkrankungen (verändert nach Scarisbrick, 2009).

- **Hauptindikationen**
 - Erythrodermatische Formen des kutanen T-Zell-Lymphoms
 - Akute und chronische GvHD
- **Nebenindikationen**
 - Festorgantransplantat Abstoßungen (Herz/Nieren)
 - Multiple Sklerose
 - Type 1 Diabetes Mellitus
 - Psoriasis
 - Morbus Crohn

3.2.1 Ultraviolette Strahlung (UV-Licht)

Die Ultraviolette Strahlung (UV-Strahlung) ist eine natürlich vorkommende Strahlung, die energiereicher und kurzwelliger ist als das sichtbare Licht. Die Wellenlänge der UV-Strahlung befindet sich zwischen 100-400nm, und beinhaltet die energiereichste Region des optischen Strahlungsspektrums. Es ist unterteilt in 3 Wellenlängen-Bereichen: UVC (100-280nm), UVB (280-320nm) und UVA (320-400nm). In dem es Vernetzungen von zwei benachbarten Thyminen zu einem Thymindimer initiiert oder organische Bindungen zerstört, ist die UV-Strahlung in der Lage, organische Bindungen sowohl zu spalten, als auch zu schaffen. Zum Beispiel wird Sauerstoff durch UV-Strahlung unterhalb von 200nm in atomaren Sauerstoff gespalten.

Als Bestandteil des Sonnenlichts ist UVA-Licht in der Lage eine Immunsuppression in der Haut zu verursachen (Ullrich, 2005). In der ECP wird die UVA-Strahlung

eingesetzt. Aufgrund des geringeren Energiegehalts ist die UVA-Strahlung in ihrer schädigenden Wirkung biologischer Moleküle wie z.B. der DNA weniger wirkungsvoll als die UVB-Strahlung (Marshall, 2006). Die Wirkung der UVA-Bestrahlung wird daher in Kombination mit der photosensibilisierenden Substanz 8-Methoxypsoralen verstärkt.

3.2.2 Psoralen

Psoralene können als Pflanzen-Extrakt aus der *Psoralea*-Pflanze isoliert werden. Das Potential der Pflanzen wurde bereits von den Alt-Ägyptern erkannt. Sie nutzten die Blätter der Pflanze *Ammi majus* zur Behandlungen von Personen mit Vitiligo (sog. Weißfleckenkrankheit). Dafür wurden die Blätter entweder direkt auf die Haut appliziert, oder als Aufguss getrunken. Anschließend erfolgte die Exposition der betroffenen Hautareale mit Sonnenlicht.

Psoralene sind Photosensibilisatoren die zur Gruppe der trizyklischen Aromaten, den Furocumarinen gehören (Bethea et al., 1999). Sie treten in der Natur in verschiedenen Pflanzen auf, und kommen z.B. in sehr geringen Mengen in Feigen, Limonen, Wiesengräsern und anderen Früchte- und Gemüsesorten vor. Eines der meist verwendeten Psoralene in der Photochemotherapie ist das auch in dieser Arbeit eingesetzte 8-Methoxypsoralen. Psoralene haben eine lipophile Natur. Diese Eigenschaft befähigt sie sich intrazellulär anzureichern. Es sind inerte Moleküle, die erst durch die Absorption von ultraviolettem Licht für einige Millionstel Sekunden aktiviert werden. Die stärkste Aktivierung erfahren sie durch das langwellige ultraviolett Licht A (UVA) (Lerner et al., 1953). Durch die Absorption werden ihre Elektronen aktiviert, die somit in die Lage versetzt werden mit anderen Molekülen aus der Umgebung zu interagieren. Dadurch können sie sich irreversibel zwischen DNA-Basenpaaren setzen. Sie bilden kovalente Bindungen zwischen den Pyrimidin-Basen der DNA, und führen zum *cross-linking* des DNA-Doppelstrangs mit der Bildung sogenannter Photoaddukte. Durch die Bildung der Addukte wird die Helix-Replikation blockiert, und somit die Zellteilung verhindert.

3.2.3 Klinische Durchführung der ECP

Lediglich 5-10% der im Blut zirkulierenden mononukleären Zellen werden der ECP-Behandlung ausgesetzt (Marshall et al., 2006; Knobler et al., 2009). Wie anhand der unten abgebildeten Illustration zu sehen ist, werden die Leukozyten zunächst über eine Zentrifuge vom Vollblut getrennt. Die Erythrozyten und das Plasma werden dem Patienten direkt zurück infundiert, während die Leukozyten UVA-Licht ausgesetzt werden und in Kombination mit der photosensibilisierenden Substanz 8-Methoxypsoralen aktiviert werden. Die photoaktivierten Leukozyten werden anschließend dem Patienten zurück transfundiert.

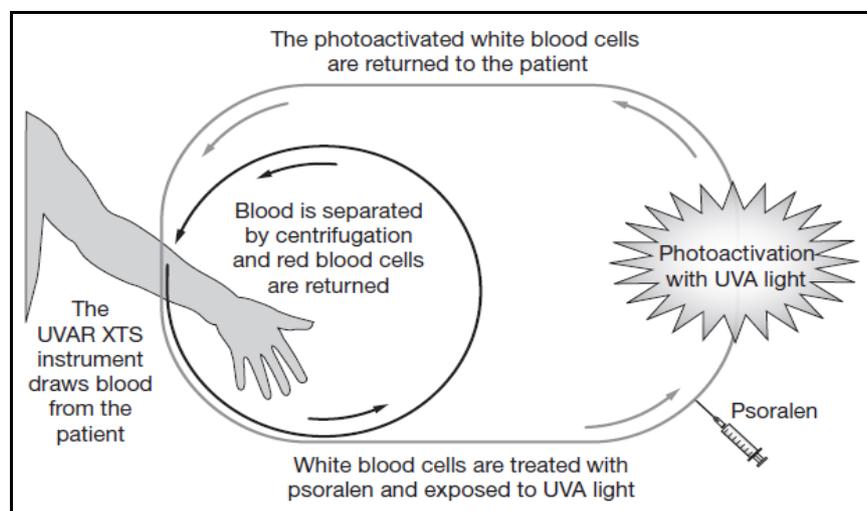


Abb. 4. Illustration der Extrakorporalen Photochemotherapie (Marshall, 2006).

Die extrakorporale Zugabe des Psoralens direkt zu den Leukozyten führt zu einer deutlich geringeren Aufnahme der Substanz durch den Patienten. Auf Grund dessen treten im Vergleich zu der üblichen PUVA-Therapie, bei der eine orale Psoralen-Verabreichung erfolgt, viel weniger Nebenwirkungen auf. Die ECP wird nun seit mehr als 30 Jahren weltweit eingesetzt, und es sind bis dato keine Langzeit-Nebenwirkungen berichtet worden (Marshall, 2006). Sie bietet eine selektive Immunmodulation, ohne dass es eine generalisierte Immunsuppression hervorruft.

3.2.4 Mechanismen der ECP / Immunmodulatorische Effekte der ECP

Die Mechanismen der ECP sind bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Folgend sind einige der postulierten Hypothesen schematisch dargestellt, und werden unten weiter ausgeführt.

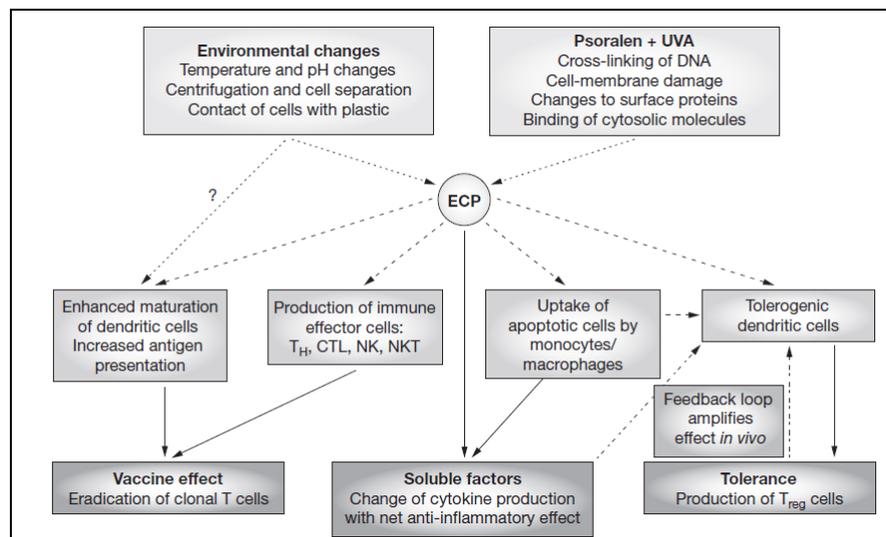


Abb. 5. Schematische Darstellung der bis heute postulierten Hypothesen (Marshall, 2006).

Hinweise deuten darauf hin, dass die durch die ECP hervorgerufene Apoptose von Leukozyten durch die Interaktion mit APZ eine Immuntoleranz hervorrufen (Marshall, 2006; Savill et al., 2002). Im Einzelnen bedeutet dies: Erzeugung tolerogener DZ nach Aufnahme apoptotischer Körper durch APZ über spezifische Rezeptoren, verminderte Produktion pro- und erhöhte Produktion anti-entzündlicher Zytokine, reduzierte Fähigkeit der APZ pro-entzündliche T-Zell-Antworten zu stimulieren und gesteigerte Funktion regulatorischer T-Zellen (Treg) (Voss et al., 2010).

Eine weitere Hypothese, die den Mechanismus zu erklären versucht, ist die „*Vaccination Hypothesis*“. Diese Hypothese wurde entwickelt, um den systemischen anti-Tumor Effekt in der CTCL-Behandlung zu erklären. Die Behandlung der Lymphozyten führt über eine Dauer von 24-72 Stunden zu deren Apoptose (Tambur et al., 2000; Rao et al., 2008). Dendritische Zellen sind die effizientesten APZ für die Induktion einer anti-Tumor Immunität (Berger et al., 2001). Sie führen zu einer Immunantwort, indem sie die Produktion sowie die Proliferation von zytotoxischen T- und NK-Zellen als Effektorzellen herbeiführen.

Autoimmune- und alloimmune Erkrankungen können zu einer Expansion von Effektorzellen führen, welche zu einer Zerstörung des Gewebes führen. Die Zerstörung dieser, durch die ECP hervorgerufenen expandierten Populationen, bringt die Erkrankung unter Kontrolle (Marshall, 2006).

Es wird berichtet, dass die ECP die Produktion und Sekretion an proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- β , IL-1 β und IL-12 durch 6-sulfo LacNAc DZ sehr effektiv hindern kann (Gerner et al., 2009). Diese stellen eine Subpopulation humaner myeloider DZs im Blut dar (Wehner et al., 2009). Wie oben bereits erwähnt, führt die ECP-Behandlung zum DNA-Strangabbruch. Marks et al. (1990) postulierten, dass die Wirksamkeit der ECP, z.B. in der Behandlung von GvHD, mit der DNA-Zerstörung und anschließender Lymphozyten-Apoptose zusammenhängt. Bei jedem ECP-Zyklus werden lediglich 5-10% der Lymphozyten behandelt. Diese geringe Menge scheint für Knobler et al. (2009) als Ursache für die Unordnung unwahrscheinlich zu sein, so dass sie die Hypothese aufstellen, dass es sich dabei um einen immunvermittelten Effekt handelt.

Maeda et al. (2005) konnten experimentell nachweisen, dass durch die Injektion von Leukozyten, die in vitro mit ECP behandelt wurden, regulatorische T-Zellen induziert werden können. Ultraviolett Strahlung ist in der Lage das Immunsystem zu unterdrücken. Vermittelt wird diese Immunsuppression über UV-induzierte regulatorische T-Zellen (T_{reg}). Sie exprimieren CD4 und CD25 und werden aktiviert. Dies befähigt sie immunsuppressive Zytokine wie Interleukin-10 (IL-10) freizusetzen. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Photopherese ebenfalls T_{reg} induziert werden. Daher ist die genauere Betrachtung dieser Zellen sinnvoll. Denn es könnte möglich sein, diese therapeutisch einzusetzen um eine spezifische Immunsuppression zu induzieren (Schwarz, 2005).

In Abb. 5 werden einige der bis heute postulierten Hypothesen dargestellt. Wie auch in der vorliegenden Arbeit, liegen einige dieser Hypothesen weiterhin im Fokus der Forschung.

3.3 Zielsetzung

Die extrakorporale Photopherese ist ein klinisch etabliertes, immunmodulierendes Verfahren. Sie stellt die erste zelltherapeutische Methode dar die von der FDA (*US Food and Drug Administration*) zur Behandlung von kutanen T-Zell Lymphomen zugelassen wurde (Marshall, 2006). Obwohl sie, aufgrund des geringen Spektrums an Nebenwirkungen, heutzutage weltweit in 200 Zentren als Mono- oder Kombinationstherapie durchgeführt (Knobler et al., 2009) wird, ist der ihr zugrunde liegende zelluläre Wirkmechanismus nur unvollständig verstanden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher die Aufklärung des Wirkmechanismus der extrakorporalen Photopherese. Um den zellulären Wirkmechanismus aufzuklären, wurden in-vitro Versuchsreihen sowohl mit humanen als auch murinen Zelltypen durchgeführt. Dabei ging es primär um die Analyse der zellulären Aktivierungswege, welche die IL-1 β Zytokinfreisetzung von Leukozyten nach UVA-Bestrahlung in Anwesenheit des Photosensibilisators 8-Methoxypsoralen steuern. Die Untersuchung der IL-1 β Freisetzung sollte aufzeigen, ob durch die Behandlung der Zellen eine pro-inflammatorische Signalkaskade ausgelöst werden kann, die in einer erhöhten IL-1 β Freisetzung mündet.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Geräte und Zubehör

Tab. 2. Verwendete Geräte und Zubehör

Geräte	Typ und Zubehör	Hersteller
autoMACS	Seperator + Appendix Software V1.12	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Automatischer Hämatologie Analysator	KX-21N Sysmex	Medical Electronics GmbH, Hamburg, D
Brutschrank	HERAcell 240 CO2 Inkubator	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, D
Durchflusszytometer	BD FACSCanto II + FACSDiva Software V6.1.2	BD Biosciences, Heidelberg, D
ELISA Reader	TECAN Sunrise + Magellan Software V6.5	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, D
ELISA Washer	TECAN Hydroflex	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, D
Kamera (Digital sight)	DS-1QM	Nikon GmbH, Düsseldorf, D
Mikroskope	Leitz Leica DM IRB Nikon-Eclipse (TE 2000-E) + NIS-Element Software	Biomed, Wetzlar, D Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, D Nikon GmbH, Düsseldorf, D
Pipetten	2µl – 1000µl	Eppendorf, Hamburg, D
Sterilbank	Heraeus Klasse 2 TypH	Kendro Lab. Products GmbH, Langenselbold, D
UVA-Bestrahlungskammer	BIO-LINK® BLX-365	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell, D
UVA-Dosimeter	RM-21	Dr. Gröbel UV-Elektronik GmbH, Ettlingen, D
Vortex	Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, D

Waagen	AE 100 S/9 PJ 6000/9	METTLER-TOLEDO, Kirchheim, D METTLER-TOLEDO, Kirchheim, D
Wasserbad	ED Klasse I	Julabo Labortechnik, Seeibach, D
Zählkammer	Neubauer 0,0025mm ² / 0,1mm	Brand GmbH, Schwerin, D
Zentrifugen	Mikro 20 Rotina 380R Biofuge primo	Hettich, Tuttlingen, D Hettich, Tuttlingen, D Heraeus Instruments, Hanau, D

4.1.2 Verbrauchsmaterial

Tab. 3. Verbrauchsmaterial

Material	Typ und Zubehör	Hersteller
FACS-Röhrchen	5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Falconröhrchen	15 und 50 ml (Polypropylene)	BD Labware, Le Pont De Claix, F
Glaspipetten	2 – 25 ml	Hirschmann, Eberstadt, D
Kanülen	BD Microlance™ 3 18G x 1/2 (1,2mm x 40mm) 20G x 1/2 (0,9mm x 40mm) 26G x 1/2 (0,45mm x 13mm)	BD, Heidelberg, D
Lochplatten	96-well cell culture cluster flatbottom 24-well cell culture cluster flatbottom	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Pasteur Pipetten	Pasteur Capillary pipettes 3ml	BD Labware, Le Pont De claix, F
Reaktionsgefäße	0,5ml; 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Spritzen	10 und 20ml	Braun, Melsungen, D
Sterilfilter	0,20µM	Sartorius, Göttingen, D
Zellkulturflaschen	75cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D

Zellkulturschalen	60 x 15mm	Nunc GmbH, Invitrogen, Karlsruhe, D
Zellsiebe	40 und 70µM (Nylon)	BD, Erembodegem, B

4.1.3 Antikörper

Es wurden konjugierte Antikörper mit folgenden Fluoreszenzfarbstoffen verwendet: APC steht für Allophycocyanin, PB für Pacific Blue, FITC für Fluorescein-5-isothiocyanat, PE für Phycoerythrin, Tandem-Konjugate PE-Cy7 für Phycoerythrin und dem Cyanin-Farbstoff 7 sowie APC-Cy7 für Allophycocyanin und dem Cyanin-Farbstoff 7.

Tab. 4. Verwendete Antikörper und Farbstoffe für FACS-Messungen

Antikörper	Klon	Isotyp	Konzentration	Cat.no.	Hersteller
I-A ^b - FITC	AF6- 120.1	Mouse (BALB/c) IgG2a,κ	0,5mg/ml	116406	Biolegend, Uithoorn, NL
CD11b- PerCp- Cy5.5	M1/70	Rat IgG2b,κ	0,2mg/ml	101228	Biolegend, Uithoorn, NL
CD11c- PE- Cy7	N418	Armenian Hamster IgG	0,2mg/ml	117318	Biolegend, Uithoorn, NL
CD14-FITC	M5E2	Mouse IgG2a,κ	-----	555397	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
CD45-APC- Cy7	30-F11	Rat IgG2b,κ	0,2mg/ml	103116	Biolegend, Uithoorn, NL
CD86-PE	GL1	Rat (LOU) IgG2a,κ	0,2mg/ml	553692	BD Pharmingen™, Heidelberg, D

F4/80-APC	BM8	Rat IgG2a, κ	0,2mg/ml	123115	Biolegend, Uithoorn, NL
Cytox® Blue Dead Cell-Stain- PB		-----	1mM	S34857	Invitrogen, Darmstadt, D

4.1.4 Micro-Beads

Tab. 5. Compensation Beads für die FACS-Kompensation sowie Magnet Beads

Beads	Cat.no	Hersteller
Anti-Mouse Ig,κ Neg. Control Compensation Particles Set	552843	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
Anti-Rat and Anti-Hamster Ig,κ Neg. Control Compensation Particles Set	552845	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
autoMACS CD11b Micro beads (mouse/human)	130-049-601	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
autoMACS CD14 Micro beads (human)	130-050-201	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D

4.1.5 Chemikalien

Tab. 6. Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Cat.no.	Hersteller
8-Methoxypsoralen	---	Apotheke des UKGM, Marburg, D
Ammoniumchlorid	A9434	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Apyrase Grade III	A7646	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Aqua ad injectabilia	6724092.00.00	B. Braun, Melsungen, D
ATP	tlrlp-atp	Invivogen, Toulouse, F
β-Mercaptoethanol	M7522	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Caspase-1, 4 Inhibitor	FMK005	R&D Systems GmbH,

(z-YVAD-FMK)		Wiesbaden-Nordenstadt, D
DMSO	472301	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
EDTA	14510	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Ethanol (70%, 99,9%)	T86.8, P076.1	Roth, Karlsruhe, D
FACS Clean	340345	BD Bioscience, Heidelberg, D
FACS Flow	342003	BD Bioscience, Heidelberg, D
FACS Shutdown Solution	334224	BD Bioscience, Heidelberg, D
FCS Gold	A15-649	PAA Laboratories, Pasching, A
Ficoll-Lympholyte-M (Density: 0,0875g/cm²)	CL5031	Biozol Diagnostica GmbH, Eching, D
HBSS	H15-009	PAA Laboratories, Pasching, A
HEPES	15630	Invitrogen, Darmstadt, D
Isofluran	HDG9623	Baxter GmbH, Unterschleißheim, D
Isopropanol	6752.3.8.5.6.2	Roth, Karlsruhe, D
Lipopolysaccharide from <i>Escherichia coli</i> (026:B6)	115K4013	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Nigericin, free acid	N1495	Invitrogen, Darmstadt, D
Nicht-Essentielle Aminosäuren	M7145	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Normales Maus Serum	01-6501	Invitrogen, Darmstadt, D
PBS	P04-36500	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, D
Penicillin/Streptomycin Lösung (50µg/ml)	P11-010	PAA Laboratories, Pasching, D
R848	31-03-848	Invivogen, Toulouse, F
RPMI 1640 Medium	E15-039	PAA Laboratories, Pasching, A
Sodium-Pyruvat, (110mg/ml)	11360	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, D

TPCK (N^α-Tosyl—Phe-Chloromethylketone)	616387	Calbiochem, San Diego, USA
Trypanblau	73K2420	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Tween®-20	P1379	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

4.1.6 Weitere Reagenzien

Tab. 7. Weitere Reagenzien

Kit	Cat.no	Hersteller
Ready-Set-Go!® Mouse IL-1β ELISA	88-7013	eBioscience, San Diego, USA
Ready-Set-Go!® Mouse IL-1β Pro-form ELISA	88-8014	eBioscience, San Diego, USA
Mouse IL-18 ELISA Kit	7625	MBL, Naka-ku Nagoya, Japan
Ready-Set-Go!® Human IL-1β ELISA	88-7010	eBioscience, San Diego, USA
Human pro-IL-1β Immunoassay	DLBP00	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA
Human IL-18 ELISA Kit	7620	MBL, Naka-ku Nagoya, Japan
Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit 1	559763	BD Pharmingen™, Heidelberg, D

4.1.7 Zytokine

Tab. 8. Zytokine zur Generierung von DZ aus dem Knochenmark von Mäusen

Zytokin	Cat.no	Hersteller
rm IL-4 (Source: <i>E. coli</i>)	AF-214-14	PeptoTech GmbH, Hamburg, D
rm GM-CSF (Source: <i>E. coli</i>)	AF-315-03	PeptoTech GmbH, Hamburg, D

Zur Generierung von murinen Knochenmarksmakrophagen erfolgte der Einsatz von murinem L929-Fibroblasten Überstand als Quelle von Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (M-CSF). Die Überstände wurden freundlicherweise von

der Arbeitsgruppe um Prof. Hornung zur Verfügung gestellt (Institut für Klinische Chemie und Pharmakologie, Universitätsklinikum Bonn).

4.2 Methoden

4.2.1 Murine Zellisolationmethoden

Alle sterilen Zellkulturarbeiten erfolgten unter einer Laminar-Air-Flow mit sterilen Materialien und Geräten. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem CO₂-Begasungsbrutschrank bei 37°C mit 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%. Für die Versuche wurden mit Genehmigung („In vitro Photopherese“ Gi 20/8 A43/2009) 8- bis 12-Wochen alte C57BL/6NCrl-Mäuse verwendet. Die Tiere wurden von Charles River, Sulzfeld, D bezogen und in die Tierhaltung der Justus-Liebig-Universität Gießen aufgenommen. Des Weiteren wurden gendefiziente Mäuse (AIM2-KO-, ASC-KO- und Caspase-1-KO Mäuse) in Kooperation mit den Arbeitsgruppen um Prof. Hornung (Institut für Klinische Chemie und Pharmakologie, Universitätsklinikum Bonn), und um Prof. Brüne (Gustav-Embden-Zentrum für Biologische Chemie, Institut für Biochemie, Goethe Universität Frankfurt am Main) verwendet.

4.2.1.1 Gewinnung von Leukozyten aus der Milz

DZ-Medium:

- RPMI 1640
- 10% FCS
- 50U/ml *Penicillin*
- 50µg/ml *Streptomycin*
- 10mM HEPES
- 1mM Nicht-Essentielle Aminosäuren
- 110mg/ml Natrium-Pyruvat
- 5x10⁻⁵ M 2-β-Mercaptoethanol

Nach Tötung wurde mit Hilfe einer Schere die Bauchdecke eröffnet. Anschließend wurde die Milz entnommen und in eine Petrischale überführt in der 3-5ml PBS vorlagen. Die Milz wurde mit Hilfe einer Schere zerkleinert und auf ein 70µM-Zellsieb überführt. Mit Hilfe eines Spritzen-Stempels wurden die Zellen vorsichtig durch das Sieb gedrückt, und dabei in ein 50ml Tube überführt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Zellen auf dem Sieb nicht gerieben werden. Das

Sieb wurde anschließend mit PBS gespült, und auf 50ml aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde anschließend durch ein 30µM-Zellsieb in ein neues Falcon-Tube überführt und bei 1500rpm für 5min zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde mit dem so gewonnenen Pellet eine Erythrozyten-Lyse durchgeführt. Die Lyse erfolgte mit Hilfe von 2ml Ammoniumchlorid für 2min. Zum abstoppen der Reaktion wurde das Tube mit PBS auf 50ml aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde 2x zentrifugiert, und anschließend erfolgte die Zellzahlbestimmung mittels der Neubauer-Zählkammer.

4.2.1.2 Anreicherung von murinen Monozyten mit Hilfe der *Magnetic Cell Separation* (MACS)

Hintergrund

MACS ist eine Methode zur Zellseparation die von der Firma Miltenyi Biotec Anfang der 1990er Jahre entwickelt wurde. Sie ist geeignet um aus einem Zellgemisch mittels AK-vermittelter immunmagnetischer Separation bestimmte Zellen in hoher Reinheit anzureichern. Die eingesetzten AK (*micro beads*) sind hochspezifisch und superparamagnetisch. Sie sind mit Eisenoxid ummantelt, und binden an zellspezifische Oberflächenmoleküle (direkte Markierung). Bei der indirekten Markierung kommt ein sekundärer AK zum Zuge. Dabei bindet sich der nicht-magnetische Erst-AK an die Zelle, und ein sekundärer magnetischer Zweit-AK bindet sich an den Erst-AK. Die so markierten Zellen laufen anschließend durch eine Säule, die von einem Magnetfeld umgeben ist. Dabei werden die gewünschten Zellen, die mit den *micro beads* markiert sind, magnetisch an die Säule gebunden. Die restlichen Zellen durchlaufen die Säule und werden als Negativfraktion aufgefangen. Anschließend wird das Magnetfeld entfernt, so dass auch die Positivfraktion von der Säule eluiert werden kann. Zur Verfügung stehen dabei zwei verschiedene Selektionsarten. Falls die Zielzellen markiert werden, so wird diese als positive Selektion bezeichnet. Diese Art der Selektion zeichnet sich durch eine hohe Reinheit aus. Bei der zweiten Art der Selektion werden außer den Zielzellen alle sonstigen Zellen AK-markiert. Diese wird als Negativselektion bzw. Depletion bezeichnet. Sie kommt dann zum Zuge, wenn die Markierung sich negativ auf die weiteren Versuche auswirkt.

Durchführung

DZ-Medium: siehe 4.2.1.1

PBS/EDTA/BSA-Puffer:

- 1 x PBS
- 2mM EDTA
- 0,5% (w/v) BSA
- 0,2µm filtriert

PBS/EDTA-Puffer:

- 1 x PBS
- 2mM EDTA
- 0,2µm filtriert

Um unspezifische AK-Bindungen zu vermeiden, musste zügig gearbeitet werden. Daher musste darauf geachtet werden, dass alle zu gebrauchenden Reagenzien ausreichend gekühlt wurden. Die Durchführung erfolgte mittels CD11b *micro beads* gemäß Herstellerangaben (Miltenyi Biotec).

4.2.1.3 Gewinnung von Peritoneal-Makrophagen durch Adhärenz

Nach Tötung der Maus wurde vorsichtig am Sternum das Fell aufgeschnitten. Das Fell wurde mit beiden Händen vorsichtig nach hinten gezogen. Die Bauchdecke wurde angehoben, und anschließend wurden mit Hilfe einer Spritze zunächst ein wenig Luft und im gleichen Zug auch 5ml DZ-Medium (DZ-Medium: siehe 4.2.1.1) in den Bauchraum gespritzt. Die Maus wurde 5-10 Mal geschwenkt, so dass sich das Medium im gesamten Bauchraum verteilen konnte. Der Bauch wurde vorsichtig mit Daumen und Zeigefinger massiert. Zum Absaugen des Mediums wurde die Spritze an gleicher Stelle eingestochen, und das Medium vorsichtig abgesaugt. Dieser Schritt wurde 3 Mal wiederholt. Das so entnommene Medium wurde anschließend bei 1200rpm für 5min zentrifugiert. Es erfolgte die Zellzählung mittels der Neubauer-Zählkammer und das Aussäen der Zellen mit einer Konzentration von 1×10^6 /ml in 24-well Platten. Die Platten wurden für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert, so dass die Zellen an den Plattenboden adhären konnten. Nach dem Adhärenz-Schritt wurde das Medium entfernt und den adhären Zellen frisches Medium zugegeben. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag konnte mit den Zellen das gewünschte Experiment durchgeführt werden.

4.2.1.4 Differenzierung von Makrophagen aus dem Knochenmark mit L929-Überstand

Medium:

- DMEM
- 10% FCS
- 50U/ml *Penicillin*
- 50µg/ml *Streptomycin*
- 110mg/ml Natrium-Pyruvat

Nach Tötung der Maus erfolgte die Fixierung auf einer Unterlage, die mit Isopropanol desinfiziert wurde. Anschließend wurden der Maus die Ober- und Unterschenkel der Hinterbeine heraus präpariert. Die Knochen wurden freigelegt, und bei geschlossener Epiphyse für 1min in 70%igem Alkohol gewaschen. Nachdem die Knochen mit sterilem PBS gewaschen wurden, wurde mit einer Schere die Epiphyse auf beiden Seiten eröffnet. Das so freiliegende Knochenmark wurde mit Hilfe einer dünnen Nadel (18G x ½) und PBS heraus gespült und in ein Tube überführt. Das Knochenmark wurde durch ein 70µm-Sieb gerieben, und bei 500xg und 4°C für 10min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation erfolgte die Erythrozytenlyse für 2min mit 1ml Ammoniumchlorid pro Bein. Die Lyse wurde mit 50ml Medium abgestoppt, und erneut bei 500xg und 4°C für 10min zentrifugiert. Das entstandene Pellet pro Bein wurde in 20ml Medium mit 30% L929-Überstand als Quelle von Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (M-CSF) aufgenommen, resuspendiert und auf zwei 75cm² Flaschen verteilt.

Nach 4 Tagen wurde das Medium komplett verworfen, und neues Medium mit L929-Überstand dazugegeben. Weitere 2 Tage später wurden die Zellen am Abend mit einem Gummischaber (*Cellscraper*) im eigenen Medium vom Flaschenboden gelöst, mittels einer Pipette vereinzelt und bei 500xg und 4°C für 10min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation und anschließender Zellzählung wurden die Zellen mit einer Konzentration von 5x10⁵/ml in 24-well Platten überführt.

Am nächsten Tag konnte mit den so gewonnenen Makrophagen das gewünschte Experiment durchgeführt werden.

4.2.1.5 In-Vitro Expansion von murinen dendritischen Zellen

Die ersten Schritte zur in-vitro Expansion muriner dendritischer Zellen erfolgten wie zuvor bereits beschrieben (siehe: 4.2.1.4). Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 7ml DZ-Vollmedium resuspendiert und in eine 75cm² Flasche überführt. Die Flasche wurde für 1 Stunde im Brutschrank inkubiert, damit unerwünschte Zellen am Flaschenboden adhären konnten. Exakt nach einer Stunde wurde die Flasche sehr vorsichtig aus dem Brutschrank entnommen und 3 Mal sehr leicht geschwenkt, und der Überstand entnommen. Es erfolgte eine Zellzählung mit anschließendem aussäen der Zellen. Die Zellkonzentration pro Flasche betrug $11,8 \times 10^6$ Zellen in 20ml DZ-Vollmedium. Der Zellsuspension wurden jeweils 10ng/ml GM-CSF und IL-4 zugegeben, und für 3 Tage in den Brutschrank gestellt damit diese sich zu dendritischen Zellen ausdifferenzieren konnten. Nach 3 Tagen wurde das Medium gewechselt. Dafür wurde das ganze Medium abgenommen, bei 500xg für 10min zentrifugiert, und anschließend mit frischem Medium und den o.g. Wachstumsfaktoren zurück in die Flasche gegeben. Nach weiteren 3 Tagen war die Kultur fertig, und die Zellen wurden geerntet. Für die Ernte wurden die Flaschen mehrmals geschwenkt und das Medium entnommen. Anschließend wurden die Flaschen mit kaltem HBSS gewaschen. Das HBSS dient dazu, dass sich die Zellen besser vom Boden lösen. Nach Entnahme der Zellen wurden sie in 50ml Tubes überführt, und erneut zentrifugiert. Nach der Zentrifugation und anschließender Zellzählung konnte mit den so gewonnenen APZ das gewünschte Experiment durchgeführt werden.

4.2.2 Anreicherung von peripheren humanen mononukleären Leukozyten (PBMCs)

DZ-Medium:

- RPMI 1640
- 10% FCS
- 50U/ml *Penicillin*
- 50µg/ml *Streptomycin*
- 10mM HEPES
- 1mM Nicht-Essentielle Aminosäuren
- 110mg/ml Natrium-Pyruvat

Die Gewinnung von PBMCs (B-, T-, und NK-Zellen, Monozyten und Thrombozyten) erfolgte aus frischen „*buffy coats*“ gesunder Blutspender aus dem

Institut „Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin“ am Universitätsklinikum Gießen.

Die Gewinnung erfolgte aus dem peripheren Blut gesunder Spender mit „Ficoll-Paque“ (Böyum, 1968). Dazu wurde das Blut auf ein zuvor vorgelegtes Ficollkissen geschichtet. Dabei werden Blutbestandteile unterschiedlicher Dichte aber ähnlicher Masse voneinander getrennt. Ficoll ist ein synthetisches Polysaccharid aus Saccharose und Epichlorhydrin. Es führt zur Agglutination von Erythrozyten, und beschleunigt somit deren Sedimentation. Auf Grund unterschiedlicher Dichte und dem damit einhergehenden Sedimentationsverhalten, erfolgt die Bildung von Schichten verschiedener Zelltypen. Dabei bildet sich eine Interphase mit mononukleären Zellen.

Zur Gewinnung der Interphase wurden 20ml peripheren Blutes in einem 50ml Falcon-Tube mit 30ml PBS gemischt. Anschließend wurde das Blut/PBS-Gemisch vorsichtig auf in 50ml Falcon-Tubes vorgelegten 15ml „Ficoll-Paque“ geschichtet. Zu beachten war, dass sich das Blut/PBS-Gemisch nicht mit dem „Ficoll-Paque“ mischt. Nach dem Beschichten erfolgte die Zentrifugation der Zellen bei 1500rpm für 30min ohne Bremse. Nach der Zentrifugation bildeten sich die oben erwähnten Schichten verschiedener Zelltypen. Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen sammeln sich am Boden im Zellpellet an. Über dem Pellet befindet sich das „Ficoll-Paque“. In der Schicht über dem „Ficoll-Paque“ befindet sich die Interphase angereichert mit mononukleären Zellen. In der Schicht über dem Interphasering befinden sich im Blutplasma die Thrombozyten, denen aufgrund ihrer geringen Masse die Zentrifugationszeit nicht ausreicht, um zu sedimentieren.

Die in der Interphase angereicherten mononukleären Zellen wurden mit Hilfe einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt, auf 2 50ml Falcon-Tubes überführt und mit PBS auf 50ml aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 700rpm für 10min. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet aufgerüttelt und erneut mit PBS auf 50ml aufgefüllt und bei der gleichen Geschwindigkeit zentrifugiert. Die entstandenen Pellet wurden vereinigt, und in 5ml PBS/EDTA/BSA-Puffer aufgenommen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einem automatischen Zellzähler, welches auch in der Routinediagnostik zum Einsatz kommt (SYSMEX).

4.2.3 Klinische Proben

Nach Zustimmung der Ethikkommission (AZ 136/10) und mit Einverständnis der Patienten wurden auch Restblutproben von Patienten unter Photopherese-Therapie untersucht.

Zunächst erfolgte eine Zellzahlbestimmung durch den automatischen Zellzähler „Sysmex“. Anschließend wurde 1ml des Apheresats vor, und nach der ECP-Behandlung in 24-well Platten überführt. Das periphere Blut wurde zunächst 1 zu 5 mit humanem DZ-Medium verdünnt, von dem anschließend ebenfalls 1ml überführt wurde. Sowohl vom Apheresat, als auch vom peripheren Blut wurden jeweils zwei Ansätze in Kultur genommen. Zum einen der Ansätze erfolgte die Zugabe von 0,1µg/ml LPS. Anschließend wurden die Zellen über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Ansätze bei 0,4xg für 5min zentrifugiert, und die Überstände anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. In den Überständen wurden IL-1β und IL-18 mittels ELISA bestimmt.

4.2.4 Versuchsaufbau der experimentellen Photopherese

Nachdem die verschiedenen Zelltypen wie zuvor beschrieben isoliert und die Zellzahl bestimmt worden war, wurden diese in den folgend beschriebenen Versuchsaufbau eingesetzt. Soweit nicht anders angegeben erfolgten der Einsatz muriner Zellen mit einer Konzentration von 1×10^6 /ml und humaner Zellen mit 2×10^6 /ml, und der Versuchsaufbau nach dem dargestellten Schema.

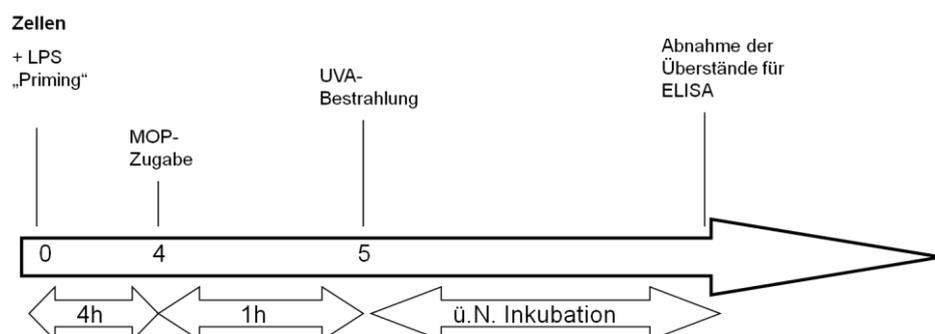


Abb. 6. **Schematische Darstellung der zeitlichen Abfolge des Versuchsaufbaus der experimentellen Photopherese.** Nach dem „LPS-Priming“ der Zellen für vier Stunden erfolgte die Zugabe von MOP für eine weitere Stunde mit anschließender UVA-Bestrahlung. Im Anschluss an die Bestrahlung erfolgte die Inkubation der Zellen über Nacht und Entnahme der Überstände für die anschließende ELISA-Messung.

Nachdem die Zellen in 24-well Platten überführt wurden, erfolgte die Zugabe von LPS für vier Stunden, und die Inkubation der Platten im Brutschrank. Im Anschluss an die Inkubation wurde den entsprechenden Ansätzen die photosensibilisierende Substanz 8-MOP in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde im Brutschrank erfolgte die UVA-Bestrahlung in der zuvor mit Isopropanol desinfizierten Bestrahlungskammer. Innerhalb der Kammer befinden sich zwei Elektroden zwischen denen die zu bestrahlende Platte ohne Deckel platziert wird. Die Platzierung zwischen den Elektroden gewährleistet, dass alle Ansätze der gleichen Bestrahlungsintensität ausgesetzt werden. Die Bestrahlungsintensität wurde mit einem externen Messgerät, dem sogenannten RM-21 Dosimeter der Firma Dr. Gröbel UVA-Elektronik GmbH, kontrolliert.

In den Experimenten wurden verschiedene Parameter analysiert, bei denen die Konzentration (8-MOP, LPS und Zellkonzentration), die UVA-Dosis (Bestrahlungsstärke), Zelltyp und die Inkubationsdauer verändert wurden. Bei jedem durchgeführten Versuch wurden sowohl Positiv- als auch Negativ-Kontrollen mitgeführt. Bei den Negativ-Kontrollen handelte es sich um Ansätze ohne MOP-Zugabe mit und ohne Bestrahlung, sowie um Ansätze ohne LPS-Zugabe mit oder ohne MOP-Zugabe und mit oder ohne Bestrahlung. Zu den Positiv-Kontrollen erfolgte nach 4-Stündiger LPS-Stimulation entweder die Zugabe 5mM ATP (Sanz & Di Virgilio, 2000) oder die Zugabe von 20µM Nigericin (Duell et al., 2010) für eine weitere Stunde.

In Ansätzen ohne MOP, erfolgte die Zugabe der MOP-Trägersubstanz als Vehikelkontrolle (96% Ethanol, 0,9% Na-Chlorid).

4.2.5 Biochemische und immunologische Methoden

4.2.5.1 Apoptose-Messung

Die Apoptose-Messung erfolgte nach 4h, 8h und 24h am Durchflusszytometer mittels einer Annexin-V und 7-Actinomycin (7-AAD)-Färbung gemäß Herstellerangaben. Das Annexin-V bindet an das bei der Apoptose nach außen gelangende Phosphatidylserin (PS). Da nekrotische Zellen eine durchlässige Membran haben, und das Annexin-V somit in die Zelle eindringen kann, und sich

an die Membraninnenseite bindet, ist eine Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen nicht mehr gewährleistet. Um eine Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen treffen zu können, wurden die Zellen daher zusätzlich mit 7-AAD gefärbt. 7-AAD ist ein wasserlöslicher DNA-Farbstoff. Dieser gelangt durch die durchlässige Membran in die Zelle, und kann sich so an einzelsträngige DNA binden. Durch seine fluoreszierende Eigenschaft ist es in Kombination mit Annexin-V in der Lage ein Messsignal zu erzeugen, um so vitale, früh- und spätapoptotische Zellen voneinander zu unterscheiden.

Als Kontrollen wurden Zellen ohne Bestrahlung mit 8-MOP sowie mit 8-MOP ohne UVA-Bestrahlung eingesetzt. Um die Vitalität der Zellen zu Beginn des Experimentes zu bestimmen, erfolgte zudem die durchflusszytometrische Analyse vor 8-MOP und UVA-Einsatz.

4.2.5.2 Zellzahlbestimmung

Für murine Zellen erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Nachdem die Zellen in einem definierten Volumen aufgenommen wurden, wurden sie mit einer bestimmten Verdünnung mit Trypanblau gefärbt, und anschließend unter dem Mikroskop die Zellzahl bestimmt. Trypanblau dient zur Identifikation von toten Zellen. Es wird von intakten Zellen ausgeschlossen und dringt in apoptotische Zellen ein. Somit werden die toten Zellen durch die Blaufärbung angezeigt.

Bei humanen Zellen erfolgte die Bestimmung der Zellzahl dagegen vollautomatisiert im Sysmex KX-21N.

4.2.5.3 *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)* zum Nachweis von „mature“- und pro-IL-1 β

Außer dem Waschpuffer wurden alle nötigen Komponenten im Kit mitgeliefert.

Waschpuffer:

- 900ml Millipore-H₂O
- 100ml 10x PBS
- 0,5ml Tween-20

Der ELISA ist eine immunologische Methode die in den frühen 1970er-Jahren parallel von zwei Arbeitsgruppen (Avrameas & Guilbert, 1971; Engvall & Perlman, 1971) beschrieben wurde. Sie dient der Konzentrationsbestimmung von in Lösung befindlichen Molekülen wie z.B. Hormonen oder Zytokinen. Die Wells sind mit IL-1 β spezifischen monoklonalen Antikörpern beschichtet. Das in der Probe enthaltene IL-1 β bindet an die auf den Mikrowells gebundene Antikörper. Anschließend erfolgt die Zugabe Biotin konjugiertem anti-IL-1 β Antikörper. Diese bindet an das IL-1 β , welches an die Antikörper der Mikrowells gebunden ist. Streptavidin-HRP wird zugegeben und bindet an Biotin konjugierte anti-IL-1 β Antikörper. Durch Zugabe einer HRP reaktiven Substratlösung kommt es zu einer Farbreaktion die proportional zur Menge der in der Probe vorhandenen IL-1 β ist. Je höher die IL-1 β Menge ist, desto intensiver ist die Farbentwicklung in den Vertiefungen. Die Reaktion wird im nächsten Schritt durch Zugabe von Säure gestoppt, und die optische Dichte bei 450nm gemessen.

In der vorliegenden Arbeit wurden für den Nachweis von mature- und pro-IL-1 β die Ready-Set-Go![®] Mouse mature-/pro-IL-1 β , und Ready-Set-Go![®] Human IL-1 β ELISA-Kits von eBioscience eingesetzt. Zur Detektion der pro-IL-1 β Form in humanen Proben erfolgte der Einsatz des „Quantikine[®] Human pro-IL1 β Immunoassay“ der Firma R&D Systems. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Die bei -20°C gelagerten Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, und nach Herstellerangaben aufgetragen. Um Schwankungen beim pipettieren auszuschließen, erfolgte für jeden Ansatz eine Doppelbestimmung. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte unter Verwendung einer Standardreihe. Die Extinktion wurde mit dem Photometer TECAN Sunrise (Crailsheim) bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen. Die Ermittlung des Zytokingehaltes erfolgte mit Hilfe der Magellan Software V6.5. Alle Waschschrte erfolgten vollautomatisch mit Hilfe des „ELISA-Washers“ TECAN Hydroflex (Crailsheim).

4.2.5.4 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) IL-18

Neben der Sekretion von IL-1 β wurde zudem die Sekretion von IL-18 bestimmt. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerangaben (MBL).

4.2.5.5 Durchflusszytometrie

Hintergrund

Die Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated-cell-sorter*) erlaubt die Analyse und somit Unterscheidung von Zellen in einer Zellsuspension anhand ihrer Größe, Granularität, Oberflächeneigenschaften und intrazellulärer Zusammensetzung. Um die Analyse durchführen zu können, werden in der Regel mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte Antikörper eingesetzt, die gegen bestimmte zelluläre Oberflächenstrukturen gerichtet sind. Die Zellen werden nach der Antikörper-Markierung durch eine Kapillare gesaugt, und passieren im Sensormodul im Flüssigkeitsstrom einzeln einen Laserstrahl. Die Besonderheit liegt darin, dass die Zellen einzeln mit einer enormen Geschwindigkeit analysiert werden. Die Erfassung durch einen Laserstrahl führt zu Anregung der gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe, die dadurch Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Das Licht wird anschließend in einem System aus Spiegeln und Filtern gebündelt und zerlegt, so dass, für jeden unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff ein spezifisches Signal auftritt. Die dabei entstehenden Lichtstreuungen geben einen Anhaltspunkt für die Größe (FSC – *forward scatter*), und der Granularität (SSC – *sideward scatter*) der Zellen.

Durchführung

Waschpuffer:

- 0,1% Natriumazid
- 1% FCS
- 1x PBS

Die Färbung der am FACS zu bestimmenden Zellen erfolgte für jeden Versuch identisch. Lediglich die eingesetzten monoklonalen Antikörper unterschieden sich. Um die Reinheit der aus den MACS-gesorteten CD11b- bzw. CD14-Zellen (Monozyten/Makrophagen), oder die Konzentration an dendritischen Zellen die nach einer Woche in Kultur geerntet und im Experiment eingesetzt wurden, zu bestimmen, erfolgte deren durchflusszytometrische Analyse. 1×10^6 Zellen wurden, in der Regel in ein FACS-Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1ml kaltem Waschpuffer, und die Zentrifugation bei 1500rpm für 5min. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert, und das Pellet aufgerüttelt. Zu der entstandenen Zellsuspension wurden 10µl Maus-Serum (Human-Serum bei humanen Zellen) zugegeben, und die Röhrchen für 15min auf Eis im Dunkeln

inkubiert. Mit Hilfe des Serums werden Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche blockiert, so dass sie keine unspezifischen Bindungen eingehen. Nach der Inkubation mit dem Fc-Blocker erfolgte die Zugabe der entsprechenden monoklonalen Antikörper für 20min auf Eis im Dunkeln. Im Anschluss an die zweite Inkubation erfolgte das Entfernen der nicht-gebundenen Antikörper durch Zugabe von einem weiteren Milliliter kalten Waschpuffer, mit anschließender Zentrifugation bei 1500rpm für 5min. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert, das Pellet aufgerüttelt und 200µl Waschpuffer zugegeben. Es folgte die Messung am FACS. Um dabei auch die Menge an toten Zellen zu bestimmen, erfolgte 5 Minuten vor der Messung die Zugabe von Cytox-Blue Vitalitätsfarbstoff (1mM).

4.2.5.6 Western Blot

Die Überstände aus den jeweiligen Experimenten wurden gesammelt, das Volumen definiert, und bis zur anschließenden Western Blot Analyse bei -20°C gelagert. Die Western Blots wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Prof. Hornung von Herrn Christopher Jakobs (Institut für Klinische Chemie und Pharmakologie, Universitätsklinikum Bonn) mit den folgend aufgeführten Antikörpern durchgeführt.

Eingesetzte Primär Antikörper:

- mCaspase-1 (Fa. Santa Cruz # SC-514): 1:200 in 1% Milk/PBST für mindestens 24h
- mL-1 β (Fa. BD IL-1 β Detection AB aus ELISA Duo-Set):1:1000 in 1% Milk/PBST über Nacht bei 4°C
- hCaspase-1 (Fa. Santa Cruz # SC-515): 1:200 in 1% Milk/PBST über Nacht bei 4°C
- hIL-1 β (Cell Signalling 2022): 1:1000 in 1% Milk/PBST über Nacht bei 4°C

Eingesetzte Sekundär Antikörper:

- anti goat bzw. anti rabbit hrp (Fa. Santa Cruz): 1:5000 für 120 Minuten bei RT
- 3 Mal für 7 Minuten in PBST waschen

- Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Fa. Thermo Scientific)

4.2.6 Statistik

Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM. Die statistischen Analysen wurden mit der Prism 5.02 Software (*Graphpad software, Inc.*) durchgeführt. Mittelwertvergleiche wurden mit dem *One way ANOVA Test* oder zweiseitigen T-Test durchgeführt. Als post-hoc Test nach ANOVA Test wurde der *Turkey Test* eingesetzt. Eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant erachtet.

5 Ergebnisse

5.1 Validierung der experimentellen Photophoresis

5.1.1 Apoptoseinduktion

Eines der Charakteristika der experimentellen Photophoresis ist die Apoptose-Induktion in UVA-bestrahlten Leukozyten. Daher wurde die Apoptose-Induktion in murinen Leukozyten untersucht. Die Bestimmung der Apoptose erfolgte mit Hilfe der Annexin-V und 7-AAD Färbung 4h, 8h sowie 24h nach Einsatz der experimentellen Photophoresis (Abb. 7, Abb. 8).

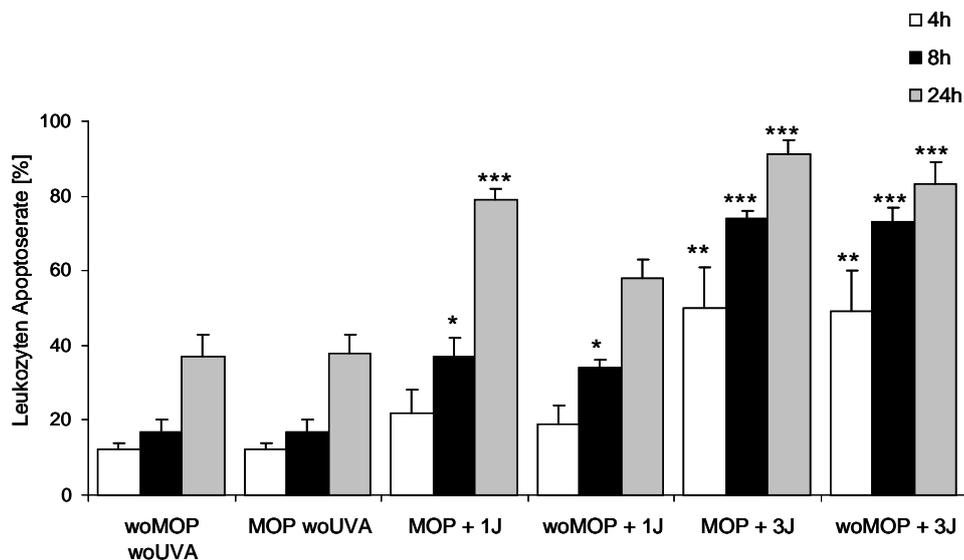


Abb. 7. **Der Einsatz von MOP in Kombination mit UVA führt über eine Zeitdauer von 24h zu einer starken Induktion von Apoptose in murinen Leukozyten.** Bestimmung der Apoptose und Zelltod erfolgte mit Hilfe von Annexin-V und 7-AAD Färbung nach 4h, 8h und 24h. Mit zunehmender Bestrahlungsintensität (vergl. MOP + 1J mit MOP + 3J) sowie zunehmender Zeitdauer steigt die Menge an Annexin-V und/oder 7-AAD positiven Zellen an. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei (+/-MOP mit 1 bzw. 3J) und vier (Kontrollen woMOP & woUVA und MOP & woUVA) voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Daten zum Zeitpunkt 0h (unbehandelt) ($n=5$) nicht dargestellt ($< 7\%$ apoptotisch). (Mittelwert \pm SEM). Statistik: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ versus Kontrolle wo MOP wo UVA.

Durchflusszytometrische Analysen zeigten, dass die Proben bei denen die experimentelle Photophoresis zum Einsatz kam im Vergleich zu den Kontrollen (woMOP, woUVA; Abb. 7) eine signifikant erhöhte Menge Annexin-V und/oder 7-AAD-positiver Zellen aufweisen. Die Messungen weisen auf eine Zunahme der

Apoptoserate mit zunehmender Zeitdauer hin. Verdeutlicht wird diese Beobachtung beim Vergleich der Messungen nach 4 und 24h in den Ansätzen mit 8-MOP in Kombination mit 1 bzw. 3 Joule/cm² UVA-Bestrahlung. Beim Einsatz von 1 Joule ist eine Zunahme der Apoptoserate von 22% nach 4h Inkubation auf 79% nach 24h zu erkennen. Im Ansatz 1 Joule ohne zusätzliche 8-MOP-Zugabe fällt die induzierte Apoptoserate geringer aus (19% nach 4h und 58% nach 24h). Die Erhöhung der Bestrahlungsintensität auf 3 Joule führt nach 24h zu einer höheren Apoptoserate (91%) als bei 1 Joule. Die Analyse von Zellen ohne Behandlung, direkt nach Aufreinigung, ergab eine Apoptoserate von unter 7% (Daten hier nicht dargestellt).

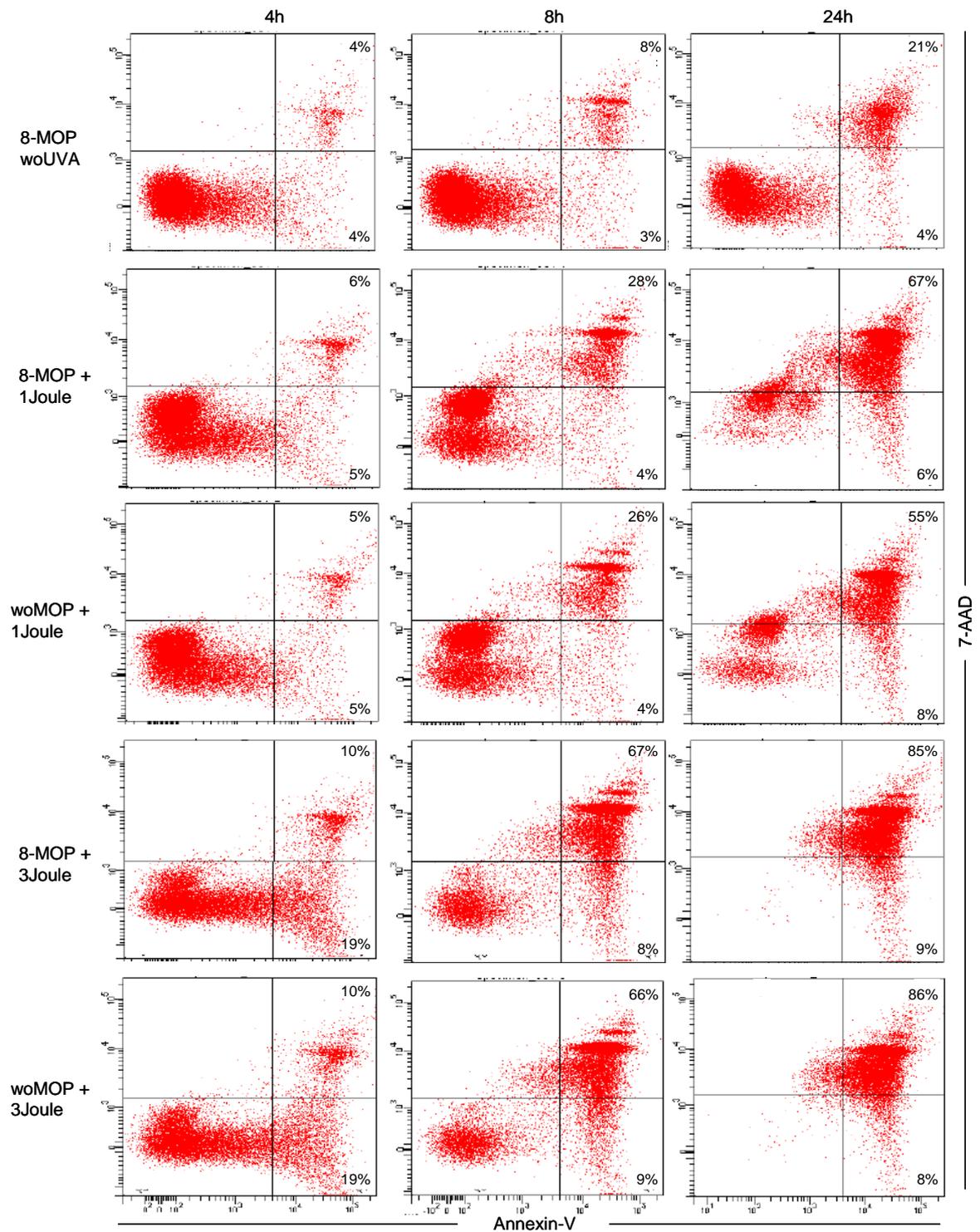


Abb. 8. **Der Einsatz der experimentellen Photophorese führt in murinen Leukozyten zur Induktion von Apoptose.** Bestimmung der Apoptose und Zelltod erfolgte mit Hilfe von Annexin-V und 7-AAD Färbung nach 4h, 8h und 24h. Im Vergleich zur Kontrolle (8-MOP woUVA) führt der Einsatz von 8-MOP in Kombination mit UVA-Bestrahlung zu einer höheren Menge an Annexin-V und/oder 7-AAD positiven Zellen. Dargestellt ist eine repräsentative Kultur aus vier Experimenten.

5.2 Modulation der IL-1 β Freisetzung in murinen Zellen durch experimentelle Photopherese

5.2.1 Vorversuche in Milz-Zellen und CD11b⁺-Zellen

Zur Untersuchung der Modulation der IL-1 β Freisetzung in murinen Zellen durch experimentelle Photopherese erfolgten zunächst Vorversuche in Milz-Zellen und CD11b-positiven Zellen. Der Einsatz muriner Zellen erfolgte, um mit diesen im Nachhinein weitergehende Experimente mit z.B. Knockout-Mäusen durchführen zu können, und so den Mechanismus, der zur IL-1 β Freisetzung führt, weiter eingrenzen zu können.

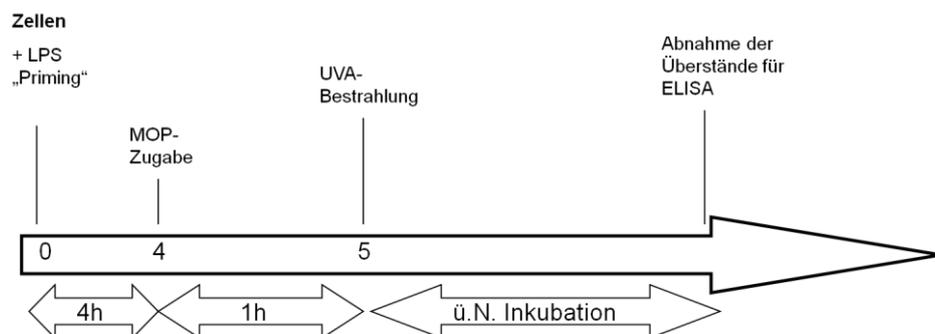


Abb. 9. **Schematische Darstellung der zeitlichen Abfolge des Versuchsaufbaus in Anwesenheit von LPS.** Nach dem „LPS-Priming“ der Zellen für vier Stunden erfolgte die Zugabe von MOP für eine weitere Stunde mit anschließender UVA-Bestrahlung. Im Anschluss an die Bestrahlung erfolgte die Inkubation der Zellen über Nacht und Entnahme der Überstände für die anschließende ELISA-Messung.

Im murinem System wurden verschiedene Zelllinien auf ihre Fähigkeit IL-1 β freizusetzen, untersucht. Dafür erfolgte zunächst der Einsatz von Milz-Zellen und aus Milz-Zellen CD11b-MACS-gesortete positive Zellen. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 1×10^6 /ml in 24-well Platten sowie 5×10^5 Zellen in einem Endvolumen von 200 μ l in 96-well Flachbodenplatten eingesetzt. Der Einsatz dieser Zelllinien im Versuchsaufbau, wie sie in Abb. 9 dargestellt ist, erbrachte keine ausreichende IL-1 β Freisetzung, um die modulierende Wirkung der experimentellen Photopherese auf die IL-1 β Freisetzung aufzeigen zu können.

5.2.2 Peritoneal-Makrophagen

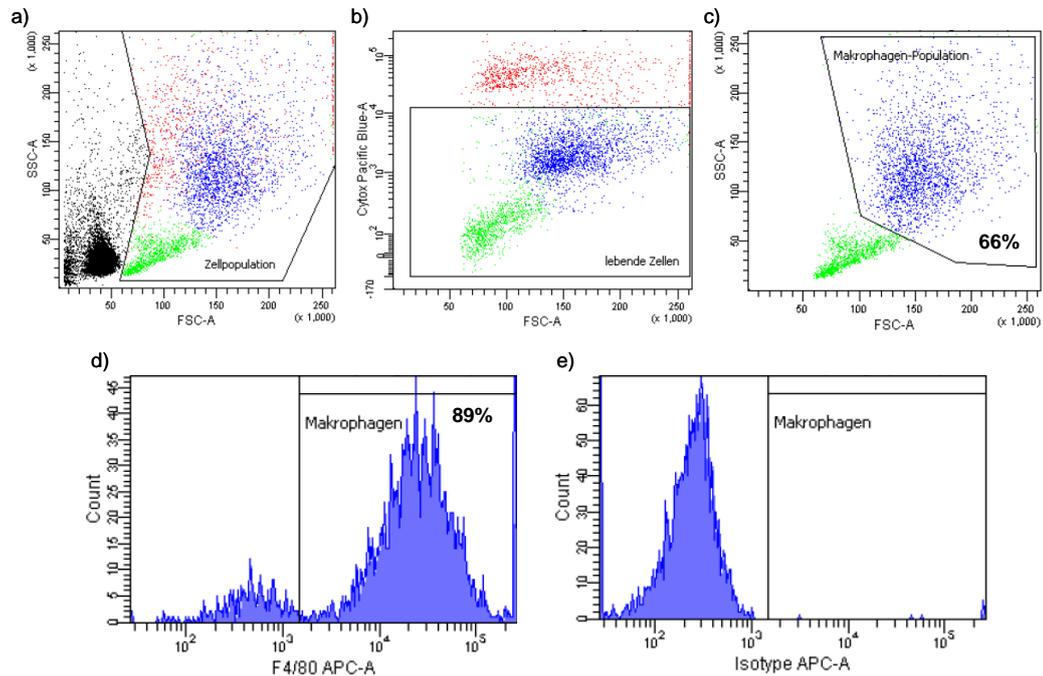


Abb. 10. **Durchflusszytometrische Analyse von Peritoneal-Makrophagen aus einer C57BL6/N Wildtyp Maus.** (a) Darstellung der relevanten Zellpopulation anhand von forward- und sideward scatter. (b) „Gatestrategie“ zur Darstellung der lebenden Zellen aus der Zellpopulation in (a) durch Einsatz von Cytox-Blue gegen forward scatter. (c) Menge an Makrophagen aus der lebenden Zellfraktion. (d) Darstellung der Makrophagen anhand des Oberflächenmarkers F4/80 mit dazugehörigen Isotypkontrollen (e) im Histogramm.

Zur Bestimmung der Makrophagen wurde die Expression des Oberflächenmarkers F4/80 herangezogen. Die Reinheit lag in der Regel bei >85%. Zunächst erfolgte das „Gaten“ der Makrophagen, mit anschließender Definition der lebenden Zellen durch Auftragen der Zellen gegen den Apoptose-Marker Cytox-Blue. Isotypkontrollen wurden mitgeführt, um unspezifische Antikörperbindungen zu erkennen.

Die durchflusszytometrisch analysierten Zellen wurden in dem Versuchsaufbau, wie sie in Abb. 9 dargestellt ist, eingesetzt.

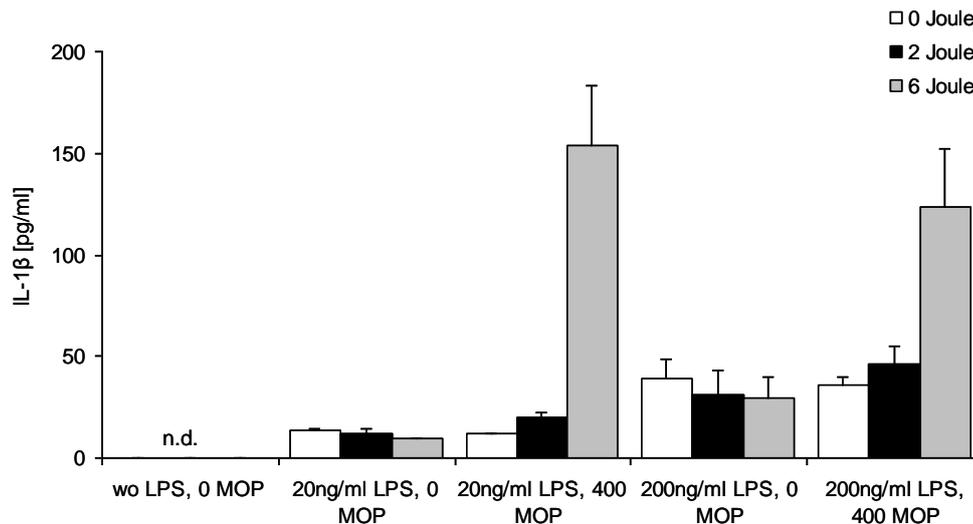


Abb. 11. **Peritoneal-Makrophagen setzen in Anwesenheit von Methoxypsoralen (MOP) und UVA-Strahlung erhöhte Mengen an IL-1 β frei.** „LPS-Priming“ erfolgte mit 20 und 200ng/ml, und die eingesetzte MOP-Konzentration betrug 400ng/ml. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten (Mittelwert \pm SEM) (n.d. = unter der Nachweisgrenze von 7,8pg/ml). Der Versuchsaufbau erfolgte wie in Abb. 9 beschrieben.

Die Untersuchung der Peritoneal-Makrophagen zeigt deutliche IL-1 β Werte auch bei niedrigen LPS-Stimulationen. Der Einsatz der Zellen ohne LPS-Stimulation und MOP-Zugabe (Kontrolle) zeigt keine IL-1 β Freisetzung. Erfolgt eine LPS-Stimulation ohne MOP-Zugabe, so ist eine geringe Freisetzung zu erkennen. Durch die Zugabe von 400ng/ml MOP in Kombination mit UVA-Bestrahlung in zuvor „LPS-Stimulierten“ Zellen, ist eine deutliche Freisetzung zu erkennen. Die Freisetzung steigt mit zunehmender Bestrahlungsintensität an, und erreicht ihr Maximum beim Einsatz von 6 Joule/cm² mit einer freigesetzten Menge von 153pg/ml. Der Einsatz höherer LPS-Dosen zeigt eine Freisetzung bereits in den Ansätzen ohne zusätzliche MOP-Zugabe. Die Zugabe von 400ng/ml MOP zeigt zwar eine deutliche Zunahme der freigesetzten IL-1 β Menge, diese fällt jedoch geringer aus als beim Einsatz niedrigerer LPS-Stimulationen.

5.2.3 Makrophagen aus Knochenmark

Es ist bekannt, dass Knochenmark in konditioniertem Medium mit L929 Überstand zu einer hohen Ausbeute an Makrophagen führt (Stanley et al., 1978). Der Überstand dient dabei als Quelle für Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (M-CSF). Um das zu überprüfen, und die Anzahl an Makrophagen ermitteln zu können die pro Ansatz eingesetzt werden, erfolgte vor Einsatz der Zellen im

Experiment eine durchflusszytometrische Analyse. Dargestellt ist eine repräsentative Kultur aus vier Experimenten.

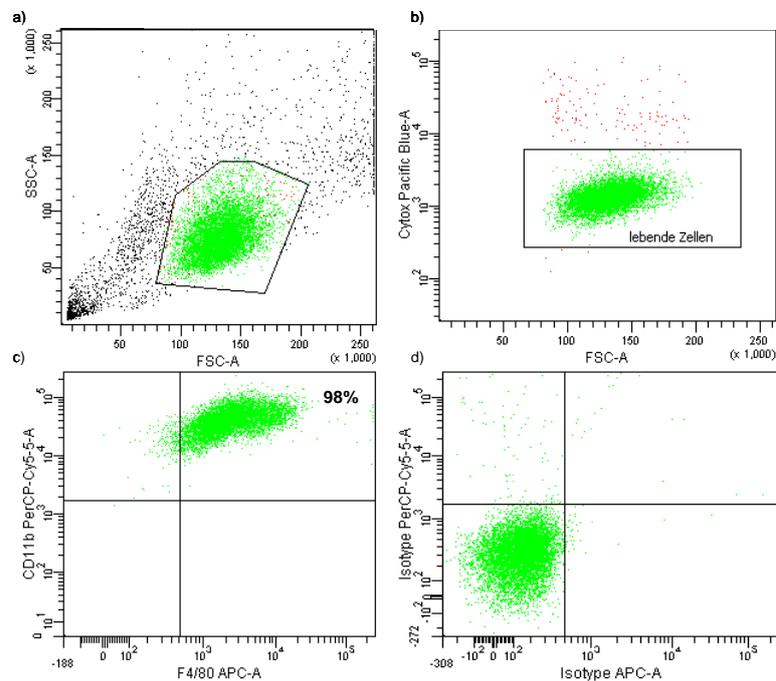


Abb. 12. **Durchflusszytometrische Analyse der Makrophagen-Expansion aus einer C57BL6/N Knochenmark-Kultur die mit 30% L929-Überstand versetzt wurde.** (a) Darstellung der relevanten Zellpopulation anhand von forward- und sideward scatter. (b) „Gatestrategie“ zur Darstellung der lebenden Zellen aus der Zellpopulation in (a) durch Einsatz von Cytox-Blue gegen forward scatter. (c) Menge an Makrophagen aus der lebenden Zellfraktion anhand der Oberflächenmarker CD11b gegen F4/80 mit dazugehörigen Isotypkontrollen (d). Dargestellt ist eine repräsentative Kultur aus vier Experimenten.

Als Maß für die Entwicklung von adhärent wachsenden Makrophagen wurde die Expression der Oberflächenmarker CD11b und F4/80 herangezogen. Die Makrophagen-Reinheit lag bei 98%.

Die durchflusszytometrisch analysierten Zellen wurden anschließend in dem Versuchsaufbau, wie sie in Abb. 9 dargestellt ist, eingesetzt.

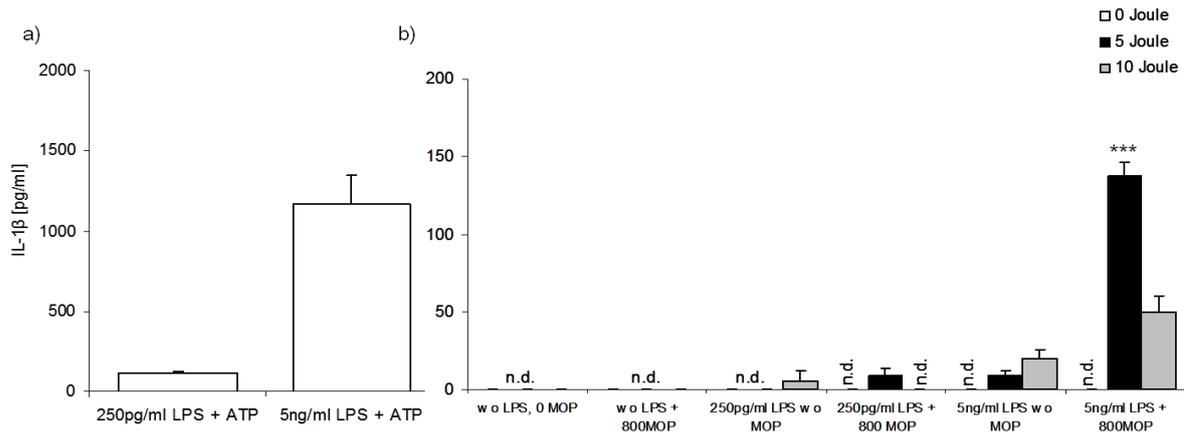


Abb. 13. **UVA-Licht und MOP fördern die IL-1 β Freisetzung nach "LPS-Priming" in aus dem Knochenmark mit L929-Überstand generierten Makrophagen.** (a) Positiv-Kontrollen erfolgten mit 250pg und 5ng/ml "LPS-Priming" für vier Stunden mit anschließender Zugabe von ATP für eine weitere Stunde. (b) "LPS-Priming" erfolgte mit 250pg und 5ng/ml, und die eingesetzten MOP-Konzentrationen betragen 0 und 800ng/ml. Dargestellt sind die Ergebnisse von vier voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten (Mittelwert \pm SEM) (n.d. = unter der Nachweisgrenze von 7,8pg/ml). Der Versuchsaufbau erfolgte wie in Abb. 9 beschrieben. Statistik: *** $p < 0.001$ versus 5ng/ml LPS wo MOP 0 Joule.

Der Einsatz von aus dem Knochenmark generierten Makrophagen bestätigt, dass UVA-Licht und MOP die LPS-stimulierte IL-1 β Freisetzung fördern. Die Positiv-Kontrolle (Abb. 13a) mit 5ng/ml LPS mit ATP zeigt eine IL-1 β Freisetzung von 1168pg/ml. Beim Einsatz der geringeren LPS-Konzentration (250pg/ml) ist eine Freisetzung von 113pg/ml zu messen gewesen. Der Ansatz mit 5ng/ml LPS-stimulierten Zellen zeigt eine deutliche Freisetzung beim Einsatz von 800ng/ml MOP in Kombination mit 5 Joule/cm² UVA-Bestrahlung (137pg/ml). Die Freisetzung nimmt bei Erhöhung der Bestrahlungsdosis auf 10 Joule, auf einen Wert von 50pg/ml ab (Abb. 13b). Die freigesetzten Mengen beim Einsatz der geringeren LPS-Konzentration bewegen sich an der ELISA-Nachweisgrenze.

5.2.4 Dendritische Zellen

5.2.4.1 Durchflusszytometrische Kontrolle der DZ-Differenzierung

Um die Menge an DZ zu ermitteln die pro Ansatz eingesetzt wurden, erfolgte von jeder Knochenmarks-Kultur die im Experiment zum Einsatz kam, die in Abb. 14 dargestellte durchflusszytometrische Analyse. Dargestellt ist eine repräsentative Kultur aus mehr als zehn Experimenten.

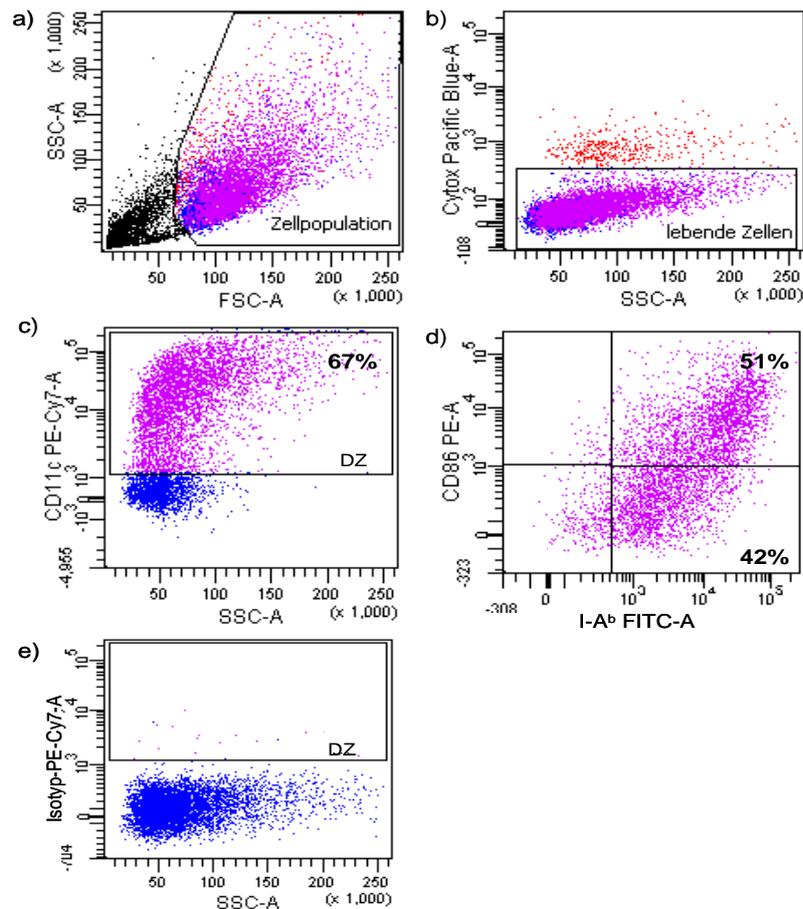


Abb. 14. **Durchflusszytometrische Analyse der DZ-Expansion aus einer C57BL6/N Knochenmark-Kultur.** (a) Darstellung der relevanten Zellpopulation anhand von forward- und sideward scatter. (b) „Gatestrategie“ zur Darstellung der lebenden Zellen aus der Zellpopulation in (a) durch Einsatz von Cytox-Blue gegen sideward scatter. (c) Menge an DZ aus der lebenden Zellfraktion anhand des Oberflächenmarkers CD11c mit dazugehöriger Isotypkontrolle (e). (d) Dot-Plot Darstellung reifer DZ anhand der Reifungsmarker CD86 und I-A^b. Dargestellt ist eine repräsentative Kultur aus mehr als zehn Experimenten.

Anhand der exemplarisch dargestellten Kultur ist ersichtlich, dass der Anteil der differenzierten DZ bei 67% liegt. In der Regel lag der Anteil der differenzierten DZ nach in-vitro Expansion bei 60-70% der vitalen Zellen.

5.2.4.2 IL-1 β Freisetzung in Anwesenheit von LPS

Die aus dem Knochenmark gewonnenen DZ wurden in dem Versuchsaufbau, wie sie in Abb. 9 dargestellt ist, eingesetzt. Zum „Primen“ der Zellen wurden zwei verschiedene LPS-Konzentrationen verwendet- 250pg und 5ng/ml LPS. Um zu überprüfen, ob der Einsatz verschiedener MOP-Konzentrationen einen Einfluss auf die Modulation der IL-1 β Freisetzung durch den Einsatz der experimentellen Photopherese hat, erfolgte der Einsatz verschiedener MOP-Konzentrationen.

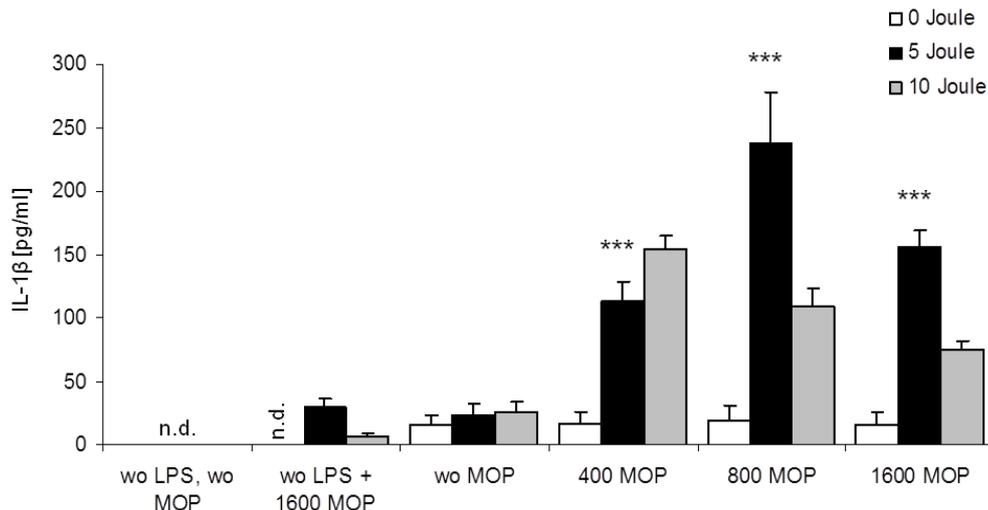


Abb. 15. **UVA-Licht und MOP fördern die IL-1 β Freisetzung nach "LPS-Priming" mit 250pg/ml.** Die eingesetzte MOP-Konzentration lag zwischen 0 und 1600ng/ml. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten (Mittelwert \pm SEM) (n.d.= unter der Nachweisgrenze von 7,8pg/ml). Der Versuchsaufbau erfolgte wie in Abb. 9 beschrieben. Statistik: *** p <0.001 versus wo MOP 0 Joule.

Die erzielten Daten zeigen eine UVA-Licht und MOP-abhängige IL-1 β Freisetzung nach Primen der Zellen mit LPS (Abb. 15). Es ist zu erkennen, dass durch Einsatz verschiedener Bestrahlungsdosen die Freisetzung unterschiedlich ausfällt. Am deutlichsten ist dieser Effekt beim Einsatz von 800ng/ml MOP zu erkennen. Diese zeigt eine Steigerung der Freisetzung von 19pg/ml (ohne Bestrahlung) auf 203pg/ml beim Einsatz von 5 Joule UVA-Bestrahlung, und fällt bei einer erneuten Erhöhung der Bestrahlungsdosis auf 109pg/ml ab. Betrachtet man die freigesetzte Menge beim Einsatz von 5 Joule bei unterschiedlichen MOP-Konzentrationen, so ist zu erkennen, dass die Freisetzung beim Einsatz von 800ng/ml am höchsten ist, und bei 1600ng/ml wieder abnimmt. Des Weiteren ist eine stufenweise Abnahme der freigesetzten Menge beim Einsatz von 10 Joule zu erkennen. Diese liegt beim Einsatz von 400ng/ml MOP bei 154pg/ml und fällt bei beim Einsatz von 1600ng/ml MOP auf 75pg/ml ab.

Durch den Einsatz der geringen LPS-Konzentration wird die modulierende Wirkung der experimentellen Photoperese auf die IL-1 β Freisetzung deutlich dargestellt. Denn so kann die freigesetzte Menge nicht auf zu hohe LPS-Konzentrationen zurückgeführt werden. Um die Wirkung bei höheren LPS-Konzentrationen aufzuzeigen, erfolgte als nächstes der Einsatz von 5ng/ml LPS.

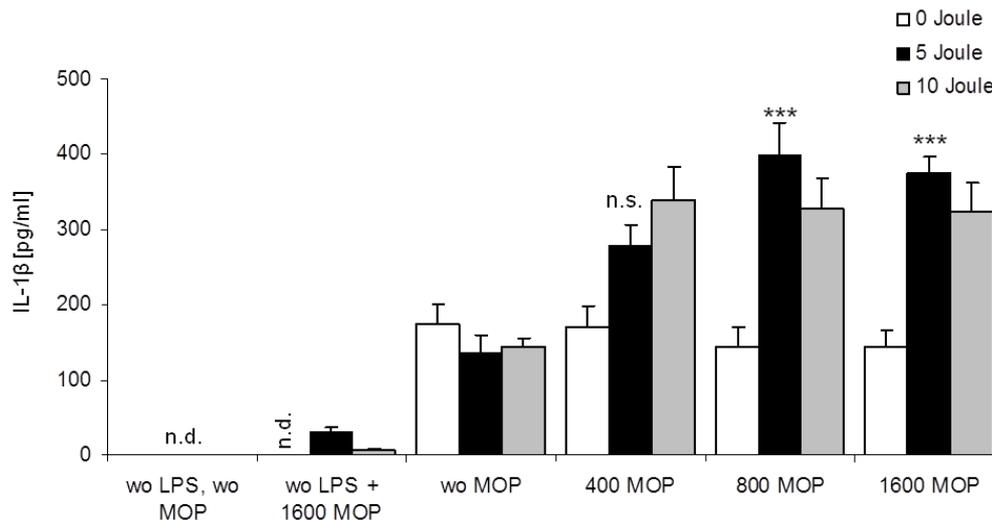


Abb. 16. **UVA-Licht und MOP fördern die IL-1 β Freisetzung nach "LPS-Priming" mit 5ng/ml.** Die eingesetzte MOP-Konzentration lag zwischen 0 und 1600ng/ml. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten (Mittelwert \pm SEM) (n.d.= unter der Nachweisgrenze von 7,8pg/ml). Der Versuchsaufbau erfolgte wie in Abb. 9 beschrieben. Statistik: ***p<0.001 versus wo MOP 0 Joule.

Beim Vergleich beider LPS-Dosen ist zu erkennen, dass der Einsatz der höheren Dosis auch eine höhere Freisetzung aufweist, jedoch mit dem Nachteil, dass die alleinige Zugabe von LPS ohne Bestrahlung bereits eine hohe Menge an IL-1 β freisetzt. Die LPS-Wirkung ist beim Ansatz ohne MOP ohne UVA am deutlichsten zu erkennen. Beim Vergleich beider LPS-Dosen zeigt sich jedoch die gleiche Tendenz, d.h. eine Steigerung der Freisetzung beim Einsatz von 5 Joule und eine Abnahme dieser bei Erhöhung auf 10 Joule.

In den Negativ-Kontrollen ohne LPS zeigt sich keine signifikante IL-1 β Freisetzung (Werte \leq 7,8pg/ml).

5.2.4.2.1 Western Blot Analyse zu C57BL6/N Wildtyp-Maus

Die Caspase-1 wird als ein 45-kDa großes Polypeptid synthetisiert. Es wird durch eine proteolytische Spaltung in die 10- und 20-kDa Untereinheiten der aktiven Form gespalten (Laliberte et al., 1999). Um überprüfen zu können, ob durch den Einsatz der experimentellen Photopherese die Pro-Caspase-1 (45kDa) in die aktive Form gespalten wird (Caspase-1 p10 *subunit*), und diese im nächsten Schritt die pro-IL-1 β Form (31kDa) in die mature-IL-1 β (17kDa) spaltet, erfolgte mit ausgewählten Ansätzen in Wildtyp-Mäusen eine Western-Blot Analyse.

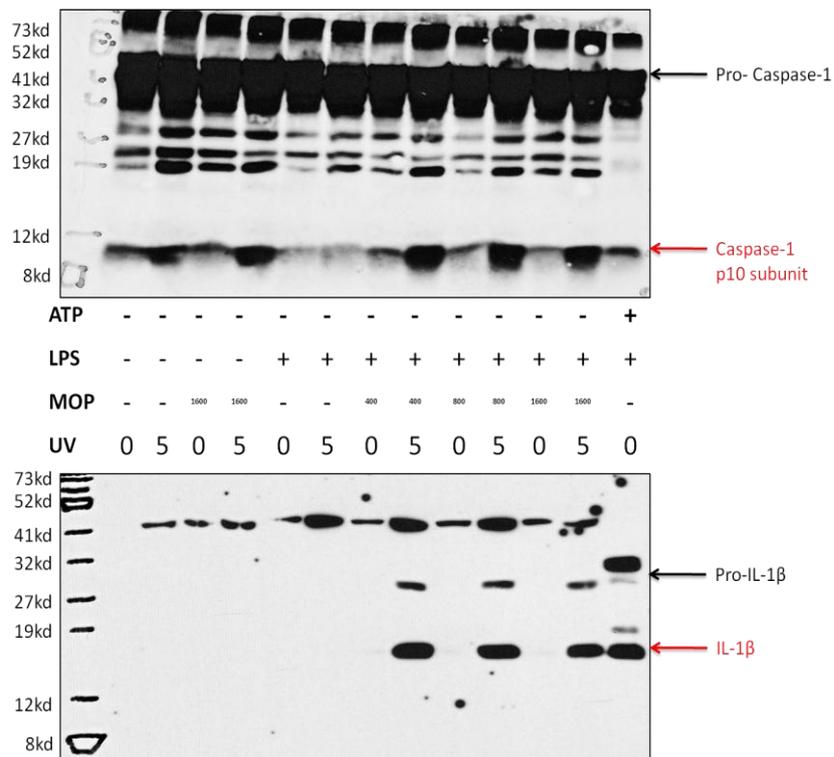


Abb. 17. **Western-Blot: UVA Licht und MOP geförderte Aktivierung der Caspase-1 mit einhergehender Freisetzung der aktiven IL-1 β Form in C57BL6/N Wildtyp-Mäusen.** Die Freisetzung/Aktivierung erfolgte in der gleichen Intensität wie die Positiv-Kontrolle (250pg/ml LPS + 5mM ATP). Zum „Priming“ erfolgte der Einsatz von 250pg/ml LPS. Die eingesetzte MOP-Konzentration lag zwischen 0 und 1600ng/ml. Der Versuchsaufbau erfolgte wie in Abb. 9 beschrieben. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei voneinander durchgeführten Western-Blots. (10% BIS/TRIS-Gel)

Anhand der Bandenintensität in der mitgeführten Positiv-Kontrolle (LPS + ATP) ist eine deutliche Spaltung der Pro-Caspase-1 in die aktive p10-Untereinheit, und die Spaltung der pro-IL-1 β Form in die mature-IL-1 β Form zu erkennen. Die gleiche Bandenintensität zeigt sich auch in den Ansätzen 400-, 800- bzw. 1600ng/ml MOP bei einer UVA-Bestrahlungsdosis von 5 Joule/cm². Es ist erkennbar, dass sowohl die Spaltung der inaktiven Caspase-1 als auch der pro-IL-1 β Form erst durch die Kombination von MOP mit UVA-Bestrahlung auftritt. Der Einsatz von MOP in Abwesenheit der UVA-Bestrahlung zeigt eine geringere Spaltung der Caspase-1 und kein aktives IL-1 β .

5.2.4.2.2 Einfluss der ATP-Hydrolyse

Die experimentelle Photoperese führt über eine Zeitdauer von 24 Stunden zu einer hohen Apoptoserate der eingesetzten Zellen (Abb. 7, Abb. 8). Daher lag die Vermutung nahe, dass dadurch ein ATP-Austritt aus dem Zytosol in den

Überstand erfolgt. Um zu überprüfen, ob freigesetztes ATP die IL-1 β Freisetzung mit verursacht, erfolgte der Einsatz von 10U/ml Apyrase zu den Ansätzen, wie sie in der Abb. 18 dargestellt ist. Die Apyrase ist ein Calcium-aktivierbares Plasmamembran- gebundenes Enzym, welches die Hydrolyse von ATP in AMP katalysieren kann, und somit die ATP-abhängige Aktivierung des P2X7-Ionenkanals unterbindet.

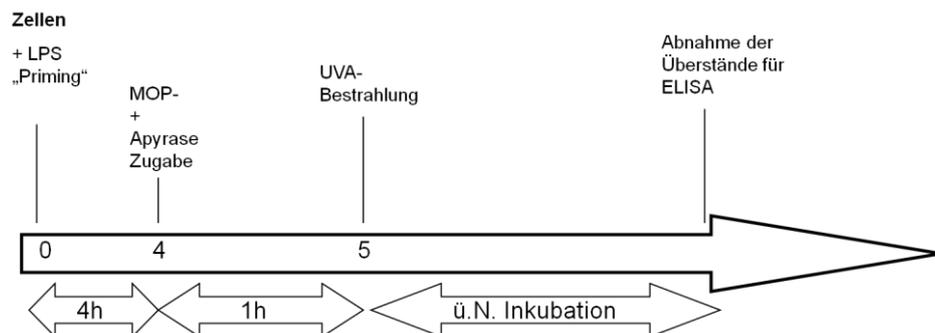


Abb. 18. **Schematische Darstellung der zeitlichen Abfolge des Versuchsaufbaus beim Einsatz der Apyrase.** Nachdem die Zellen für vier Stunden mit LPS „geprimt“ wurden, erfolgte die gleichzeitige Zugabe von MOP und Apyrase für eine weitere Stunde. Anschließend wurden die Zellen der entsprechenden UVA-Bestrahlung unterzogen und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Entnahme der Überstände für die anschließende ELISA-Messung.

Als Positiv-Kontrolle erfolgte die Inkubation von Zellen mit 5ng/ml bzw. 250pg/ml LPS für 4 Stunden mit anschließender gleichzeitiger Zugabe von ATP +/- Apyrase. Somit sollte die Wirkung der Apyrase auf das ATP deutlich dargestellt werden. Anhand der erhaltenen Daten (Abb. 19a) ist ersichtlich, dass die Zugabe von LPS mit anschließender Zuführung von externem ATP eine deutliche IL-1 β Freisetzung hervorruft. Die Freisetzung ist beim Einsatz der höheren LPS-Konzentration viel stärker. Durch die Zugabe der Apyrase ist eine Hemmung der Freisetzung ersichtlich. Es erfolgt durch Apyrase-Zugabe eine Abnahme der Freisetzung von 1199pg/ml auf 230pg/ml beim Einsatz von 5ng/ml LPS, und eine Abnahme von 197pg/ml auf 16pg/ml beim Einsatz von 250pg/ml LPS. Somit ist die Wirkung der Apyrase deutlich dargestellt. Die Negativ-Kontrolle mit 250pg/ml LPS ohne ATP weist eine Freisetzung an der ELISA-Nachweisgrenze von 7,8pg/ml auf.

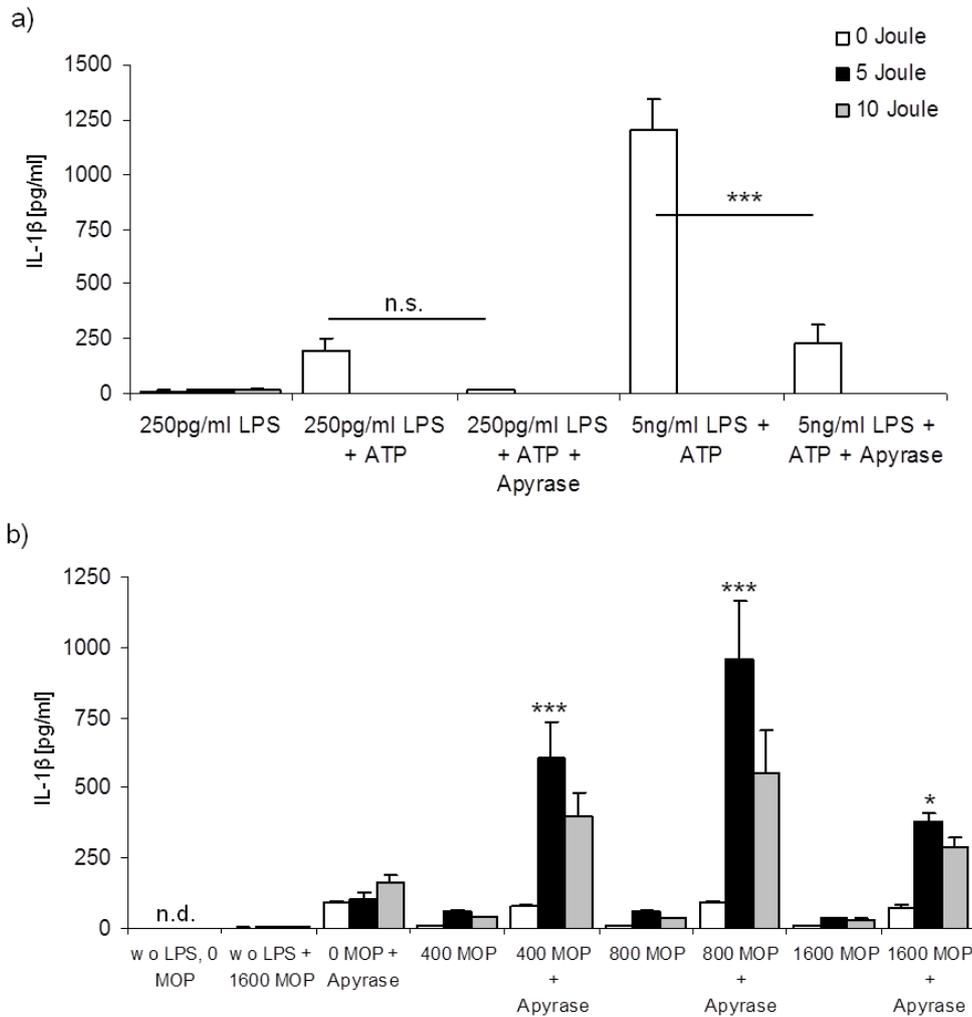


Abb. 19. **Der Einsatz der Apyrase (10U/ml) führt zu einer verstärkten IL-1 β Freisetzung nach experimenteller Photophorese.** (a) Positiv-Kontrolle erfolgte mit 5ng und 250pg/ml LPS für 4 Stunden mit anschließender gleichzeitiger Zugabe von ATP (5mM) und Apyrase. (b) „LPS-Priming“ erfolgte mit 250pg/ml, und die eingesetzte MOP-Konzentration lag zwischen 0 und 1600ng/ml. Dargestellt sind die Ergebnisse von fünf voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten (Mittelwert \pm SEM) (n.d. = unter der Nachweisgrenze von 7,8pg/ml). Der Versuchsaufbau erfolgte wie in Abb. 18 beschrieben. Statistik: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus Kontrolle wo MOP + Apyrase 0 Joule.

Anhand der Kontrollen konnte die Wirkung der Apyrase dargestellt werden. Daher erfolgte im nächsten Schritt die Zugabe der Apyrase zu den zuvor „LPS-geprimten“ Zellen. Es erfolgte der Einsatz von 5 und 10 Joule Bestrahlung sowie keine Bestrahlung. Als MOP-Konzentrationen wurden 400, 800 und 1600ng/ml eingesetzt. Zusätzlich wurden zwei Ansätze mitgeführt, zu denen keine MOP-Zugabe erfolgte. Um auszuschließen, dass es zu einer Interaktion von MOP und Apyrase kommt, wurde zusätzlich ein Ansatz ohne MOP-Zugabe durchgeführt. Das „Priming“ erfolgte mit 250pg/ml LPS.

Da anhand der Kontrollen eine Abnahme der Freisetzung beim Einsatz der Apyrase beobachtet werden konnte, lag die Vermutung nahe, dass auch beim Einsatz der experimentellen Photoperese mit zusätzlicher Apyrase-Zugabe eine Abnahme der Freisetzung stattfinden könnte. Anhand der erhaltenen Daten (Abb. 19b) ist jedoch das Gegenteil der Fall. Bei allen Ansätzen mit MOP-Zugabe ist zu erkennen, dass durch die Zugabe der Apyrase eine starke Steigerung der Freisetzung erfolgt. Betrachtet man den Ansatz LPS mit 800ng/ml MOP, so erfolgt bei 5 Joule eine Freisetzung von 60pg/ml, welche durch die Zugabe der Apyrase auf 958pg/ml ansteigt. Diese Steigerungsrate ist sowohl beim Einsatz von 800ng/ml als auch bei den Ansätzen mit 400 und 1600ng/ml zu erkennen. Die zusätzliche Zugabe von Apyrase zeigte keinen Einfluss auf die bis dato erhaltene Tendenz, bei der durch die Bestrahlung mit 5 Joule eine Steigung der Sekretion auftritt, und bei Erhöhung auf 10 Joule wieder abfällt.

Zusätzlich erfolgten Ansätze ohne MOP und ohne Apyrase, sowie Ansätze ohne MOP mit Apyrase. Diese Ansätze dienten dem Zweck, um eine Wirkung auszuschließen die durch die Interaktion von MOP und Apyrase zustande kommen könnte. Anhand der Daten kann eine Interaktion ausgeschlossen werden. Denn es ist zu erkennen, dass die alleinige Zugabe von Apyrase ohne MOP ebenfalls eine Steigerung der Freisetzung aufweist. Des Weiteren ist zu erkennen, dass in den Ansätzen ohne Bestrahlung jedoch mit Apyrase ebenfalls eine höhere Freisetzung stattfindet, als in denselben Ansätzen ohne Bestrahlung.

5.2.4.3 IL-1 β Freisetzung in Abwesenheit von LPS

Falls davon ausgegangen wird, dass die IL-1 β Freisetzung ein Inflammasom-abhängiger Prozess ist, muss zur Freisetzung von IL-1 β eine Zelle zunächst dazu angeregt werden die Transkription des pro-IL-1 β -Gens, sowie die Expression der NLRP-Proteine einzuleiten. Dazu muss die Zelle z.B. zunächst mit LPS „geprimt“ werden. Im nächsten Schritt erfolgen durch ein weiteres Signal der Zusammenbau der NLRP-Proteine sowie die Aktivierung der Caspase-1. Die Caspase-1 ist wiederum in der Lage, die in der Zelle akkumulierte inaktive pro-IL-1 β Form in die biologisch aktive IL-1 β Form zu prozessieren.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Untersuchung der IL-1 β Freisetzung zunächst in Gegenwart von LPS (5.2.4.2). Im nächsten Schritt erfolgte, wie in Abb.

20 dargestellt, die Untersuchung der Freisetzung in Abwesenheit von LPS. Das „Priming“ der Zellen erfolgte durch die experimentelle Photophoresis durch die Zugabe von 400-, 800- und 1600ng/ml MOP, sowie die Bestrahlung mit 5 und 10 Joule/cm² UVA. Als Aktivierungssignale wurden am nächsten Tag entweder 5mM ATP oder 10µM Nigericin zugegeben.

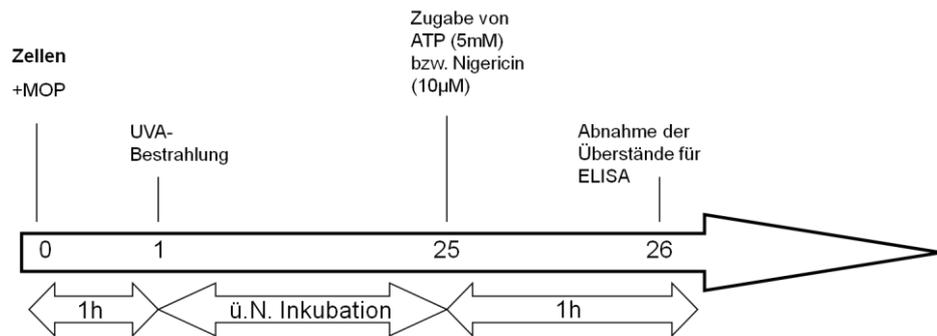


Abb. 20. **Schematische Darstellung der zeitlichen Abfolge des Versuchsaufbaus in Abwesenheit von LPS.** Nach Zugabe von MOP für eine Stunde erfolgte die UVA-Bestrahlung und die Inkubation der Zellen über Nacht. Am nächsten Tag wurde zu den Ansätzen entweder ATP (5mM) oder Nigericin (10µM) für eine Stunde zugegeben, und die Überstände für die anschließende ELISA-Messung entnommen.

Als Kontrollen erfolgten der Einsatz der Zellen ohne die Zugabe von MOP, ATP und Nigericin, sowie ohne die Zugabe von MOP jedoch mit ATP bzw. Nigericin.

Der Einsatz der experimentellen Photophoresis in Abwesenheit von LPS dafür aber in Gegenwart verschiedener MOP-Konzentrationen führte zu einer IL-1β Freisetzung (Abb. 21). Es erfolgte der Einsatz verschiedener MOP-Konzentrationen, um überprüfen zu können, ob sich durch die höheren Konzentrationen die modulierende Wirkung der experimentellen Photophoresis evtl. verändert.

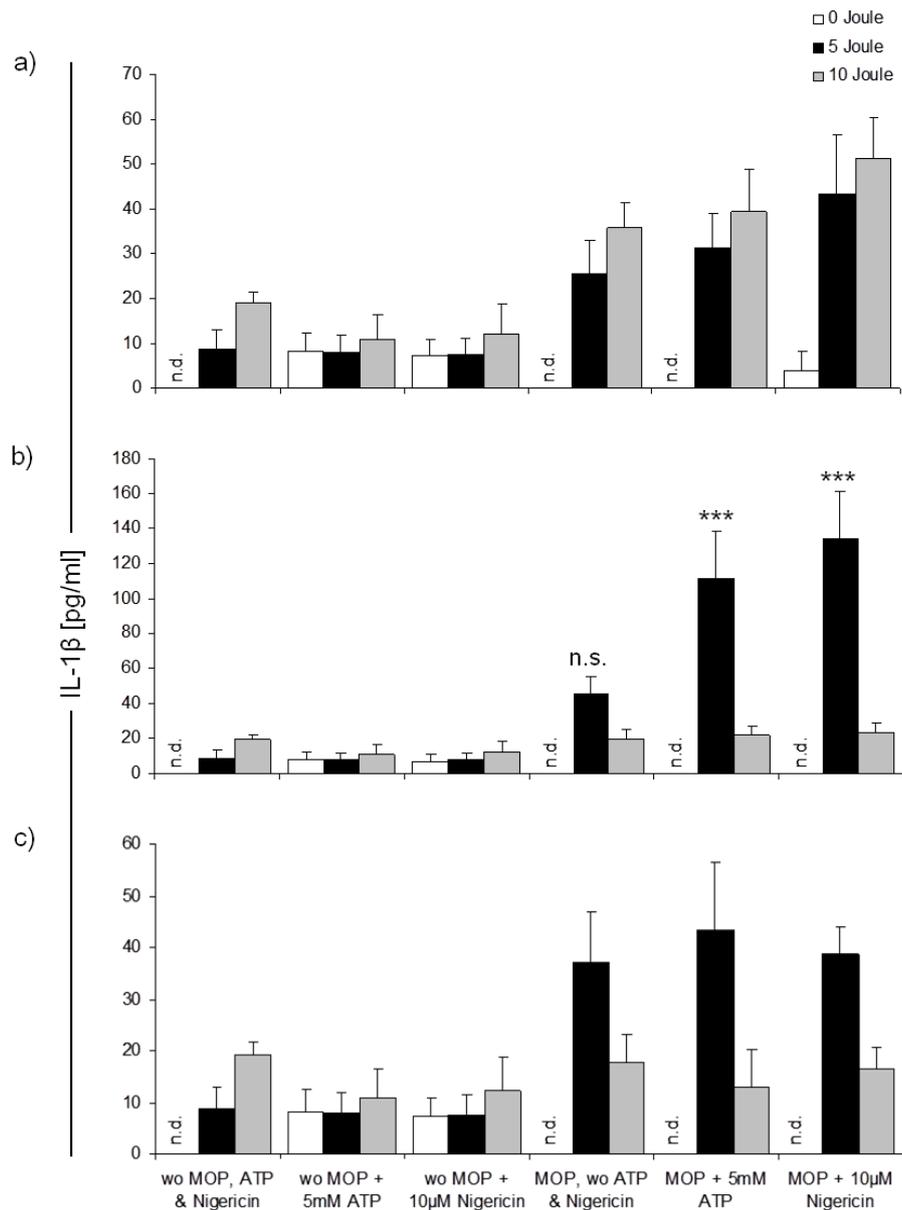


Abb. 21. **LPS-unabhängige IL-1 β Freisetzung hervorgerufen durch UVA-Licht und a) 400-, b) 800- und c) 1600ng/ml MOP.** Dargestellt sind die Ergebnisse von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten (Mittelwert \pm SEM) (n.d.= unter der Nachweisgrenze von 7,8pg/ml). Der Versuchsaufbau erfolgte wie in Abb. 20 beschrieben. b) Statistik: *** p <0.001 versus Kontrolle wo MOP + 5mM ATP 0 Joule.

Die freigesetzte Menge unterscheidet sich durch die Zugabe der verschiedenen MOP-Konzentrationen. Die höchste Freisetzung erfolgt beim Einsatz von 800ng/ml MOP. In allen drei Gruppen ist ersichtlich, dass eine erhöhte Freisetzung erst beim Einsatz von MOP in Kombination mit UVA-Licht mit zusätzlicher Zugabe von ATP bzw. Nigericin auftritt. Desweiteren ist zu erkennen, dass die freigesetzte Menge mit Erhöhung der Bestrahlungsdosis zunimmt. Diese fällt beim Einsatz der höheren MOP-Konzentrationen (Abb. 21 b, c) durch Einsatz der höchsten

Bestrahlungsdosis (10 Joule/cm²) jedoch wieder ab. Die freigesetzten IL-1 β Mengen die in den Ansätzen ohne MOP mit ATP bzw. Nigericin auftreten befinden sich an der Nachweisgrenze von 7,8pg/ml, so dass sie vernachlässigbar sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die modulierende Wirkung der experimentellen Photoperese auf die IL-1 β Freisetzung anhand dieses Versuchsaufbaus beim Einsatz von 800 bzw. 1600ng/ml MOP deutlich dargestellt werden konnte. Die deutlichste Darstellung, bedingt durch die Unterschiede zwischen Ansätzen mit und ohne Bestrahlung, zeigte sich dabei beim Einsatz von 800ng/ml MOP. Größere Unterschiede beim Einsatz von Nigericin bzw. ATP waren nicht zu erkennen. Somit ist festzuhalten, dass die experimentelle Photoperese in diesem Versuchsaufbau in der Lage ist, den „*Priming-Step*“ der zur Transkription von pro-IL1 β und NALP-Proteinen führt, modulieren kann.

5.2.5 Untersuchung von gendefizienten Mäusen

Um die Menge an DZ ermitteln zu können, und sicher zu stellen, dass bei allen eingesetzten Mauslinien die prozentual gleiche Menge an DZ pro Ansatz eingesetzt wurden, erfolgte von jeder Knockout-Maus eine durchflusszytometrische Kontrolle der DZ-Differenzierung. Dargestellt ist eine repräsentative Kultur (Abb. 22).

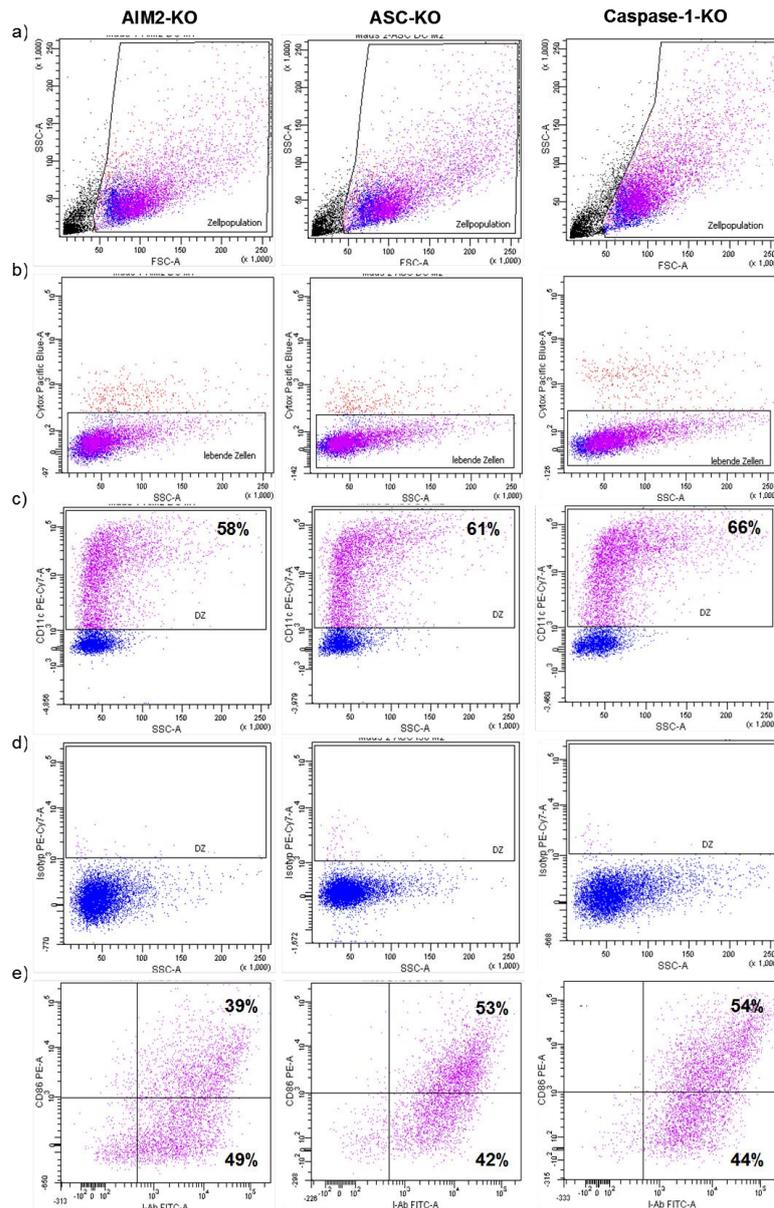


Abb. 22. **Durchflusszytometrische Analyse der Knochenmarks-Kulturen zur Differenzierung von DZ aus den einzelnen Knockout-Maus Linien.** Zum Einsatz kamen die AIM2-, ASC- und Caspase-1 Knockout Maus. (a) Darstellung der relevanten Zellpopulation anhand von forward- und sideward scatter für alle drei Linien. (b) „Gatestrategie“ zur Darstellung der lebenden Zellen aus der Zellpopulation in (a) durch Einsatz von Cytox-Blue gegen sideward scatter. (c) Ausbeute an DZ dargestellt anhand des spezifischen DZ-Oberflächenmarkers CD11c gegen sideward scatter mit dazugehöriger Isotyp-Kontrollen zum Ausschluss unspezifischer Bindungen (d). (e) Dot-Plot Darstellung reifer DZ anhand der Reifungsmarker CD86 und I-A^b. Dargestellt ist eine repräsentative Kultur.

Um zu überprüfen, ob die durch die experimentelle Photopherese hervorgerufene IL-1 β Freisetzung ein AIM2-Inflammasom-abhängiger Prozess ist, erfolgte die Analyse von gendefizienten Mäusen. Zum Einsatz kam dabei die AIM2-KO Maus. Zusätzlich erfolgte der Einsatz der ASC- sowie Caspase-1-KO Maus. Damit sollte geprüft werden, ob die durch die experimentelle Photopherese hervorgerufene IL-

IL-1 β Freisetzung ein ASC- und Caspase-1-abhängiger Prozess ist. Das ASC-Molekül fungiert als ein Brückenmolekül zwischen den Inflammasom-Proteinen und der Caspase. Seine Funktion wurde bis jetzt in der NALP3- und dem AIM2-Inflammasom nachgewiesen. Im NLRC4-Inflammasom ist dessen Funktion als Brückenmolekül noch nicht eindeutig aufgeklärt.

Die durchflusszytometrische Analyse ergab bei der AIM2-KO Maus eine DZ-Reinheit von 58%, bei der ASC-KO Maus eine Reinheit von 61% und bei der Caspase-1-KO Maus eine Reinheit von 66% (Abb. 22c). Um auch die Menge an ausgereiften DZ bestimmen zu können, wurden die DZ mit den Reifungsmarkern CD86 und I-A^b gefärbt, und mit Hilfe eines Dot-Plots dargestellt (Abb. 22e). Die erzielten Daten zu der DZ-Ausbeute sowie –Reifung sind mit den erzielten Daten der Wildtyp-Maus (DZ-Ausbeute von 67% und –Reifung von 93%) vergleichbar. Somit wurde sichergestellt, dass für alle eingesetzten Mauslinien vergleichbare Bedingungen vorlagen.

Zu jeder Mauslinie wurde eine Positiv-Kontrolle durchgeführt (Abb. 23). Die Zellen wurden für vier Stunden „LPS-geprimt“, anschließend erfolgte die Zugabe von 10 μ M Nigericin für eine weitere Stunde.

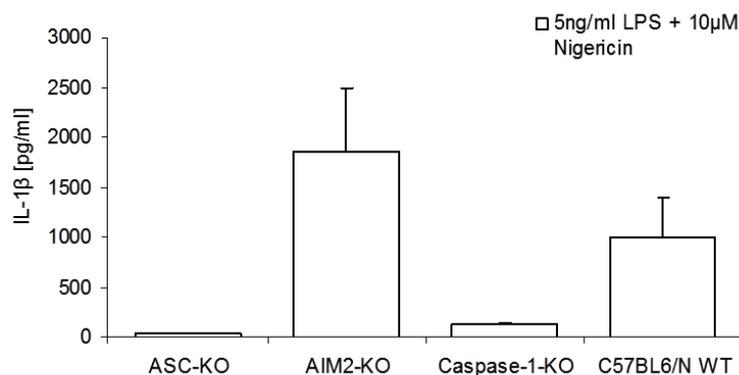


Abb. 23. **Positiv-Kontrolle von C57BL6/N sowie AIM2-KO Maus zeigen im Gegensatz zu ASC- und Caspase-1-KO Maus hohe mature-IL-1 β Freisetzung.** „LPS-Priming“ erfolgte mit 5ng/ml für 4 Stunden mit anschließender Zugabe von Nigericin (10 μ M). Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei (AIM2- und ASC-KO), von drei (C57BL6/N) sowie vier (Caspase-1-KO) voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten (Mittelwert \pm SED) (n.d. = unter der Nachweisgrenze von 7,8pg/ml).

Die durchgeführten Positiv-Kontrollen ergaben bei der WT- (1004pg/ml) sowie AIM2-KO Maus (1858pg/ml) sehr hohe IL-1 β Freisetzungen. Bei der ASC-KO

Maus lag die freigesetzte Menge mit 27pg/ml nah an der ELISA-Nachweisgrenze von 7,8pg/ml. Die Caspase-1-KO Maus ergab eine Freisetzung von 127pg/ml.

Um zu überprüfen, ob die in den Positiven-Kontrollen freigesetzten IL-1 β Mengen die mature- bzw. pro-IL-1 β Form darstellt, wurde auch die pro-IL1 β Menge in den Proben mit einem speziellen ELISA gemessen (Abb. 24).

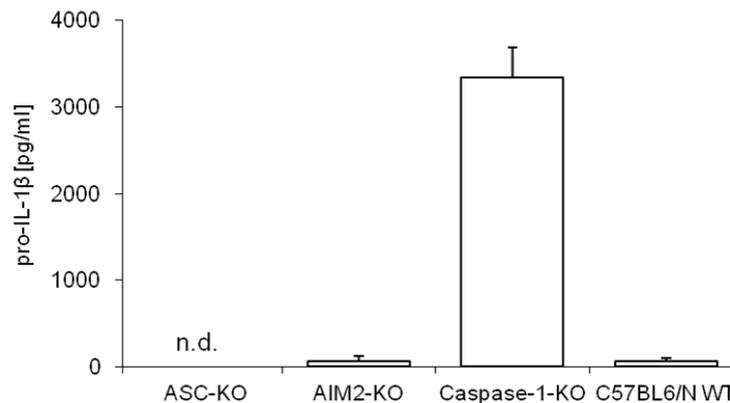


Abb. 24. **Positiv-Kontrolle der Caspase-1-KO Maus zeigt im Gegensatz zu ASC-, AIM2-KO Maus und C57BL6/N Maus eine hohe pro-IL-1 β Freisetzung.** „LPS-Priming“ erfolgte mit 5ng/ml für 4 Stunden mit anschließender Zugabe von Nigericin (10 μ M). Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei (AIM2- und ASC-KO), von drei (C57BL6/N) sowie vier (Caspase-1-KO) voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten (Mittelwert \pm SED) (n.d. = unter der Nachweisgrenze von 7,8pg/ml).

Die Bestimmung der pro-Form zeigte im Vergleich zu der maturen-Form große Unterschiede. Ein Nachweis von pro-IL-1 β fand lediglich in der Caspase-1-KO Maus statt. Bei der AIM2-KO- sowie C57BL6/N Maus lag die freigesetzte Menge an der Nachweisgrenze, und kann somit vernachlässigt werden.

Als einen weiteren Nachweis, dass die mit dem maturem-IL-1 β ELISA gemessenen Werte tatsächlich auch die mature-Form darstellen, erfolgte zusätzlich die Bestimmung der Kreuzreaktivität zwischen dem maturem- und pro-IL-1 β ELISA. Es erfolgte der Auftrag der pro-IL-1 β Standardkurve auf dem ELISA, welches die mature-IL1 β Form detektiert (Abb. 25).

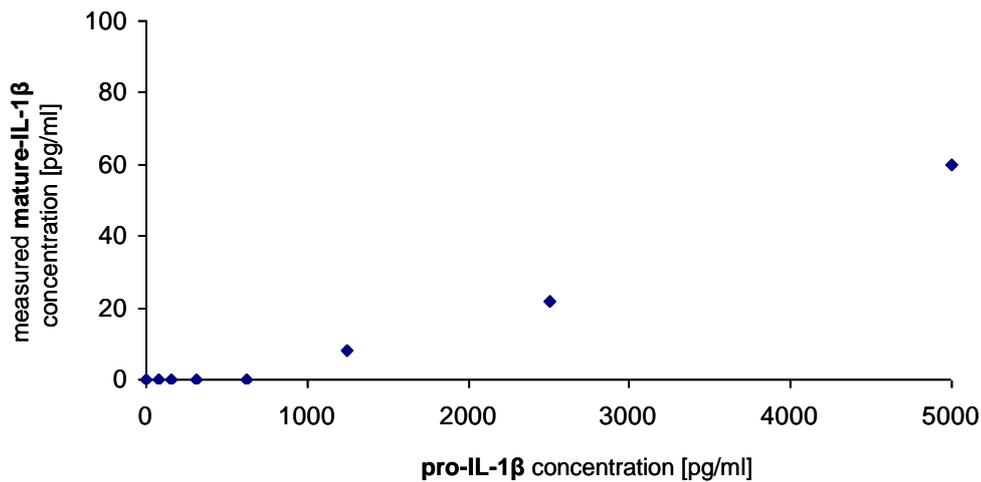


Abb. 25. **Hohe Spezifität des murinen IL-1β ELISA für die mature Form.** Bestimmung der Kreuzreaktivität zwischen matura- und pro-IL-1β Form durch Auftrag der pro-IL-1β Standardkurve auf mature-IL-1β ELISA.

Die detektierte pro-IL1β Form lag zwischen 8 und 60pg/ml, und zeigte somit eine vernachlässigbare Kreuzreaktivität von 0,6 bis 1,2%. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das mit dem maturem-IL-1β ELISA (Abb. 23) detektierte IL-1β tatsächlich auch die mature-Form darstellt.

Die aus dem Knochenmark der einzelnen Mauslinien gewonnenen DZ wurden in dem Versuchsaufbau, wie sie in Abb. 9 dargestellt ist, eingesetzt. Zum „Primer“ der Zellen wurden zwei verschiedene LPS-Konzentrationen verwendet- 250pg und 5ng/ml LPS. Als MOP-Konzentration erfolgte der Einsatz von 800ng/ml in Gegenwart von keiner, 5 Joule sowie 10 Joule/cm² UVA-Bestrahlung.

Die erzielten Daten zeigen in allen drei KO-Mäusen sowie der C57BL6/N WT Maus eine UVA-Licht und MOP-abhängige IL-1β Freisetzung nach „LPS-Priming“.

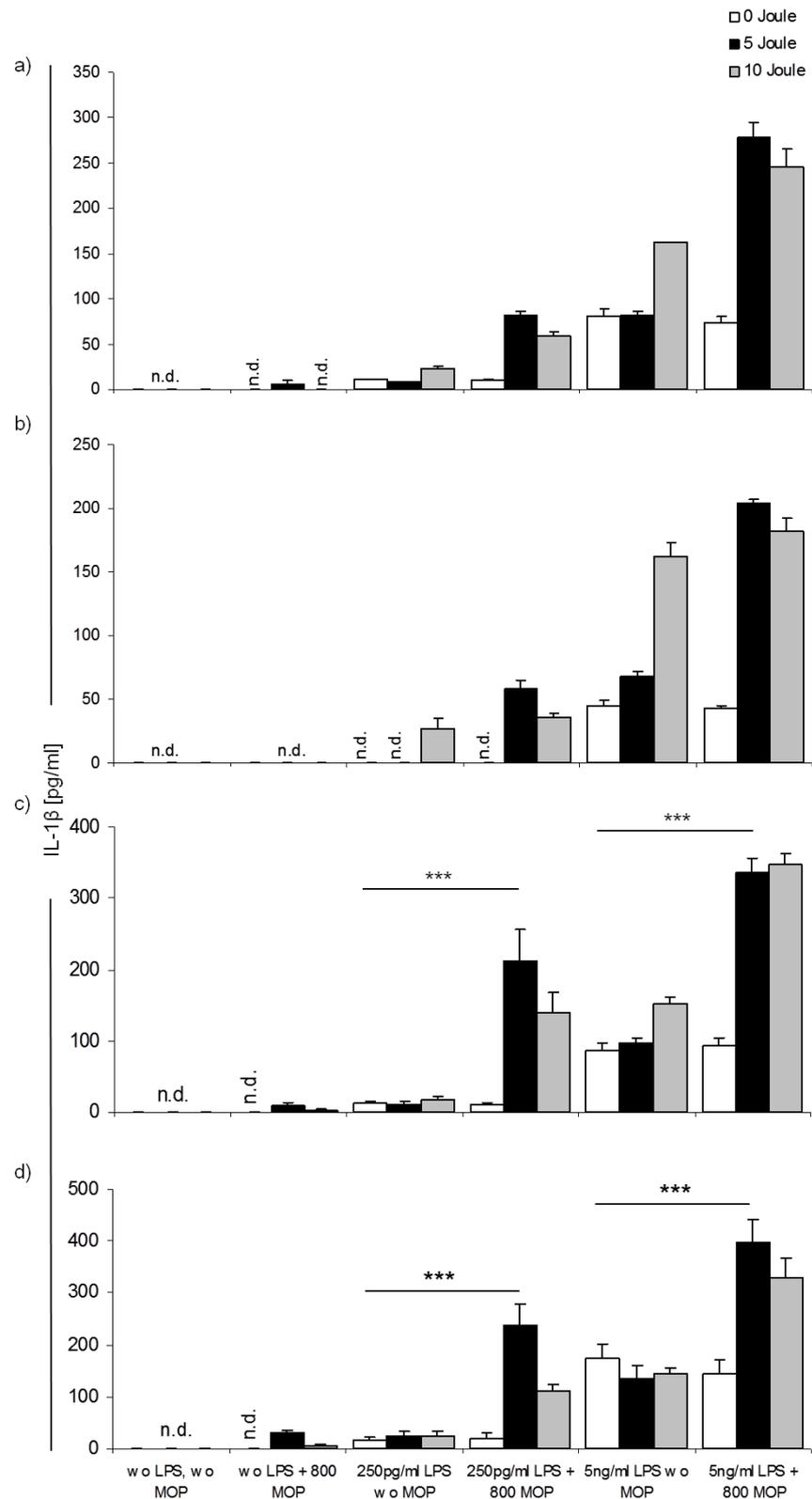


Abb. 26. **UVA-Licht und MOP fördern die mature-IL-1 β Freisetzung nach „LPS-Priming“ mit 250pg bzw. 5ng/ml in (a) AIM2-, (b) ASC-, (c) Caspase-1-KO und (d) WT-Maus.** Als MOP-Konzentration wurden 0 und 800ng/ml eingesetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei (a und b), von vier (c) und drei (d) voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten (Mittelwert \pm SED) (n.d. = unter der Nachweisgrenze von 7,8pg/ml). Der Versuchsaufbau erfolgte wie in Abb. 9 beschrieben. Statistik: ***p<0.001

Die Freisetzung der mature-IL-1 β Form in den KO-Mäusen (Abb. 26a-c) erfolgt nach dem gleichen Muster wie sie auch in der C57BL6/N Wildtyp-Maus (Abb. 26d) beobachtet werden kann. Erst durch den Einsatz von MOP erfolgt eine deutliche Freisetzung. Es erfolgt eine Steigerung der Freisetzung beim Einsatz von UVA-Licht (5 Joule), welche bei Erhöhung auf 10 Joule wieder abnimmt. Deutlich zu sehen ist der Effekt beim Einsatz der höheren LPS-Dosis von 5ng/ml, bei welcher eine höhere Freisetzung zu beobachten ist als bei der geringeren LPS-Konzentration. Beim Vergleich der freigesetzten IL-1 β Menge im Ansatz „5ng/ml LPS + 800 MOP“ beim Einsatz von 5 Joule UVA-Licht, ist zu erkennen, dass die in der AIM2-KO Maus (Abb. 26a) freigesetzte Menge von 278pg/ml höher ist als bei der ASC-KO Maus (Abb. 26b) mit 204pg/ml. Die Caspase-1-KO und die C57BL6/N Wildtyp Maus zeigen in allen Ansätzen die höchste Freisetzung. Diese Ergebnisse zeigen, dass die IL-1 β Freisetzung in den gendefizienten Mäusen Caspase-1 unabhängig erfolgen kann.

Bei den durchgeführten Negativ-Kontrollen (wo LPS, 0 MOP & wo LPS + 800ng/ml MOP) ist in allen Mauslinien sehr wenig bis keine IL-1 β Freisetzung detektierbar gewesen.

Die Überstände die zur Bestimmung der mature-IL-1 β Form eingesetzt wurden, wurden zusätzlich auch auf ihren pro-IL-1 β Gehalt getestet. Die Messungen ergaben bei allen eingesetzten Mauslinien keinen Nachweis der pro-IL-1 β Form. Die Nachweisgrenze lag dabei zwischen 78pg bis 10.000pg/ml. Somit ist davon auszugehen, dass die Mengen die in der Abb. 26 dargestellt sind, tatsächlich auch die mature-Form darstellen.

5.2.5.1 Western-Blot Analysen mit ASC- und Caspase-1 Knockout-Mäusen

Zusätzlich zu den ELISA-Messungen erfolgten, wie bereits bei den Wildtyp-Mäusen durchgeführt (Abb. 17), mit Caspase-1- und ASC-KO Maus Western-Blot Analysen. Damit sollte in den Caspase-1 und ASC-KO Maus überprüft werden, ob bei diesen eine Caspase-1- und pro-IL-1 β Prozessierung stattfindet.

5.3 Modulation der IL-1 β und IL-18 Freisetzung in humanen Zellen durch experimentelle Photopherese

5.3.1 Humane mononukleäre Leukozyten (PBMCs) in Anwesenheit von LPS

Parallel zu den in-vitro Experimenten im murinem System erfolgten zusätzlich Experimente mit humanen PBMCs. Ziel war es zu überprüfen, ob die im murinem System erzielten Ergebnisse auch im humanen System nachweisbar sind. Dafür erfolgte der Versuchsaufbau wie sie in der Abb. 29 dargestellt ist.

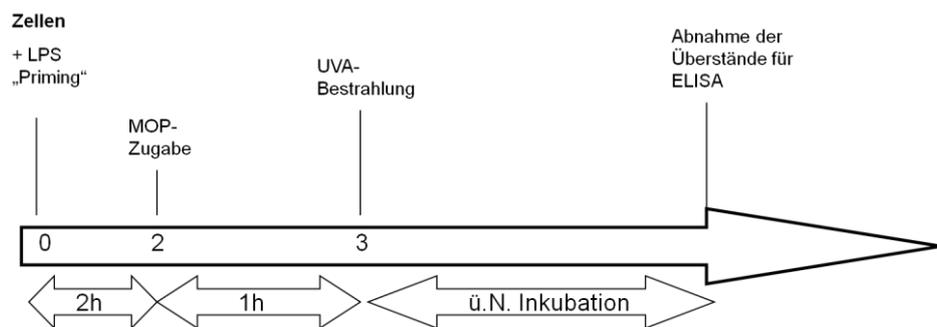


Abb. 29. **Schematische Darstellung der zeitlichen Abfolge des Versuchsaufbaus in Anwesenheit von LPS.** Nach dem „LPS-Priming“ der Zellen für zwei Stunden erfolgte die Zugabe von MOP für eine weitere Stunde mit anschließender UVA-Bestrahlung. Im Anschluss an die Bestrahlung erfolgte die Inkubation der Zellen über Nacht und Entnahme der Überstände für die anschließende ELISA-Messung.

Im Gegensatz zum Versuchsaufbau im murinem System (Abb. 9) erfolgte das „LPS-Priming“ (10ng/ml) im humanen System nicht vier, sondern zwei Stunden mit anschließender Behandlung der Zellen mit MOP sowie UVA-Licht. Es wurde eine MOP-Titration von 0 bis 1600ng/ml MOP in Kombination mit 2 und 6 Joule UVA-Bestrahlung sowie ohne Bestrahlung vorgenommen. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne bzw. mit 400ng/ml MOP und ohne LPS-Zugabe.

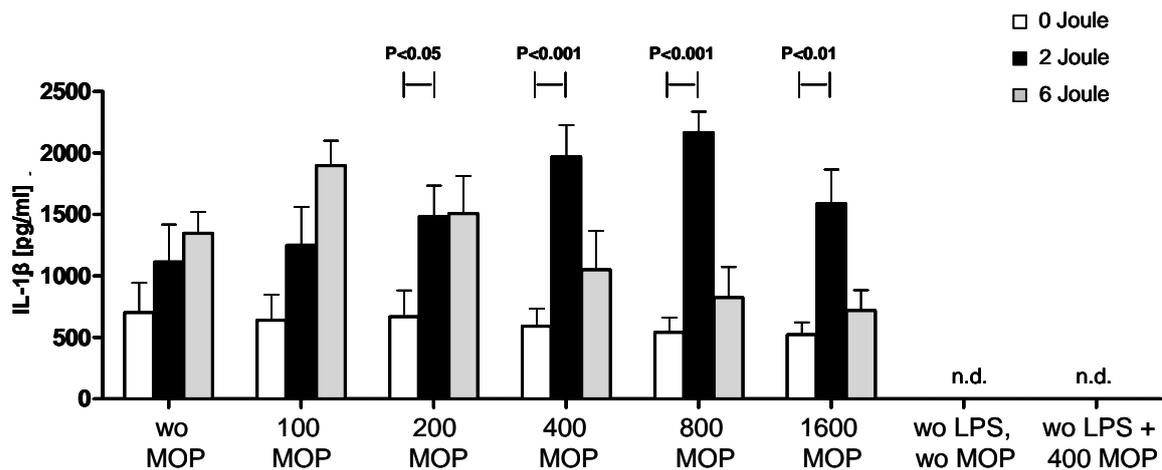


Abb. 30. **Humane mononukleäre Leukozyten setzen in Anwesenheit von MOP und UVA-Strahlung erhöhte Mengen an mature-IL-1 β frei.** „LPS-Priming“ erfolgte mit 10ng/ml, und die eingesetzte MOP-Konzentration lag zwischen 0 und 1600ng/ml. Dargestellt sind die Ergebnisse von vier voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten (Mittelwert \pm SEM) (n.d. = unter der Nachweisgrenze von 12,5pg/ml). Der Versuchsaufbau erfolgte wie in Abb. 29 beschrieben.

Anhand der erhaltenen Ergebnisse sind sowohl ein MOP- als auch ein UVA-Effekt zu erkennen. Der MOP-Effekt zeigt sich darin, dass die Freisetzung mit steigender MOP-Konzentration bis auf 800ng/ml zunimmt, und beim Einsatz höherer MOP-Konzentration ein Abfall zu erkennen ist. Beim Einsatz von keinem bzw. 100 und 200ng/ml MOP ist eine Steigerung der Freisetzung mit steigender UVA-Strahlung zu erkennen. Die höchste Freisetzung findet dabei beim Einsatz von 6 Joule statt. Bei Erhöhung der MOP-Konzentration auf 400ng/ml ist die höchste Freisetzung beim Einsatz von 2 Joule zu erkennen. Diese nimmt beim Einsatz von 6 Joule deutlich ab.

Die Ergebnisse verdeutlichen eine durch die experimentelle Photopherese hervorgerufene Freisetzung von IL-1 β . Interessant dabei ist jedoch, dass die alleinige Zugabe von LPS bereits eine Freisetzung herbeiführen kann. Zu sehen ist dieser Effekt anhand dem Ansatz „wo MOP + LPS-Priming + 0 Joule“ (650pg/ml). Die Fragen die sich daraus stellten waren, ob der Einsatz der experimentellen Photopherese das „LPS-Priming“ lediglich verstärkt, oder aber, als ein weiteres Signal für die IL-1 β Freisetzung fungiert. Um die durch das „LPS-Priming“ hervorgerufene Freisetzung so gering wie möglich zu halten, erfolgte eine LPS-Titration. Dabei zeigte sich, dass der Einsatz von 100pg/ml LPS eine ausreichende Konzentration ist, bei der eine LPS-bedingte Freisetzung noch stattfinden kann, die jedoch so gering ausfällt, dass der Effekt der experimentellen

Photopherese dadurch in seiner Aussagekraft nicht beeinträchtigt wird. Die Daten wurden hier nicht gezeigt.

Zusätzlich zur Bestimmung der mature-IL-1 β Form erfolgte auch die Bestimmung der pro-IL-1 β Form.

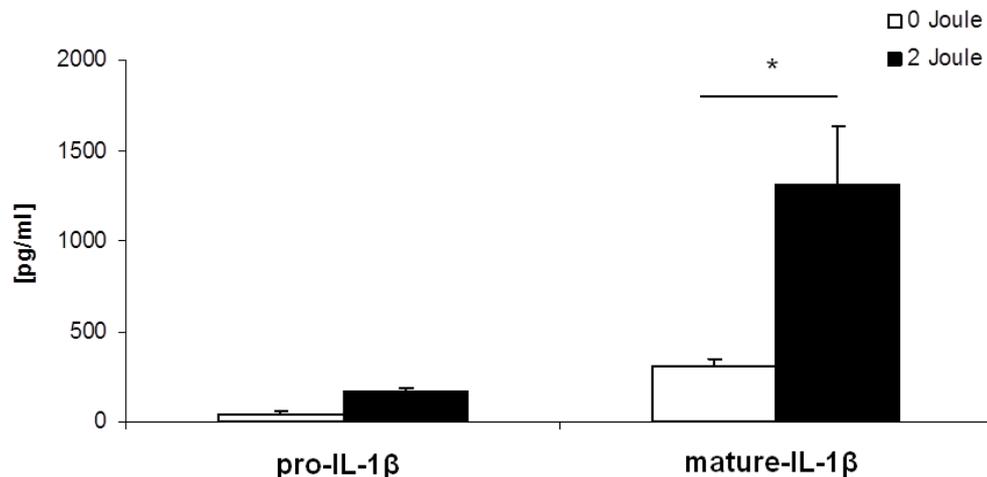


Abb. 31. **Höhere Freisetzung der mature-IL-1 β Form im Vergleich zur pro-Form in humanen mononukleären Leukozyten in Anwesenheit von MOP und UVA.** "LPS-Priming" erfolgte mit 10ng/ml, und die eingesetzte MOP-Konzentration betrug 800ng/ml. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten (Mittelwert \pm SEM). Der Versuchsaufbau erfolgte wie in Abb. 29 beschrieben. Statistik: * $p < 0.05$.

Die Überstände die zur Bestimmung der mature-IL-1 β Form eingesetzt wurden, wurden zusätzlich auch auf ihren pro-IL-1 β Gehalt getestet. So konnte gezeigt werden, dass der ECP-Einsatz auch die pro-IL1 β Form erhöht.

Wie zuvor bereits mit den murinen Proben die Kreuzreaktivität bestimmt wurde (Abb. 25), erfolgte auch mit den humanen ELISA-Kits die Überprüfung der Kreuzreaktivität zwischen der pro- und mature-Form. Daher erfolgte auch in diesem Falle der Auftrag der pro-IL-1 β Standardkurve auf dem ELISA, welches die mature-IL1 β Form detektiert (Abb. 32).

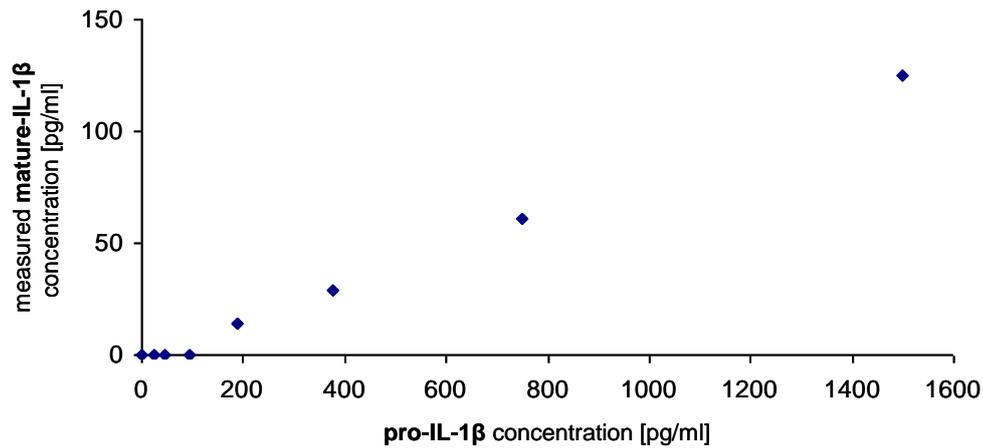


Abb. 32. **Hohe Spezifität des humanen IL-1 β ELISA für die mature Form.** Bestimmung der Kreuzreaktivität zwischen maturer- und pro-IL-1 β Form durch Auftrag der pro-IL-1 β Standardkurve auf mature-IL-1 β ELISA.

Die detektierte pro-IL1 β Form lag zwischen 14 und 125pg/ml, und zeigte somit eine Kreuzreaktivität von 7,5 bis 8,3%. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das mit dem maturem-IL-1 β ELISA (Abb. 30) detektierte IL-1 β tatsächlich auch die mature-Form darstellt.

5.3.2 Western Blot Analysen zur IL-1 β Freisetzung

Um überprüfen zu können, ob die in Abb. 30 und Abb. 31 dargestellte IL-1 β Freisetzung die mature-IL-1 β Form darstellt, und die experimentelle Photopherese die Caspase-1 aktivieren kann, erfolgte wie zuvor im murinem System dargestellt (Abb. 17), auch mit humanen Proben eine Western-Blot Analyse. Damit sollten zudem die Ergebnisse der Zytokinmessungen auf Proteinebene bestätigt werden.

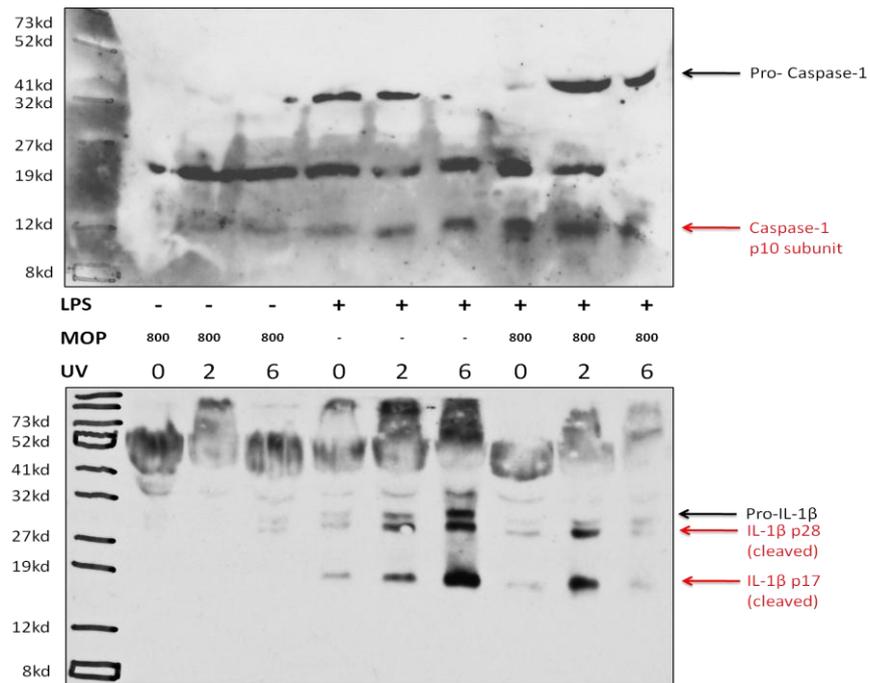


Abb. 33. **Western-Blot: UVA-Licht und MOP geförderte Aktivierung der Caspase-1 mit einhergehender Freisetzung der aktiven IL-1 β Form.** Zum „Priming“ erfolgte der Einsatz von 10ng/ml LPS. Als MOP-Konzentration erfolgte der Einsatz von 800ng/ml. Der Versuchsaufbau erfolgte wie in Abb. 29 beschrieben. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei voneinander durchgeführten Western-Blots. (10% BIS/TRIS-Gel)

Anhand der Bandenintensität zeigt sich die höchste Caspase-1 Aktivierung in den Ansätzen die zuvor mit LPS „geprimt“, und anschließend mit experimenteller Photophoresis behandelt wurden. In diesen Ansätzen nimmt die Aktivierung durch Erhöhung der UV-Bestrahlung auf 2 Joule/cm² zu, um durch eine weitere Erhöhung auf 6 Joule wieder abzunehmen. Dieser Effekt ist auch im IL-1 β Blot deutlich zu erkennen. In diesem Blot zeigt sich zudem, dass die alleinige LPS- und UV-Behandlung bereits in der Lage ist aktives IL-1 β aufzuzeigen. Die Beobachtungen die im Caspase-1 und IL-1 β Western-Blot gemacht wurden, stimmen mit den Daten überein, die zuvor anhand der Zytokinmessungen im ELISA gezeigt werden konnten.

5.3.3 Einfluss des Caspase-1- (z-YVAD-FMK) Inhibitors auf die IL-18 Freisetzung

Die bis jetzt erzielten Daten zeigen, eine MOP- und UVA-Licht-abhängige IL-1 β Freisetzung. Es ist bekannt, dass die Freisetzung zu einem Großteil unter Beteiligung des Inflammasom erfolgt. Dieser ist in der Lage die Caspase-1 zu aktivieren, welche ihrerseits die pro-Formen von IL-1 β und IL-18 prozessieren und somit aktivieren kann. Da anhand der Western-Blot Analysen (Abb. 33) die Notwendigkeit der Caspase-1-Aktivierung für die IL-1 β -Prozessierung bereits gezeigt werden konnte, erfolgte im nächsten Schritt, durch Einsatz chemischer Inhibitoren (hier Caspase-1 Inhibitor z-YVAD-FMK), die Untersuchung der Caspase-1 Notwendigkeit auch für die pro-IL-18-Prozessierung. Der Einsatz des Inhibitors erfolgte wie sie in der Abb. 34 dargestellt ist.

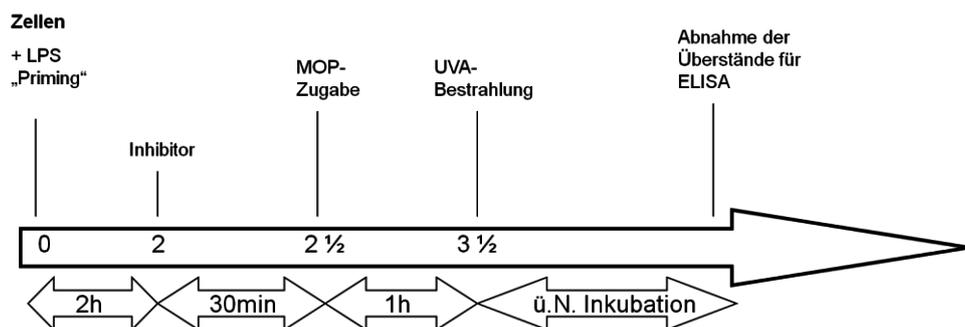


Abb. 34. **Schematische Darstellung der zeitlichen Abfolge des Versuchsaufbaus beim Einsatz des Caspase-1 Inhibitors z-YVAD-FMK.** Nach dem „LPS-Priming“ der Zellen für zwei Stunden erfolgte die Zugabe des Inhibitors für ein halbe Stunde. Anschließend erfolgte die Zugabe von MOP für eine weitere Stunde mit anschließender UVA-Bestrahlung. Im Anschluss an die Bestrahlung erfolgte die Inkubation der Zellen über Nacht und Entnahme der Überstände für die anschließende ELISA-Messung.

Um einen Einfluss der Inhibitor-Trägersubstanz (DMSO) auszuschließen, erfolgte die Zugabe der Trägersubstanz zu den Ansätzen denen kein Inhibitor zugegeben wurde.

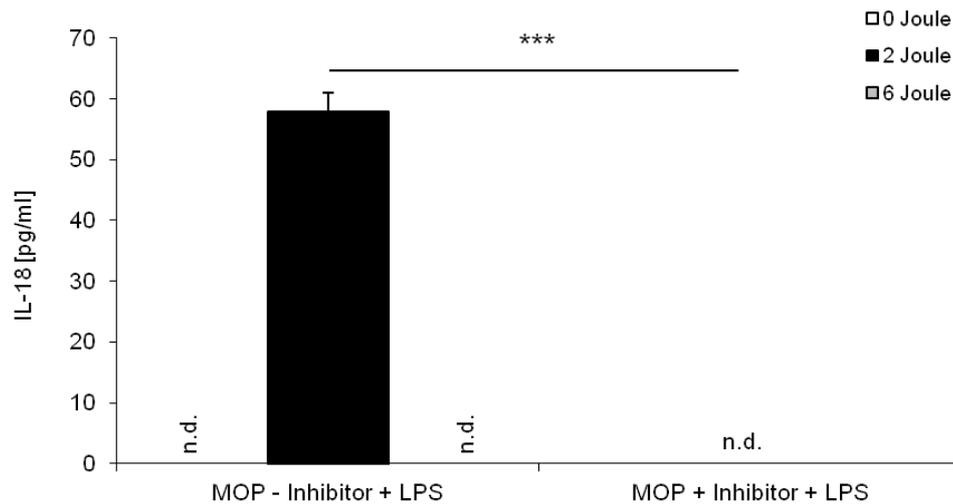


Abb. 35. **Inhibition der IL-18 Freisetzung in humanen mononukleären Leukozyten durch Einsatz des Caspase-1 Inhibitors z-YVAD-FMK.** "LPS-Priming" erfolgte mit 10ng/ml, und die eingesetzte MOP-Konzentration betrug 400ng/ml. Die Zugabe des Caspase-Inhibitors erfolgte mit einer Konzentration von 20µM. Zusätzlich erfolgte der Einsatz des Caspase-Vehikels (10µM DMSO). Dargestellt sind die Ergebnisse von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten (Mittelwert±SEM). Der Versuchsaufbau erfolgte wie in Abb. 34 beschrieben. Statistik: *** $p < 0.001$ versus MOP + Inhibitor 2 Joule.

Der Einsatz des Caspase-1 Inhibitors zeigt eine vollständige Hemmung der IL-18 Freisetzung. Eine messbare Freisetzung ist lediglich im Ansatz ohne Inhibitor beim Einsatz von 2 Joule zu erkennen. Die freigesetzte Menge an IL-18 fällt im Gegensatz zu IL-1β (Abb. 30) beim Einsatz von 400ng/ml MOP viel geringer aus. Der Einsatz des Inhibitors zeigt somit, dass die IL-18 Freisetzung ein Caspase-1-abhängiger Prozess ist, welches die inaktive pro-Formen in die biologisch Aktiven Formen prozessiert.

5.4 Untersuchung Klinischer Proben

Die erzielten Ergebnisse warfen die Frage auf, ob die Modulation der IL-1β Freisetzung auch in klinischen Proben von Patienten nach Photopherese nachweisbar ist. Es wurden Patientenproben (peripheres Blut und Apheresat) vor und nach Photopherese untersucht. Das „Triggern“ der IL-1β Freisetzung erfolgte durch LPS ex vivo. Die Probenentnahme erfolgte jeweils vor und nach ECP.

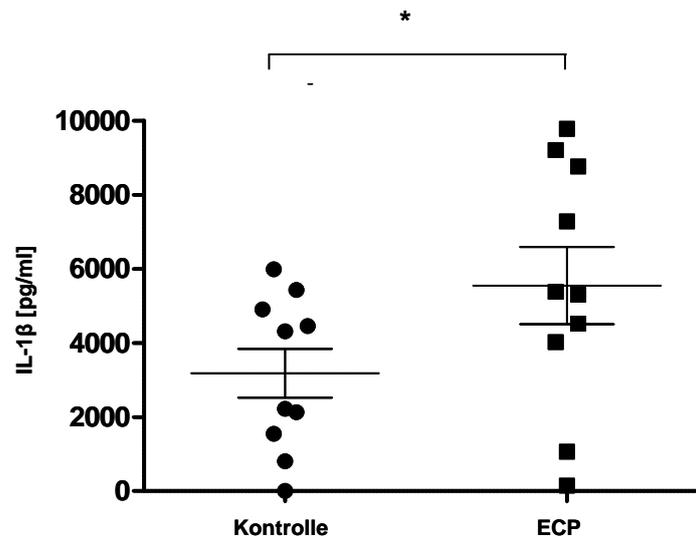


Abb. 36. **Die ECP fördert die mature-IL-1 β Freisetzung in Leukapheresat-Proben von Patienten.** Das Apheresat von Patienten wurde vor ("Kontrolle") und nach UVA-Bestrahlung ("ECP") mit 0,1 μ g/ml LPS stimuliert. Die IL-1 β Menge wurde 24 Stunden später mittels ELISA gemessen. n=10; Statistik: *p<0.01.

Die erzielten Daten zeigen, eine durch die ECP geförderte IL-1 β Freisetzung in Leukapheresat-Proben. Im Vergleich zur Kontrolle (vor UVA-Bestrahlung) ist eine deutliche IL-1 β Freisetzung in dem Ansatz ECP (nach UVA-Bestrahlung) zu erkennen. Die freigesetzte IL-1 β Menge im Ansatz vor der Behandlung mit UVA-Licht ist auf die in-vitro Stimulation mit LPS (0,1 μ g/ml) zurückzuführen. Die erzielten Daten bestätigen somit, die Ergebnisse die zuvor bereits mit humanen PBMCs sowie murinen Zellen nachgewiesen werden konnten.

Zur Überprüfung der IL-1 β Form –ob pro- oder mature-Form vorliegt- wurden die Proben auch auf ihren pro-IL-1 β Gehalt gemessen.

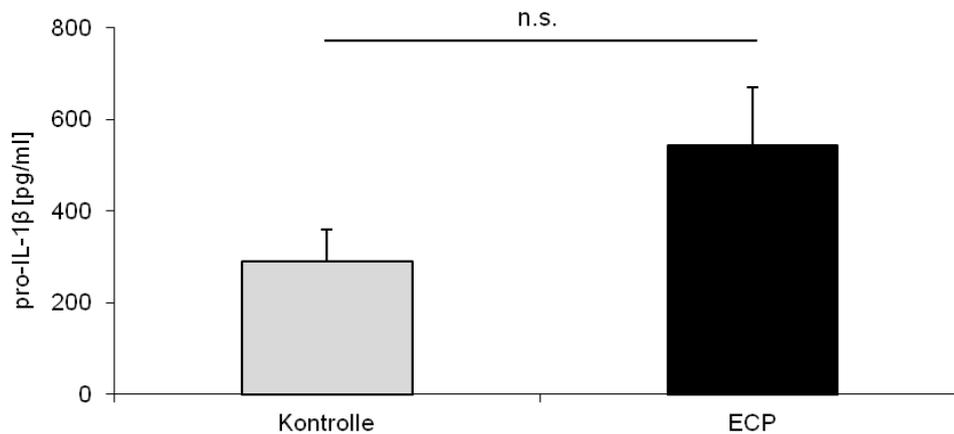


Abb. 37. **Die ECP fördert die Freisetzung von pro-IL-1 β in Leukapheresat-Proben von Patienten jedoch in geringerer Menge als die mature-IL-1 β Form.** Das Apheresat von Patienten wurde vor ("Kontrolle") und nach UVA-Bestrahlung ("ECP") mit 0,1 μ g/ml LPS stimuliert. Die IL-1 β Menge wurde 24 Stunden später mittels ELISA gemessen. n=10.

Im Vergleich zur mature-Form (Abb. 36) fiel die gemessene Menge an pro-Form deutlicher geringer aus. Die Tendenz, die zwischen dem Kontroll- und ECP-Ansatz zu beobachten war, ist auch in der pro-Form zu erkennen.

Um zu überprüfen, ob die ECP-Behandlung der Patienten evtl. auch eine modulierende Wirkung auf die IL-18 Freisetzung besitzt –wie zuvor beim Einsatz von PBMCs (Abb. 35) gezeigt- erfolgte zusätzlich die Bestimmung der IL-18 Freisetzung in Leukapheresat-Proben.

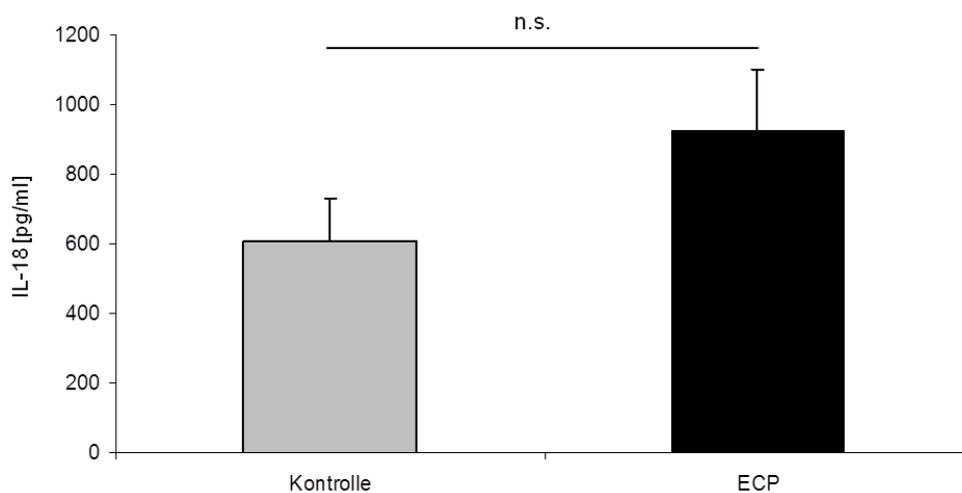


Abb. 38. **Die ECP fördert die IL-18 Freisetzung in Leukapheresat-Proben von Patienten.** Das Apheresat von Patienten wurde vor ("Kontrolle") und nach UVA-Bestrahlung ("ECP") mit 0,1 μ g/ml LPS stimuliert. Die IL-18 Menge wurde 24 Stunden später mittels ELISA gemessen. n=10.

Sowohl in den Proben vor als auch nach UVA-Bestrahlung ist eine Freisetzung von IL-18 ersichtlich. Die Freisetzung in der Kontrolle ist auf die -wie zuvor erwähnt- in-vitro Stimulation mit LPS zurückzuführen. Es ist eine Erhöhung der IL-18 Freisetzung nach UVA-Bestrahlung zu erkennen, wie sie auch in der IL-1 β Freisetzung beobachtet wurde. Wie bereits beim Einsatz von PBMCs gezeigt werden konnte, ist auch in Patienten-Proben ein deutlicher Unterschied in der Freisetzung von IL-1 β und IL-18 zu erkennen. Die freigesetzte Menge an IL-1 β ist deutlich höher als die freigesetzte Menge an IL-18.

Neben dem Apheresat wurde von den Patienten zusätzlich auch peripheres Blut vor und nach einer ECP-Behandlung entnommen und in Kultur genommen.

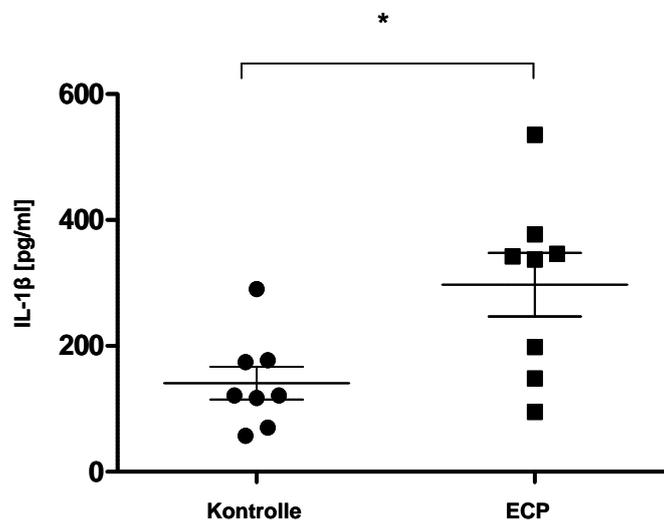


Abb. 39. **Die ECP fördert die mature-IL-1 β Freisetzung im peripheren Blut von Apherese-Patienten.** Das periphere Blut von Patienten wurde eins zu fünf verdünnt, und vor ("Kontrolle") und nach UVA-Bestrahlung ("ECP") mit 0,1 μ g/ml LPS stimuliert. Die IL-1 β Menge wurde 24 Stunden später mittels ELISA gemessen. n=8; Statistik: *p<0.05.

Wie bereits in den Leukapheresat-Proben dargestellt, konnte auch im peripheren Blut der Patienten eine erhöhte IL-1 β Freisetzung nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Kontrolle ist auch in diesem Fall eine Steigerung der IL-1 β Freisetzung nach Photopherese zu erkennen. Im Gegensatz zu den Leukapheresat-Proben wurde das entnommene periphere Blut vor der in-vitro LPS-Stimulation eins zu fünf verdünnt. Auf Grund der Vorverdünnung des peripheren Bluts und der geringeren Leukozyten-Konzentration fällt die Menge an IL-1 β im peripheren Blut geringer aus als im Leukapheresat.

Mit den peripheren Blutproben erfolgte, wie zuvor auch in den Leukapheresat-Proben (Abb. 37), die Bestimmung der pro-IL-1 β Konzentration. Die Überprüfung wies kein pro-IL-1 β auf.

6 Diskussion

Die extrakorporale Photopherese ist ein klinisch etabliertes, immunmodulierendes Verfahren. Um die Wirkungsweise der extrakorporalen Photopherese zu verstehen, wurden bis heute eine ganze Reihe an Untersuchungen durchgeführt. Obwohl sie, aufgrund des geringen Spektrums an Nebenwirkungen, heutzutage weltweit in 200 Zentren als Mono- oder Kombinationstherapie durchgeführt (Knobler et al., 2009) wird, ist der ihr zugrunde liegende zelluläre Wirkmechanismus nur unvollständig verstanden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die modulierende Wirkung der experimentellen Photopherese -in An- bzw. Abwesenheit von LPS- auf die IL-1 β Freisetzung zu untersuchen. Um die Fragestellung beantworten zu können, wurden Experimente sowohl mit murinen- als auch humanen Leukozyten durchgeführt. Desweiteren wurde anhand gendefizienter Mäuse der Signalweg eingegrenzt, anhand derer die IL-1 β Freisetzung stattfindet.

6.1 Apoptoseinduktion in murinen Leukozyten nach experimenteller Photopherese Behandlung

Die Apoptose ist der programmierte Zelltod einer Zelle. Die Zelle wird dabei selbst aktiv, und setzt Prozesse in Gang die zu ihrem Tod führen. Dabei kann sie von außen durch Immunzellen angeregt werden, oder aber es findet eine starke Schädigung der Erbinformation statt. Neben der Apoptose kann eine Zelle durch einen weiteren Prozess, der sogenannten Nekrose, sterben. Dabei kommt es durch Schädigung der Zellstruktur infolge mechanischer Verletzungen, Toxinen oder Infektionen zu Membrandefekten. Dadurch erfolgt ein unkontrollierter Austritt des Zellinhalts in die Umgebung mit einhergehender Entzündung.

Die Behandlung von murinen Leukozyten mit dem Photosensibilisator 8-Methoxypsoralen und UVA-Bestrahlung induziert deren Apoptose. 8-MOP ist ein inertes Molekül, und wird erst durch UVA-Bestrahlung aktiviert. Durch die Bestrahlung erfolgt ein „DNA-*crosslinking*“ zwischen den Pyrimidinbasen, und die Entstehung von Photoaddukten. Die Bildung von Photoaddukten hindert die DNA-Replikation, und somit die Zellteilung. Dadurch kommt es schlussendlich zur

Apoptose. Dieses konnte durch in-vitro Experimente, anhand muriner Leukozyten, bestätigt werden (Abb. 7, Abb. 8). Die erzielten Daten zeigen, dass für die Induktion hoher Apoptoseraten das Zusammenspiel von UVA-Bestrahlung und 8-MOP notwendig ist. Diese Beobachtung lässt sich anhand der durchgeführten Kontrolle (woMOP woUVA), in der die Apoptoserate geringer ausfällt, bestätigen. Die Apoptose, die in der Kontrolle zu sehen ist, lässt sich damit erklären, dass ein Teil der Zellen über eine Zeitdauer von 24h automatisch in die Apoptose übergehen. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die alleinige UVA-Bestrahlung nach einer Inkubationsdauer von 24h zu einer hohen Apoptoserate führt, und die Rate durch Steigerung der Bestrahlungsintensität von 1 auf 3 Joule zunimmt. Das Einleiten der Apoptose durch Einsatz der extrakorporalen Photopherese auf Leukozyten wurde bereits mehrfach aufgezeigt (Voss et al., 2010; Rao et al., 2008; Bladon & Taylor, 2006). Diese Beobachtungen konnten in in-vitro Experimenten bestätigt werden. Dabei konnten zum einen das notwendige Zusammenspiel aus 8-MOP und UVA-Bestrahlung aufgezeigt werden, und zum anderen, dass die Apoptoserate mit zunehmender Zeitdauer signifikant ansteigt.

6.2 Einfluss der experimentellen Photopherese auf die Zytokinfreisetzung

Zytokine sind Botenstoffe des Immunsystems. T-Zellen, CD4-T-Helfer (Th) und CD8-Zytotoxische-T Zellen (Tc), können anhand ihres Zytokinprofils voneinander unterschieden werden. Th1-Zellen produzieren zum Beispiel pro-inflammatorische Proteine wie IFN γ und TNF α , wohingegen Th2-Zellen immunregulatorische Proteine wie IL-4 und IL-5 produzieren (Mosmann & Coffman, 1989).

Der Effekt der experimentellen Photopherese auf das Zytokinmuster ist in der Literatur sehr umstritten, und viele Studien zeigen entgegengesetzte Resultate (Bladon & Taylor, 2006). So konnte in einer vorangegangenen Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe eine erhöhte IL-1 β Freisetzung nach Behandlung mit experimenteller Photopherese festgestellt werden.

Interleukin-1 β fungiert als eine Antwort auf Infektionen und Verletzungen, und wird hauptsächlich von Monozyten, Makrophagen aber auch von myeloiden DZ und neutrophilen Granulozyten freigesetzt (Dinarello, 1996 & 1998; Sasaki et al., 2002

& Gadola et al., 2009). Aufgrund der Kenntnis, dass myeloide Zellen (Makrophagen, Monozyten, DC) in der Lage sind, erhöhte Mengen an IL-1 β zu produzieren, wurden sie für die Experimente ausgewählt.

6.2.1 LPS-geförderte IL-1 β Freisetzung in murinen Peritoneal-Makrophagen, L929-generierten Makrophagen und DZ

LPS ist in der Lage durch die Bindung an den TLR4-Rezeptor auf Zelloberflächen das angeborene Immunsystem zu aktivieren, und führt zur Synthese einer Reihe an Zytokinen und Chemokinen. Diese rekrutieren ihrerseits inflammatorische Zellen, welche das Immunsystem aktivieren und zu einer Entzündungsreaktion führen (Matsukawa & Yoshinaga, 1998). LPS ist durch die Bindung an membranständige TLR4-Rezeptoren auf der Zelloberfläche in der Lage den NF- κ B Signaltransduktionsweg zu aktivieren. Die Aktivierung führt zu Expression der pro-IL-1 β Form und zur Transkription einiger Vorläuferproteine des Inflammasoms. Beide akkumulieren im Zytoplasma bis ein weiteres Signal die Zusammenlagerung der Inflammasom-Proteine einleitet. Die pro-IL1 β Expression wird durch inflammatorische Stimuli wie LPS reguliert, die Spaltung der pro-Form in die biologische aktive Form benötigt ein weiteres Signal wie z.B. ATP. Das ATP ist in der Lage die Caspase-1, welche zur Spaltung der pro- in die aktive-Form nötig ist, zu aktivieren und das IL-1 β freizusetzen. Die alleinige Zugabe von ATP zu Makrophagen oder Monozyten führt zu einer sehr geringen Freisetzung von mature-IL-1 β . Die Zugabe von ATP zu „LPS-geprimten“ Zellen führt hingegen zu einer deutlich höheren Freisetzung (Dinarello, 1998, Hogquist et al., 1991, Sanz & Di Virgilio 2000, Ferrari et al., 1997). Dieses konnte hier anhand der Positiv-Kontrollen, die bei jeder Versuchsanordnung durchgeführt wurden, bestätigt werden.

Da bekannt ist, dass nicht jeder Zelltyp in der Lage ist IL-1 β in hohen Mengen freizusetzen, erfolgte zunächst der Einsatz von Peritoneal-Makrophagen. Es ist möglich nicht manipulierte/naive Makrophagen aus dem Peritonealraum zu gewinnen (Zhang et al., 2008). Deng et al. (2011) konnten zeigen, dass die Reinheit der gewonnenen Makrophagen durch die Oberflächenfärbung mit F4/80 einen Wert von über 95% erreichen kann. Die in dieser Arbeit durchgeführten durchflußzytometrischen Untersuchungen (Abb. 10) ergaben einen

reproduzierbaren Wert von 89%. Somit lag ein System vor, mit der immer annähernd die gleiche hohe Reinheit erzielt werden konnte. Le Feuvre et al. (2002) konnten zeigen, dass Peritoneal Makrophagen in der Lage sind hohe Mengen an IL-1 β freizusetzen. Daher erfolgte zur Untersuchung der modulierenden Wirkung der experimentellen Photopherese auf die IL-1 β Freisetzung zunächst der Einsatz dieser Zelltypen. Wie der Abb. 11 zu entnehmen ist, führt die alleinige Zugabe von LPS (20 & 200ng/ml) in Gegenwart verschiedener Bestrahlungsdosen zu keiner nennenswerten IL-1 β Freisetzung. Diese Beobachtung deckt sich mit den Daten von Le Feuvre et al. (2002). Sie konnten zeigen, dass die alleinige Behandlung von Makrophagen mit LPS bzw. PBS (Vehikel) nur sehr geringe IL-1 β Freisetzungen hervorrufen (<150pg/ml). Desweiteren führt die Bestrahlung der Zellen in den Ansätzen ohne LPS und MOP zu keiner Freisetzung. Eine erhöhte Freisetzung findet erst in Kombination mit MOP statt. Dabei ist auch kein nennenswerter Unterschied zwischen den eingesetzten LPS-Konzentrationen zu erkennen gewesen. Die erhöhte Freisetzung durch die MOP-Zugabe, könnte daran liegen, dass durch die DNA-/MOP-Wechselwirkung die niedrige konstitutive pro-IL-1 β -Expression erhöht wird. Diese Annahme ließe sich evtl. auch anhand der gesteigerten Freisetzung in Gegenwart höherer UVA-Dosen erklären. Durch die erhöhte UVA-Dosis wird die Wechselwirkung zwischen MOP und DNA weiter verstärkt, und die Expression dadurch erhöht. Mit den Makrophagen lag nun ein Zelltyp vor, mit der die Wirkung der experimentellen Photopherese in Gegenwart von LPS dargestellt werden konnte. Da die Zellausbeute pro Maus jedoch sehr gering war, und die Zellgewinnung sehr aufwendig, wurden im nächsten Schritt Makrophagen in-vitro differenziert. Stanley et al. (1978) konnten zeigen, dass durch Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (M-CSF) eine hohe Makrophagen Differenzierung stattfinden kann. Diese Beobachtung konnte hier anhand der durchgeführten Zellzählungen bestätigt werden, und es wurde gezeigt, dass nach sechs-tägiger Kultivierung eine Reinheit von 98% erzielt werden konnte (Abb. 12). Das „Primen“ der Zellen mit LPS mit anschließender experimenteller Photopherese Behandlung wie sie in der Versuchsanordnung in der Abb. 9 zu sehen ist, zeigt eine durch die experimentelle Photopherese verstärkte IL-1 β Freisetzung (Abb. 13b). Um den LPS-Effekt auf die Freisetzung zu minimieren, erfolgte der Einsatz von geringeren Konzentrationen als beim Einsatz der Peritoneal-Makrophagen. Die Unterschiede

zwischen der geringeren (250pg/ml) und höheren (5ng/ml) LPS-Konzentration konnten somit dargestellt werden. Wie zuvor beim Einsatz der Peritoneal-Makrophagen, konnte auch hier gezeigt werden, dass der Einsatz der experimentellen Photopherese eine deutliche Steigerung der IL-1 β Freisetzung hervorrufen kann. Es erfolgte der Einsatz höherer UVA-Dosen, um zu überprüfen, ob höhere Dosen evtl. auch höhere Freisetzungen hervorrufen können. Der Einsatz von 10 Joule/cm² UVA-Bestrahlung, als höchste Dosis, zeigte im Vergleich zu 5 Joule eine deutliche Abnahme in der Freisetzungsrates. Der Grund für die Abnahme könnte darin liegen, dass durch die hohe Dosis die Zellen so stark zerstört werden, dass die pro-IL1 β Expression dadurch verhindert wird. Um zu überprüfen, ob die Zellen generell in der Lage sind IL-1 β zu exprimieren/freizusetzen, erfolgte eine Positiv-Kontrolle mit den genannten LPS-Konzentrationen in Kombination mit 5mM ATP. ATP aktiviert den P2X7 Rezeptor Kationen Kanal, welches einen Kalium-Austritt induziert, und den Pannexin-1 Kanal mit einbezieht. Dieser verstärkt den Kalium-Austritt (Pelegriin & Surprenant, 2006). Die Behandlung von Makrophagen mit Nigericin, einem von *Streptomyces* abgeleitetes Kalium-Ionophor, verstärkt wie das ATP, ebenfalls die NLRP3-Inflammasom Aktivierung (Mariathasan et al., 2006). Des Weiteren wird angenommen, dass reaktive Sauerstoffradikale (ROS) ebenfalls an der Inflammasom-Aktivierung beteiligt sind (Skeldon & Saleh, 2011). So konnten Dostert et al. (2008) zeigen, dass der Verlust der p22^{phox} Untereinheit des ROS-generierenden NADPH Komplexes in humanen Monozyten-Zelllinien (THP-1) in einer reduzierten IL-1 β -Prozessierung als Antwort auf Asbest, aber nicht Harnsäure- (MSU-) Kristallen mündet. Le Feuvre et al. (2002) konnten durch Einsatz von Peritoneal-Makrophagen aufzeigen, dass eine zu lange Stimulation der Zellen mit ATP zum Zelltod führen kann, welches teilweise LPS und Caspase-1 abhängig ist, aber unabhängig von Zytokin-Prozessierung und –Freisetzung. So konnten sie zeigen, dass die alleinige ATP-Behandlung zu einer geringen IL-1 β Freisetzung führt, und erst die Kombination von ATP mit LPS hohe Freisetzungsrates aufzeigen (5300 \pm 1790 pg/ml). In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (M-CSF) gewonnenen Makrophagen eine Freisetzung von 113pg/ml beim Einsatz von 250pg/ml-, und eine höhere Freisetzung beim Einsatz von 5ng/ml LPS (1168pg/ml) in Kombination mit ATP aufgezeigt werden (Abb. 13). Desweiteren konnten Le

Feuvre et al. (2002) zeigen, dass eine P2X7-Rezeptor-Stimulation über 30min bereits zum Zelltod und IL-1 β Freisetzung in „LPS-geprimten“ Makrophagen führen kann. Im Gegensatz dazu zeigt die Arbeit von Mehta et al. (2001), dass nach LPS-Priming (1ng/ml) von humanen Monozyten die höchste Freisetzung erst nach 1h ATP-Stimulation erfolgt. Wie bereits beschrieben, kann die IL-1 β Freisetzung durch die Aktivierung des purinergen Plasmamembran-Rezeptors P2X7 reguliert werden (Solle et al., 2001, Perregaux & Gabel, 1998), für welches ATP als der Hauptendogene Ligand angenommen wird. Untersuchungen von Mehta et al. (2001) bestätigten diese Beobachtungen. So konnten sie zeigen, dass die Freisetzung von IL-1 β und IL-18 durch einen P2X7 Rezeptor-Antagonisten, oxidiertes ATP, blockiert werden kann, und die alleinige Zugabe von ATP für das „Triggern“ und Freisetzung unzureichend ist.

Die LPS-geförderte IL-1 β Freisetzung wurde auch in aus dem Knochenmark mit GM-CSF/IL-4-generierten DZ untersucht. In der Regel lag der Anteil der differenzierten DZ nach in-vitro Expansion bei 60-70% der vitalen Zellen. Obwohl die Zellernte bereits nach sechs Tagen stattfand, konnte so dennoch eine vergleichbare Reinheit erzielt werden, wie sie auch von Inaba et al. (1992) gezeigt werden konnte (Ernte nach acht Tagen). Beide Methoden unterschieden sich in einigen entscheidenden Punkten. In der vorliegenden Arbeit erfolgte vor der Kultivierung der aus dem Knochenmark gewonnenen Zellen keine Depletion von Granulozyten oder T- und B-Zellen. Die gewonnenen Zellen wurden nach Erythrozytenlyse und einigen Waschschritten in Kultur genommen. Des Weiteren erfolgte zusätzlich zu GM-CSF der Einsatz von IL-4. Der Einsatz der Zellen ohne vorherige Depletion der o.g. Zelltypen könnte den Grund dafür liefern wieso auch die Zellausbeute viel größer war, als bei Inaba et al. (1992). Lutz et al. (1999) sowie Stephen et al. (2009) beschrieben weitere Methoden durch die DZ aus dem Knochenmark generiert werden können. Beide erzielten mit den eingesetzten Methoden Reinheiten von 80-95%, und im Vergleich zu Inaba et al. sehr hohe Zellausbeuten (2×10^8 und $2,2 \times 10^7$). Da die Reifung der DZ entscheidenden Einfluss auf eine Immunantwort haben kann, wurde zusätzlich die Reifung der Zellen mit den Reifungsmarkern CD86 und I-A^b bestimmt. Es ergab sich eine reproduzierbare Menge an ausgereiften DZ um 90%. Da mit dieser Methode nun eine leichte und reproduzierbare Methode vorlag, um DZ zu generieren, und bekannt ist, dass DZ in der Lage sind nach „LPS-Primen“ IL-1 β freizusetzen,

wurden die zuvor mit den Makrophagen durchgeführten Experimente nun mit den DZ wiederholt. Die erzielten Daten zeigen vergleichbare Tendenzen wie sie zuvor bereits beim Einsatz von Makrophagen gezeigt werden konnten. Es erfolgte eine Zunahme der Freisetzung beim Einsatz von MOP in Kombination mit UVA-Bestrahlung in zuvor „LPS-geprimten“ Zellen. Der Einsatz der verschiedenen MOP-Konzentrationen zeigt, dass die höchste Freisetzung beim Ansatz mit 800ng/ml MOP erfolgt. Die geringeren bzw. höheren MOP-Konzentrationen zeigen eine verminderte IL-1 β Freisetzung.

Im Vergleich zu unbestrahlten Zellen konnten An et al. (2010) in-vitro durch Einsatz einer humanen Keratinozyten Zelllinie (HaCat) 2h nach UVA-Bestrahlung eine deutliche TNF- α und IL-1 β mRNA-Expression aufzeigen. Der Anstieg der TNF- α und IL-1 β Proteinexpression erfolgte erst 12h nach Bestrahlung und fiel 24h später auf den Wert ab, wie sie auch bei unbestrahlten Zellen zu beobachten ist. So konnten sie zeigen, dass UVA-Bestrahlung sowohl an der IL-1 β mRNA- als auch IL-1 β Proteinexpression beteiligt ist.

Viele entzündungsbedingte Prozesse, wie Inflammasom-Aktivierung und IL-1 β Freisetzung, sind abhängig von Redox-Signalwegen (Rubartelli et al., (2011)). So gehen Rubartelli et al. (2011) davon aus, dass Unterschiede im Redoxstatus und die Redoxantwort gegenüber Stimulanzen, die Effektivität der Inflammasom-Aktivierung, und somit die IL-1 β Freisetzungsraten mit beeinflussen. Reaktive Sauerstoffradikale (ROS) sind Nebenprodukte des Zellmetabolismus. Es wird angenommen, dass sie eine zusätzliche Funktion in Zellsignalwegen haben (Finkel, 1998, Thannickal & Fanburg, 2000). Ultraviolett Strahlung kann sehr wirksam die Bildung verschiedener Reaktiver-Sauerstoffradikale (ROS) einleiten (An et al., 2010). So haben viele Studien die Rolle der ROS in der Aktivierung der MAP-Kinase als Antwort auf UV-Bestrahlung dargestellt (Fialkow et al., 1994, Gao et al., 2007, Xing et al., 2008). Ein P2X7-Rezeptor Engagement führt in Makrophagen zur Entstehung von ROS (Pfeiffer et al., 2007). Eine in-vitro Hemmung der ROS-Entstehung durch inhibitorische Substanzen oder das Runter regulieren der NADPH-Oxidase Untereinheiten zeigen, dass in Abwesenheit der ROS-Produktion die Caspase-1 Aktivierung und die IL-1 β Freisetzung unterbunden werden (Hewinson et al., 2008 & Cruz et al., 2007). Diese Befunde könnten eine Teilerklärung dafür liefern, wieso im Vergleich zu den Ansätzen mit

alleiniger MOP-Zugabe eine deutliche Steigerung der IL-1 β Freisetzung in Gegenwart von UVA zu sehen war. Möglicherweise erfolgt durch die Bestrahlung eine ROS-Bildung, welches die IL-1 β Freisetzung mitregulieren kann.

Um zu überprüfen, ob autokrine ATP-Freisetzung für die Aktivierung des P2X7-Rezeptors und somit des Inflammasoms verantwortlich sein kann, wurden Experimente in Gegenwart von Apyrase wiederholt. Apyrase ist ein Enzym, welches das autokrin freigesetzte ATP durch dessen Hydrolyse in AMP inhibiert (Singer et al., 1988). Singer et al. zeigen, dass die Zugabe des ATP-hydrolysierenden Enzyms Apyrase sowie oxidiertes ATP, welche die durch extrazelluläres ATP hervorgerufene Inflammasom-Aktivierung blockieren können, die IL-1 β Freisetzung ebenfalls nicht inhibieren können. Die Zugabe der Apyrase erfolgte auch in der vorliegenden Arbeit (Abb. 19). So konnte in den durchgeführten Positiv-Kontrollen (Abb. 19a), wie zuvor bereits von Elssner et al. (2004) gezeigt, die inhibierende Wirkung der Apyrase auf die IL-1 β Freisetzung zwar gezeigt werden, aber ebenfalls keine Hemmung in Gegenwart von 8-MOP gesehen werden. Diese Resultate weisen darauf hin, dass die Inflammasom-Aktivierung in Gegenwart von 8-MOP nicht durch die Freisetzung endogener Signale wie ATP hervorgerufen wurde. Diese Beobachtung deckt sich auch mit den Ergebnissen um Prantner et al. (2009). So konnten sie in LPS-geprägten Makrophagen zwar die Wirkung der Apyrase in den Positiv-Kontrollen aufzeigen, jedoch auch keine Inhibierung der IL-1 β Freisetzung bei Zugabe einer weiteren Komponente, hier *Chlamydia muridarum*. Sie gehen davon aus, dass während einer *C. muridarum* Infektion, ein durch Kalium-Ausstrom vermittelte Caspase-1 Aktivierung unabhängig von der Bindung von ATP an den P2X7-Rezeptor stattfindet. Es wurde schon lange postuliert, dass es eine Verbindung zwischen der P2X7-Aktivierten Poren-Bildung und Zytokin-Freisetzung in Makrophagen existiert (Ferrari et al., 2006). Pelegrin & Suprenant (2006) konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass Pannexin-1 diese Verbindung darstellt. Sie zeigten durch die Blockade des panx1-Proteins mit panx1-siRNA die entscheidende Rolle dieses Membranproteins in der P2X7R-Aktivierung der Caspase-1 Kaskade. Sie suggerieren mit ihren Ergebnissen, dass panx1 evtl. als ein nichtselektiver Halbkanal fungiert, welches durch die P2X7R Stimulation aktiviert wird, das für die Caspase-1 Kaskaden Aktivierung zuständig ist.

6.2.2 LPS-unabhängige IL-1 β Freisetzung in murinen DZ

Wie zuvor beschrieben, ist für eine Caspase-1-abhängige IL-1 β Freisetzung zunächst die Aktivierung des MyD88-Signalweges, mit einhergehender Expression der NLRP-Proteine und der pro-IL-1 β Form notwendig. Die Aktivierung des MyD88-Signalwegs kann durch die Bindung exogener Gefahrensignalen, wie LPS, an den extrazellulär gelegenen TLR4-Rezeptor oder die Bindung von mature-IL-1 β an den IL-1-Rezeptor erfolgen. Nach der Synthese der NLRP- und pro-IL-1 β Vorläufer, ist ein weiteres Signal (z.B. ATP oder Nigericin) notwendig, um die Inflammasom-Komponenten zum Zusammenbau zu animieren, und somit die Caspase-1 zu aktivieren, welches seinerseits durch die Aktivierung in die Lage versetzt wird, die pro-IL-1 β Form in die Aktive mature-Form zu spalten. Die Notwendigkeit der oben genannten Schritte konnte mit Experimenten in Gegenwart von LPS und ATP aufgezeigt werden (5.2.4.2).

Neben diesem Versuchsaufbau, wurde zudem untersucht, ob es möglich ist das „LPS-Priming“ der Zellen durch Einsatz der experimentellen Photopherese zu ersetzen (5.2.4.3). So konnte durch Einsatz DZ im Versuchsaufbau, wie sie in der Abb. 20 dargestellt ist, gezeigt werden, dass die Zellen in Gegenwart der experimentellen Photopherese und Zugabe von ATP bzw. Nigericin in die Lage versetzt werden können IL-1 β freizusetzen (Abb. 21). Die Freisetzungsrates in Abwesenheit von LPS fällt jedoch geringer aus als in Anwesenheit (Abb. 15, Abb. 16). Das zeigt somit die Notwendigkeit einer starken Stimulation der Zellen mit den aus der Literatur bekannten Stimulanzen (Tab. 1). Um überprüfen zu können, ob der Einsatz verschiedener MOP-Konzentrationen die Freisetzungsrates mit beeinflusst, kamen drei verschiedene Konzentrationen zum Einsatz. Es zeigte sich, dass die höchste Freisetzung beim Einsatz der mittleren MOP-Konzentration (800ng/ml) erfolgt. Die durchgeführten Kontrollen (woMOP + ATP/Nigericin) weisen auf, dass beim Einsatz DZ zur IL-1 β Freisetzung zwei Signale nötig sind. Denn wie in den Kontrollen ersichtlich ist, erfolgt beim Fehlen von MOP eine deutlich geringere Freisetzung. Die Zugabe von ATP bzw. Nigericin zu unbestrahlten-/bestrahlten Zellen weist nur eine geringe Freisetzung auf, die sich an der ELISA-Nachweisgrenze befindet, und somit vernachlässigbar ist. Die Zugabe von MOP vor Bestrahlung und anschließender ATP-/Nigericin-Zugabe zeigt dagegen eine deutliche Freisetzung. Diese Ergebnisse zeigen zum Einen,

dass die alleinige ATP bzw. Nigericin-Zugabe zur IL-1 β Freisetzung unzureichend ist, und zum Anderen, dass der Einsatz der experimentellen Photopherese den zur Expression der NLRP-Proteine und pro-IL-1 β notwendigen MyD88-Signalweg aktivieren kann.

Die höhere Bestrahlungsdosis von 10 Joule/cm² diene als Kontrolle, und sollte aufzeigen, dass die Zellen durch die enorme Bestrahlungsdosis in die Nekrose gehen, und dadurch die IL-1 β Freisetzungsraten wieder abnehmen. Damit konnte gezeigt werden, dass die erhöhte IL-1 β Freisetzung nicht einfach ein Produkt der Zellnekrose war.

6.2.3 Einfluss der experimentellen Photopherese auf die IL-1 β und IL-18 Freisetzung in humanen Zellen

Anhand von in-vitro Versuchen mit murinen Zellen konnte der Einfluss der experimentellen Photopherese auf die IL-1 β Freisetzung aufgezeigt werden (6.2.1, 6.2.2). Parallel dazu erfolgten in-vitro Versuche mit humanen mononukleären Leukozyten. Ziel dieser Versuche war es, die im murinem System erzielten Ergebnisse auch anhand humaner Proben zu bestätigen. Es konnte auch hier ein deutlicher Einfluss der experimentellen Photopherese auf die IL-1 β und IL-18 Freisetzung aufgezeigt werden (Abb. 30, Abb. 34). So war zu sehen, dass die Behandlung von LPS-„geprimten“ Zellen mit experimenteller Photopherese durch Einsatz der UVA-Bestrahlung zu einer signifikanten Freisetzung führen kann, welche durch eine weitere Erhöhung der Bestrahlung wieder abnimmt. Um sicher zu gehen, dass das freigesetzte IL-1 β tatsächlich auch die mature-Form ist, wurde zusätzlich zu den mature-IL-1 β Messungen auch die pro-Form bestimmt. So konnte anhand der durchgeführten Zytokinmessungen (Abb. 31) aufgezeigt werden, dass die in der Abb. 30 gezeigten Resultate auch tatsächlich die mature-Form darstellen. Um eine Kreuzreaktivität der verschiedenen eingesetzten ELISA-Kits auszuschließen, wurde diese durch Auftrag der pro-IL-1 β Standardkurve auf dem maturen-IL-1 β ELISA-Kit bestimmt. Es zeigte sich eine sehr geringe/vernachlässigbare Kreuzreaktivität (Abb. 32). Um die IL-1 β Freisetzung nicht nur anhand von Zytokinmessungen nachzuweisen, sondern auch auf Proteinebene, erfolgten zu ausgewählten Ansätzen zusätzliche Western-Blot Analysen (Abb. 33). Mit dieser Analyse sollte zum einen geprüft werden, ob durch

Einsatz der experimentellen Photopherese die Caspase-1 aktiviert wird, und zum anderen unter welchen Bedingungen das meiste mature-IL-1 β freigesetzt wird. So konnte neben den Zytokinmessungen auch mit dem Western-Blot die Wirkung der experimentellen Photopherese gezeigt werden. Denn zum einen war zu erkennen, dass der Einsatz zu einer Aktivierung der Caspase-1 führt, und zum anderen, dass durch die Aktivierung auch die mature-IL-1 β Form nachgewiesen werden konnte. Da die Caspase-1 ein durch den Zusammenbau der Inflammasom-Komponenten (NLRP Proteine und ASC-Moleküle) aktivierbares Molekül darstellt, können somit mit den erzielten Western-Blot Analysen zwei Vermutungen aufgestellt werden: zum Einen kann vermutet werden, dass die experimentelle Photopherese unabhängig des Inflammasom-Zusammenbaus schon in der Lage ist die Caspase-1 zu aktivieren, und zum Anderen, dass der Einsatz der experimentellen Photopherese als ein zweites Signal für die Inflammasom-Komponenten fungiert, welches den Zusammenbau und somit die Caspase-1 Aktivierung „triggert“.

Da anhand der erzielten Western-Blot Daten aufgezeigt werden konnte, dass der Einsatz der experimentellen Photopherese in der Lage ist die Caspase-1 zu aktivieren, und bekannt ist, dass die Caspase-1 neben IL-1 β auch IL-18 prozessieren kann (Dinarello, 2009), wurde im nächsten Schritt auch der Einfluss auf die IL-18 Freisetzung überprüft. So konnte gezeigt werden, dass die experimentelle Photopherese auch eine IL-18 Freisetzung hervorrufen kann. Wie bereits aus der Literatur bekannt ist, fällt auch hier die freigesetzte IL-18 Menge im Vergleich zu IL-1 β deutlich geringer aus.

Somit konnte anhand der humanen Daten die im murinem System erzielten Ergebnisse in Bezug auf den Einfluss der experimentellen Photopherese auf die IL-1 β Freisetzung bestätigt werden.

6.2.4 Vergleich der IL-1 β Freisetzung in murinen und humanen Zellen

Beim Vergleich der erzielten Ergebnisse in den murinen (6.2.1, 6.2.2) und humanen (6.2.3) Versuchen in Bezug auf die IL-1 β Freisetzung zeigt sich, dass durch Einsatz der experimentellen Photopherese in beiden Systemen eine Freisetzung gefördert werden kann. Die freigesetzte Rate fällt jedoch unterschiedlich aus. So bewegt sich die Freisetzungsrates im murinem System im pikogramm Bereich, wohingegen sie im humanem System im nanogramm Bereich

liegt. Im murinem System erfolgte überwiegend der Einsatz dendritischer Zellen. Im humanem System erfolgte der Einsatz von mononukleären Leukozyten (PBMCs). Der Unterschied könnte damit erklärt werden, dass die humanen Zellen gegenüber der experimentellen Photopherese in Bezug auf Vitalität resistenter sind als die murinen Zellen, und somit in der Lage sind auch mehr IL-1 β freizusetzen. Des Weiteren ist anzumerken, dass es im humanem System bei der Inflammasom-Aktivierung auch Unterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen existieren. So konnten Netea et al. (2010) zeigen, dass sich die IL-1 β Synthese und Freisetzung zwischen humanen Monozyten und Makrophagen unterscheiden. Sie zeigten, dass die Caspase-1 Aktivierung und die IL-1 β Freisetzung in Monozyten durch ein einziges Signal herbeigeführt werden kann, wohingegen Makrophagen zwei Signale benötigen. Eines der Gründe hierfür könnte darin liegen, dass Monozyten in der Lage sind endogenes ATP freizusetzen, welches das Inflammasom aktivieren kann. Im Gegensatz dazu fehlt den Makrophagen diese Fähigkeit (Ferrari et al., 1997). Diese unterschiedliche Art der Inflammasom-Aktivierung ermöglicht diesen Zelltypen sich besser an ihre Umgebung anzupassen. So patrouillieren zirkulierende Monozyten hauptsächlich in pathogenfreien Umgebungen, und müssen umgehend auf Gefahrensignale reagieren können. Im Gegensatz dazu befinden sich Makrophagen in Umgebungen wo sie ständig mikrobiellen Stimuli ausgesetzt sind. Daher ist es wichtig, dass diese Zelltypen nicht durch einen einzigen Stimulus aktiviert werden können. Denn ansonsten würde die einfache Inflammasom-Aktivierung in Makrophagen zu einer chronischen Entzündung führen (Netea et al., 2010).

6.2.5 Bestätigende Untersuchungen anhand klinischer Proben

Die im murinen- und humanen-System erzielten Ergebnisse warfen die Frage auf, ob der modulierende Einfluss auf die IL-1 β Freisetzung auch in klinischen Proben von Patienten nach Photopherese nachweisbar ist. Die Resultate (5.4) konnten anhand der klinischen Proben bestätigt werden. Wie zuvor in murinen und humanen Proben gezeigt, konnte auch in den klinischen Proben nach vorgeschaltetem LPS-„*Priming*“ eine deutliche IL-1 β Freisetzung nach Einsatz der Photopherese aufgezeigt werden. Sowohl im peripheren Blut als auch in den Leukapheresat-Proben konnte der Einfluss dargestellt werden, jedoch mit dem Unterschied, dass die freigesetzte Menge sich in beiden Proben unterschieden.

Die freigesetzte Menge im peripheren Blut (<1.000pg/ml) fiel im Vergleich zu den Leukapheresat-Proben (>1.000pg/ml) deutlich geringer aus (Abb. 36, Abb. 39). Der Grund hierfür könnte darin liegen, dass das entnommene periphere Blut im Gegensatz zu den Leukapheresat-Proben vor der in-vitro LPS-Stimulation eins zu fünf vorverdünnt wurde. Somit lag in den peripheren Blutproben im Vergleich zu den Leukapheresat-Proben eine geringere Leukozyten-Konzentration vor. In beiden Proben ist in den durchgeführten Kontrollen (vor UVA-Bestrahlung) eine Freisetzung von IL-1 β zu erkennen. Die freigesetzte Menge ist auf die in-vitro Stimulation mit LPS zurückzuführen. So konnte bereits beim Einsatz mononukleärer Leukozyten aufgezeigt werden, dass die alleinige LPS-Stimulation in der Lage ist eine gewisse Menge an IL-1 β freizusetzen.

6.3 Eingrenzen des Signalwegs mit gendefizienten Mäusen

Ausgehend von den Daten die bis jetzt erzielt wurden, konnte gezeigt werden, dass die experimentelle Photopherese eine IL-1 β Freisetzung fördert. Um überprüfen zu können, auf welche molekularen Prozesse der Einsatz der experimentellen Photopherese einen Einfluss hat, und um die Signalwege die zur IL-1 β Freisetzung führen einzugrenzen, erfolgten im nächsten Schritt der Einsatz gendefizienter Mäuse.

Die durchgeführten Kontrollen (Abb. 23, Abb. 24) zeigen, dass eine Gendefizienz vorliegt. Die Erkenntnis, dass beim Fehlen von ASC und Caspase-1 durch Einsatz der experimentellen Photopherese eine Freisetzung von IL-1 β trotzdem stattfinden kann, lässt die Vermutung zu, dass dessen Einsatz, neben den bekannten Signalwegen die über das Inflammasom die IL-1 β Freisetzung fördern, auch andere Signalwege eingeschaltet werden. So beschreiben Netea et al. (2010), dass die Caspase-1 bei einigen Infektionen oder in Modellen der sterilen Entzündung weniger wichtig ist, und dass es auch alternative Mechanismen wie die der Neutrophilen-Serinproteasen oder Proteasen freigesetzt von mikrobiellen Pathogenen existieren, die in der Lage sind IL-1 β zu prozessieren und zu aktivieren. Neutrophile- und Makrophagen-abgeleitete Serinproteasen wie die Proteinase-3 (PR3), Elastase und Cathepsin-G (CatG) wurden als Enzyme identifiziert, die in der Lage sind die pro-IL-1 β Form in ihre aktive 21kDa schwere reife-Form zu prozessieren (Dinarello, 1996, Coeshott et al., 1999, Greten et al.,

2007). Somit liegt neben der Inflammasom-abhängigen IL-1 β Freisetzung ein weiterer Mechanismus vor, der in der Lage ist Inflammasom-unabhängig IL-1 β zu prozessieren, das heißt, dass das durch das LPS-*Priming* in der Zelle akkumulierte pro-IL-1 β muss nicht zwangsläufig durch das Inflammasom prozessiert und somit aktiviert werden. Daher könnte davon ausgegangen werden, dass das durch die experimentelle Photophorese hervorgerufene IL-1 β zum Teil auch Inflammasom-/Caspase-1-unabhängig prozessiert werden kann. Betrachtet man die erhaltenen Western-Blot Daten zu den Wildtyp-Mäusen (Abb. 17), so ist zu erkennen, dass die Caspase-1 und mit ihr einhergehend auch das pro-IL-1 β , wie zu erwarten gewesen, durch LPS-„*Priming*“ und der ATP-Zugabe aktiviert werden. Interessant dabei ist, dass zum ersten Mal auch auf molekularer Ebene aufgezeigt werden konnte, dass der Einsatz der experimentellen Photophorese die Caspase-1 und somit das pro-IL-1 β aktivieren kann. Auf Grund der zuvor erwähnten Tatsachen in Bezug auf die Serinproteasen und den durch das Western-Blot erzielten Daten kann spekuliert werden, dass die durch das LPS-„*Priming*“ hervorgerufene pro-IL-1 β tatsächlich nur zum Teil durch die Caspase-1 und somit Inflammasom-abhängig ist. Die Befunde die in den Wildtyp-Mäusen erzielt wurden, konnten auch anhand ausgewählter humaner Proben im Western-Blot ebenfalls bestätigt werden (Abb. 33).

Das Ausbleiben der mature-IL-1 β Freisetzung in der ASC-Positiv-Kontrolle (Abb. 23) deckt sich mit den Resultaten, die Broz et al. (2010) bereits dargestellt haben. So haben sie anhand von ELISA-Messungen und Western-Blot Analysen in mit *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* oder *L. pneumophila* infizierten ASC^{-/-} Makrophagen nachweisen können, dass diese Zellen in ihrer IL-1 β Freisetzung beeinträchtigt sind. Des Weiteren berichten sie, wie zuvor bereits andere Gruppen (Case et al., 2009; Mariathasan et al., 2004) aufgezeigt haben, dass es diesen Makrophagen nicht möglich ist die Caspase-1 zu prozessieren. Dies liefert auch den Grund dafür, weshalb es zu keiner Freisetzung von reifem IL-1 β kommt. Denn wie zuvor bereits erwähnt, ist für die Prozessierung der pro-IL-1 β Form aktive Caspase-1 nötig.

Es ist bis heute noch nicht eindeutig aufgeklärt, wie das NALP3-Inflammasom und mit ihr einhergehend die Caspase-1 aktiviert wird. Es werden drei alternative Mechanismen als Erklärung herangeführt. Die erste geht davon aus, dass

extrazelluläres ATP den purinergen P2X7-Ionenkanal stimuliert, und so zu einem Kalium-Austritt aus der Zelle führt, die wichtig ist für die Inflammasom-Aktivierung. Die alleinige Stimulation der Zellen mit ATP reicht nicht aus, um die Caspase-1 zu aktivieren. Für diesen Zweck ist ein weiterer Stimulus in Form von z.B. LPS notwendig (Franchi et al., 2009). Es wird auch angenommen, dass der Kalium-Ausstrom aus der Zelle die Bildung von größeren Poren (Pannexin-1 Kanal) „triggert“, über die die Möglichkeit zum Einstrom mikrobielle Produkte besteht, die ihrerseits ebenfalls das Inflammasom aktivieren können (Kanneganti, 2007). Die zweite Möglichkeit die diskutiert wird ist, dass durch Einschluss von DAMPs es zu einer Lysosomalen-Schädigung kommt, aus der es zum Beispiel zur Freisetzung von Cathepsin B kommt, die ebenfalls in der Lage sind das Inflammasom zu aktivieren (Halle et al., 2008, Hornung et al., 2008). Die dritte Möglichkeit der NALP3 Inflammasom-Aktivierung könnte durch die Entstehung von ROS als Nebenprodukt der Inflammasom-Aktivierung erfolgen, über die schließlich die Caspase-1 aktiviert wird (Dostert et al., 2008). Da anhand der erzielten Daten eine IL-1 β Freisetzung durch Einsatz der experimentellen Photopherese erzielt wurde, könnte davon ausgegangen werden, dass die UVA-Bestrahlung evtl. zu einer ROS-Bildung führt, welches das Inflammasom aktiviert. Da dieses Gebiet noch nicht vollständig aufgeklärt ist, ist eher davon auszugehen, dass erst das Zusammenspiel dieser drei Mechanismen das Inflammasom aktiviert.

Das ASC-Molekül fungiert als ein Brückenmolekül zwischen der PYRIN- und der CARD-Domäne des NLRP3- und AIM2-Inflammasoms (Srinivasula et al., 2002). Im Gegensatz zu diesen Inflammasomen fehlt dem NLRC4 Inflammasom die PYRIN-Domäne. Sie ist jedoch in der Lage direkt über ihre CARD-Domäne mit der Caspase-1 zu interagieren, und diese ASC-unabhängig zu aktivieren (Poyet et al., 2001). Diese Erkenntnis könnte den Grund dafür liefern, weshalb beim Einsatz der ASC-KO Maus in Gegenwart der experimentellen Photopherese dennoch eine signifikante Freisetzung von IL-1 β beobachtet werden konnte.

Viel Beachtung wurde der IL-1 β Freisetzung durch das Inflammasom und der Caspase-1 in Monozyten und Makrophagen geschenkt. Neben der Caspase-1 sind jedoch noch einige andere Proteasen bekannt die ebenfalls in der Lage sind pro-IL1 β in ihre bioaktive Form zu prozessieren. So berichtet Stehlik (2009), dass die Hemmung der Caspase-1 zum Beispiel in entzündlicher Arthritis lediglich nur

eine 50%-ige Hemmung der Erkrankung herbeiführt, welches als ein weiteres Indiz für die Anwesenheit weiterer IL-1 β prozessierender Proteasen dienen kann. Stehlik berichtet, dass neben Caspase-1 auch Serin Proteasen in der Lage sind pro-IL-1 β an verschiedenen Schnittstellen zu prozessieren und so aktives IL-1 β hervorrufen können. Serin Proteasen wie die Elastase, Cathepsin G, Chymotrypsin oder auch Chymase sind in der Lage das pro-IL-1 β in der Nähe der Caspase-1-Prozessierungsstelle zu prozessieren. Schonbeck et al. (1998) und Matsushima et al. (1986) berichten zum Beispiel, dass Stromelysin, Gelatinase A und Gelatinase B ebenfalls eine Funktion als *Interleukin-Converting Enzym* (ICE) haben. Anhand dieser Beobachtungen scheint es offensichtlich zu sein, dass die pro-IL-1 β Prozessierung in der Nähe der Caspase-1 Schnittstelle sein muss, um bioaktives IL-1 β prozessieren zu können. Denn es ist bekannt, dass die Prozessierung in zu große Peptide mit einem Aktivitätsverlust einhergeht (Stehlik, 2009).

Entzündliche Bedingungen gehen mit einer Infiltration von Neutrophilen einher. Diese kurzlebigen Zellen könnten nach Meinung von Stehlik nach ihrem Zelltod eine Quelle an pro-IL-1 β sein. Das in die Umgebung freigesetzte pro-IL-1 β könnte anschließend durch Proteasen aus der Umgebung in ihre bioaktive IL-1 β Form prozessiert werden. Da -wie zuvor beschrieben- mittels der experimentellen Photophoresis eine Apoptose und mit ihr einhergehend zum Teil auch ein Austritt von Zellinhalt hervorgerufen wird, könnte davon ausgegangen werden, dass die Freisetzung von pro-IL-1 β in die Umgebung neben der intrazellulären Caspase-1 auch mittels Proteasen aus dem extrazellulären Raum prozessiert werden könnte.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit die eine Caspase-1-unabhängige IL-1 β Freisetzung belegen, können anhand zuvor veröffentlichter Arbeiten bestätigt werden. So wird von Greten et al. (2007) eine IL-1 β Freisetzung in aus Caspase-1-KO Mäusen gewonnenen Neutrophilen Zellen als Antwort auf LPS beschrieben, welche zur IL-1 β Prozessierung alternative Proteasen nutzen. Guma et al. (2009) belegt die zuvor beschriebene Arbeit dahingehend, dass sie durch Einsatz von Elastase Inhibitoren, Elastase-Inhibitor III (AAPV), eine IL-1 β Freisetzung in aus Wildtyp-Mäusen gewonnenen Neutrophilen unterbinden können. Des Weiteren wird von dieser Arbeitsgruppe gezeigt, dass Mastzellen aus Wildtyp-Mäusen nach einer 16-Stündigen LPS-Stimulation in Anwesenheit von Chymase-Inhibitoren wie

dem Suc-VPF eine im Vergleich zu Vehikel-Kontrolle deutlich verminderte IL-1 β Freisetzung aufzeigen. Der Einsatz von Mastzellen erfolgte aus dem Grund, um aufzuzeigen, dass nicht nur die Caspase-1 bzw. die zuvor beschriebene Elastase in der Lage sind die pro-IL-1 β Form zu prozessieren, sondern es deutlich mehr Proteasen existieren, die ebenfalls dazu in der Lage sind. So wird von Black et al. (1991), Mizutani et al. (1991), Dinarello et al. (1986), Hazuda et al. (1990) und Irmiler et al. (1995) Ende der achtziger- Anfang der neunziger Jahre als Alternative zu Caspase-1 die Anwesenheit von aus Neutrophilen Zellen-abgeleitete (Cathepsin G, Elastase und Proteinase 3) und von Mastzellen abgeleitete Serin-Proteasen (Granzyme A und Chymase) berichtet, die ebenfalls in der Lage sind pro-IL-1 β in ihre biologisch aktive und freisetzbare Form umzusetzen.

Um zu überprüfen, ob die IL-1 β Freisetzung als Antwort auf eine Stimulation durch MSU-Kristallen lediglich der Caspase-1 zugeschrieben werden muss, oder es auch andere Erklärungen existieren, wurden von der Arbeitsgruppe um Guma Neutrophile Zellen von Caspase-1 KO Mäusen und Wildtyp-Mäusen getestet. Durch die IL-1 β Freisetzung in Caspase-1 KO Mäusen erbrachten sie somit einen weiteren Beleg dafür, dass nicht nur die Caspase-1 an der IL-1 β Prozessierung und Freisetzung beteiligt ist. Denn im selben Experiment wird auch gezeigt, dass durch Einsatz des Elastase-Inhibitors in Wildtypmäusen die IL-1 β Freisetzung um 40% unterbunden werden kann.

Bestätigend zur vorliegenden Arbeit beschreiben Martinon et al. (2006), dass durch MSU-Kristalle stimulierte Makrophagen bei einem Defekt in eines der Inflammasom-Komponenten (Caspase-1, ASC und NALP3), auch in ihrer IL-1 β Freisetzung gestört sind.

7 Literaturverzeichnis

A

- ACOSTA-RODRIGUEZ, E.V., NAPOLITANI, G., LANZAVECCHIA, A., AND SALLUSTO, F. (2007). **Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells.** *Nature Immunology* (8), 942-949.
- AN, L., DONG, G.-Q., GAO, Q., ZHANG, Y., HU, L.-W., LI, J.-H. & LIU, Y. (2010). **Effects of UVA on TNF- α and IL-1 β , and IL-10 expression levels in human keratinocytes and intervention studies with an antioxidant and a JNK inhibitor.** *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* (26), 28-35.
- ARDAVIN, C., AMIGORENA, S., AND REIS E SOUSA, C. (2004). **Dendritic Cells: Immunobiology and Cancer Immunotherapy.** *Immunity* (20), 17-23.
- AVRAMEAS, S. & GUILBERT, B. (1971). **A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme-labeled antibodies.** *Eur J Immunol* (1), 394-396.

B

- BAUERNFEIND, F., ABLASSER, A., BARTOK, E., KIM, S., SCHMID-BURGK, J., CAVLAR, T. AND HORNUNG, V. (2011). **Inflammasomes: current understanding and open questions.** *Cell Mol Life Sci.* (5), 765-83.
- BERGER, C.L., XU, A.-L., HANLON, D., LEE, C., SCHECHNER, J., GLUSAC, E., CHRISTENSEN, I., SNYDER, E., HOLLOWAY, V., TIEGELAAR, R., AND EDELSON, R.L. (2001). **Induction of human tumor-loaded dendritic cells.** *Int J Cancer* (91), 438-447.
- BETHEA, D., FULLMER, B., SYED, S., SELTZER, G., TIANO, J., RISCHKO, C., GILLESPIE, L., BROWN, D., AND GASPARRO, F.P. (1999). **Psoralen photobiology and photochemotherapy: 50 years of science and medicine.** *J Dermatological Science* (19), 78-88.
- BLACK, R., KRONHEIM, S., SLEATH, P., GREENSTREET, T., VIRCA, G.D., MARCH, C., KUPPER, T. (1991). **The proteolytic activation of interleukin-1 beta.** *Agents Actions Suppl.* (35), 85-9.
- BLADON, J. & TAYLOR, P.C. (2006). **Extracorporeal photopheresis: A focus on apoptosis and cytokines.** *Journal of Dermatological Science* (43), 85-94.
- BÖYUM, A. (1968). **Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g.** *Scan J Clin Lab Invest Suppl.* (97), 77-89.

- BRODSKY, I.E., MONACK, D. (2009). **NLR-mediated control of inflammasome assembly in the host response against bacterial pathogens.** *Seminars in Immunology* (21), 199-207.
- BROZ, P., VON MOLTKE, J., JONES, J.W., VANCE, R.E., AND MONACK, D.M. (2010). **Differential Requirement for Caspase-1 Autoproteolysis in Pathogen-Induced Cell Death and Cytokine Processing.** *Cell Host & Microbe* (8), 471-483.

C

- CASE, C.L., SHIN, S., AND ROY, C.R. (2009). **Asc and Ipaf Inflammasomes direct distinct pathways for caspase-1 activation in response to Legionella pneumophila.** *Infect Immunol* (77), 1981-1991.
- CHO, M.-L., KANG, J.-W., MOON, Y.-M., NAM, H.-J., JHUN, J.-Y., HEO., S.-B., JIN, H.-T., MIN, S.-Y., JU, J.-H., PARK, K.-S., CHO, Y.-G., YOON, C.-H., PARK, S.-H., SUNG, Y.-C., AND KIM, H.-Y. (2006). **STAT3 and NF- κ B Signal Pathway Is Required for IL-23-Mediated IL-17 Production in Spontaneous Arthritis Animal Model IL-1 Receptor Antagonist-Deficient Mice.** *J. Immunol.* (176), 5652-5661.
- COESHOTT, C., OHNEMUS, C., PILYAVSKAYA, A., ROSS, S., WIECZOREK, M., KROONA, H., LEIMER, A.H., AND CHERONIS, J. (1999). **Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor α and IL-1 β from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3.** *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96: 6261-6266.
- CRUZ, C.M., RINNA, A., FORMAN, H.J., VENTURA, A.L.M., PERSECHINI, P.M., AND OJCIUS, D.M. (2007). **ATP Activates a Reactive Oxygen Species-dependent Oxidative Stress Response and Secretion of Proinflammatory Cytokines in Macrophages.** *J Biol Chem* (282), 2871-2879.

D

- DENG, T., ZHANG, Y., CHEN, Q., YAN, K. & HAN, D. (2011). **Toll-like receptor-mediated inhibition of Gas6 and Pro Sexpresion facilitates inflammatory cytokine production in mouse macrophages.** *Immunology* (135), 40-50.
- DINARELLO, C.A. (2009). **Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family.** *Annu Rev Immunol* (27), 519-550.
- DINARELLO, C.A. (1998). **Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist.** *Int Rev Immunol* (16), 457-499.
- DINARELLO, C.A. (1998). **Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme.** *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (856), 1-11.

- DINARELLO, C.A. (1996). **Biologic Basis for Interleukin-1 in Disease.** Blood (87), 2095-2147.
- DINARELLO, C.A., CANNON, J.G., MIER, J.W., BERNHEIM, H.A., LOPRESTE, G., LYNN, D.L., LOVE, R.N., WEBB, A.C., AURON, P.E., REUBEN, R.C., RICH, A., WOLFF, S.M., AND PUTNEY, S.D. (1986). **Multiple Biological Activities of Human Recombinant Interleukin 1.** J Clin Invest (77), 1734-1739.
- DOSTERT, C., PETRILLI, V., VAN BRUGGEN, R., STEELE, C., MOSSMAN, B. T., AND TSCHOPP, J. (2008). **Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica.** Science (320), 674-677.
- DUEWELL, P., KONO, H., RAYNER, K.J., SIROIS, C.M., VLADIMER, G., BAUERNFEIND, F.G., ABELA, G.S., FRANCHI, L., NUNEZ, G., SCHNURR, M., ESPEVIK, T., LIEN, E., FITZGERALD, K.A., ROCK, K.L., MOORE, K.J., WRIGHT, S.D, HORNING, V. AND LATZ, E. (2010). **NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals.** Nature (464), 1357-1362.

E

- EDELSON, R., BERGER, C, GASPARRO, F., JEGASOTHY, B., HERALD, P., WINTROUB, B., VONDERHEID, E., KNOBLER, R., WOLFF, K., PLEWIG, G., MCKIERNAN, G., CHRISTIANSEN, I., OSTER, M., HONIGSMANN, H., WILFORD, H., KOKOSCHKA, E., REHLE, T., PEREZ, M., STINGL, G., AND LAROCHE, L. (1987). **Treatment of Cutaneous T-Cell Lymphoma by Extracorporeal Photochemotherapy.** N Engl J Med (316), 297-303.
- ELSSNER, A., DUNCAN, M., GAVRILIN, M., AND WEWERS, M.D. (2004). **A Novel P2X₇ Receptor Activator, the Human Cathelicidin-Derived Peptide LL37, Induces IL-1 β Processing and Release.** J Immunol (172), 4987-4994.
- ENGVALL, E. & PERLMAN, P. (1971). **Enzyme-linked immunosorbent (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G.** Immunochemistry (8), 871-874.

F

- FERRARI, D., PIZZIRANI, C., ADINOLFI, E., LEMOLI, R.M., CURTI, A., IDZKO, M., PANTHER, E. AND DI VIRGILIO, F. (2006). **The P2X₇ Receptor: A Key Player in IL-1 Processing and Release.** J Immunol (176), 3877-3883.
- FERRARI, D., CHIOZZI, P., FALZONI, S., DAL SUSINO, M., MELCHIORRI, L., BARICORDI, O.R., DI VIRGILIO, F. (1997). **Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages.** J Immunol (159), 1451-1458.
- FERRARI, D., CHIOZZI, P., FALZONI, S., HANAU, S., DI VIRGILIO, F. (1997). **Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin.** J Exp Med (185), 579-582.

- FIALKOW, L., CHAN, C.K., ROTIN, D., GRINSTEIN, S., DOWNEY, G.P. (1994). **Activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in neutrophils. Role of oxidants.** J Biol Chem (269), 31234-31242.
- FINKEL, T. (1998). **Oxygen radicals and signaling.** Current Opinion in Cell Biology (10), 248-253.
- FRANCHI, L., EIGENBROD, T., AND NÚÑEZ, G. (2009). **TNF- α Mediate Sensitization to ATP and Silica via the NLRP3 Inflammasome in the Absence of Microbial Stimulation.** J Immunol (183), 792-796.

G

- GADOLA, S.D. (2009). **Interleukin-1-Zytokine, Inflammasome, NOD-Signalsome und Autoinflammation.** Z Rheumatol (68), 712-719.
- GAO, M.Q., GUO, S.B., CHEN, X.H., DU, W., WANG, C.B. (2007). **Molecular mechanisms of polypeptide from Chlamys farreri protecting HaCaT cells from apoptosis induced by UVA plus UVB.** Acta Pharmacol Sin (28), 1007-1014.
- GERNER, M., HÖLIG, K., WEHNER, R., ZHAO, S., SCHÄKEL, K., BACHMANN, M.P., RIEBER, E.P., BORNHÄUSER, M., ANS SCHMITZ, M. (2009). **Extracorporeal Photopheresis Efficiently Impairs the Proinflammatory Capacity of Human 6-Sulfo LacNAc Dendritic Cells.** Transplantation (87), 1134-1139.
- GHIRINGHELLI, F., APETOH, L., TESNIERE, A., AYMERIC, L., MA, Y., ORTIZ, C., VERMAELEN, K., PANARETAKIS, T., MIGNOT, G., ULLRICH, E., PERFETTINI, J.-L., SCHLEMMER, F., TASDEMIR, E., UHL, M., GENIN, P., CIVAS, A., RYFFEL, B., KANELLOPOULOS, J., TSCHOPP, J., ANDRE, F., LIDEREAU, R., MCLAUGHLIN, N.M., HAYNES, N.M., SMYTH, M.J., KROEMER, G., AND ZITVOGEL, L. (2009). **Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β -dependent adaptive immunity against tumors.** Nature Medicine (15), 1170-1178.
- GRETEN, F.R., ARKAN, M.C., BOLLRATH, J., HSU, L.-C., GOODE, J., MIETHING, C., GÖKTUNA, S.I., NEUENHAHN, M., FIERER, J., PAXIAN, S., VAN ROOIJEN, N., XU, Y., O'CAIN, T., JAFFEE, B.B., BUSCH, D.H., DUYSER, J., SCHMID, R.M., ECKMANN, L., AND KARIN, M. (2007). **NF- κ B is a negative regulator of IL-1 β secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKK β .** Cell (130), 918-931.
- GUMA, M., RONACHER, L., LIU-BRYAN, R., TAKAI, S., KARIN, M., AND CORR, M. (2009). **Caspase 1-Independent Activation of Interleukin-1 β in Neutrophil-Predominant Inflammation.** Arthritis & Rheumatism (60), 3642-3650.

H

- HALLE, A., HORNING, V., PETZOLD, G.C., STEWART, C.R., MONKS, B.G., REINHECKEL, T., FITZGERALD, K.A., LATZ, E., MOORE, K.J., AND GOLENBOCK, D.T. (2008). **The**

NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . Nat Immunol (9), 857-865.

HAZUDA, D.J., STRICKLER, J., KUEPPERS, F., SIMON, P.L., YOUNG, P.R. (1990). **Processing of precursor interleukin 1 β and inflammatory disease.** J Biol Chem (265), 6318-22.

HEWINSON, J., MOORE, S.F., GLOVER, C., WATTS, A.G., AND MACKENZIE, A.B. (2008). **A Key Role for Redox Signaling in Rapid P2X₇ Receptor-Induced IL-1 β Processing in Human Monocytes.** The Journal of Immunology (180), 8410-8420.

HIEMSTRA, P.S., VAN WETERING, S., STOLK, J. (1998). **Neutrophil serine proteinases in chronic obstructive pulmonary disease: effects on pulmonary epithelium.** Eur Respir J (12), 1200-1208.

HOGQUIST, K.A., NETT, M.A., UNANUE, E.R., AND CHAPLIN, D.D. (1991). **Interleukin 1 is processed and released during apoptosis.** Proc Natl Acad Sci USA. (88), 8485-8489.

HORNUNG, V., ABLASSER, A., CHARREL-DENNIS, M., BAUERNFEIND, F., HORVATH, G., CAFFREY, D.R., LATZ, E., AND FITZGERALS, K.A. (2009). **AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1 activating inflammasome with ASC.** Nature 458 (7237), 514-518.

HORNUNG, V., BAUERNFEIND, F., HALLE, A., SAMSTAD, E.O., KONO, H., ROCK, K.L., FITZGERALD, K.A., LATZ, E. (2008). **Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization.** Nat Immunol (9), 847-856.

I

INABA, K., INABA, M., ROMANI, N., AYA, H., DEGUCHI, M., IKEHARA, S., MURAMATSU, S., STEINMAN, R.M. (1992). **Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor.** J Exp Med (176), 1693-702.

IRMLER, M., HERTIG, S., MACDONALD, H.R., SADOUL, R., BECHERER, J.D., PROUDFOOT, A., SOLARI, R., TSCHOPP, J. (1995). **Granzyme A is an interleukin 1 β -converting enzyme.** J Exp Med (181), 1917-1922.

K

KANNEGANTI, T.D., LAMKANFI, M., KIM, Y.G., CHEN, G., PARK, J.H., FRANCHI, L., VANDENABEELE, P., NÚÑEZ, G. (2007). **Pannexin-1-Mediated Recognition of Bacterial Molecules Activates the Cryopyrin Inflammasome Independent of Toll-like Receptor Signaling.** Immunity (26), 433-443.

KAWAI, T., AKIRA, S. (2007). **TLR signaling.** Semin Immunol. (19), 24-32.

KNOBLER, R., BARR., M.L., COURIEL, D.R., FERRARA, J.L.M., FRENCH, L.E., JAKSCH, P., REINISCH, W., ROOK, A.H., SCHWARZ, T. AND GREINIX, H. (2009). **Extracorporeal photopheresis: Past, present, and future.** J Am Acad Dermatol. (61), 652-65.

L

LALIBERTE, R.E., EGGLE, J., AND GABEL, C.A. (1999). **ATP Treatment of Human Monocytes Promotes Caspase-1 Maturation and Externalization.** J Biol. Chem. (274), 36944-36951.

LAND, W.G. (2010). **Innate Alloimmunity and Transplant Tolerance.** *Transplantationsmedizin* (22), 189-213.

LE FEUVRE, R.A., BROUGH, D., IWAKURA, Y., TAKEDA, K., AND ROTHWELL, N.J. (2002). **Priming of Macrophages with Lipopolysaccharide Potentiates P2X7-mediated Cell Death via a Caspase-1-dependent Mechanism, Independently of Cytokine Production.** J Biological Chemistry (277), 3210-3218.

LERNER, A.B., DENTON, C.R., FITZPATRICK, T.B. (1953). **Clinical and experimental studies with 8-MOP in vitiligo.** J Invest Derm (20), 299-314.

LUTZ, M.B., KUKUTSCH, N., OGILVIE, A.L., ROSSNER, S., KOCH, F., ROMANI, N., SCHULER, G. (1999). **An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow.** J Immunol Methods (223), 77-92.

M

MAEDA, A., SCHWARZ, A., KERNEBECK, K., GROSS, N., ARAGANE, Y., PERITT, D. AND SCHWARZ, T. (2005). **Intravenous Infusion of Syngeneic Apoptotic Cells by Photopheresis Induces Antigen-Specific Regulatory T Cells.** J Immunol (174), 5968-5976.

MARIATHASAN, S., WEISS, D.S., NEWTON, K., MCBRIDE, J., O'ROURKE, K., ROOSE-GIRMA, M., LEE, W.P., WEINRAUCH, Y., MONACK, D.M., AND DIXIT, V.M. (2006). **Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP.** Nature (440), 228-232.

MARIATHASAN, S., NEWTON, K., MONACK, D.M., VUCIC, D., FRENCH, D.M., LEE, W.P., ROOSE-GIRMA, M., ERICKSON, S., AND DIXIT, V.M. (2004). **Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf.** Nature (430), 213-218.

MARKS, D.I., ROCKMAN, S.P., OZIEMSKI, M.A., AND FOX, R.M. (1990). **Mechanisms of Lymphocytotoxicity Induced by Extracorporeal Photochemotherapy for Cutaneous T cell Lymphoma.** J Clin Invest (86), 2080-2085.

- MARSHALL, S.R. (2006). **Technology Insight: ECP for the treatment of GvHD- can we offer selective immune control without generalized immunosuppression?** *Nature Clinical Practice Oncology* (6), 302-14.
- MARTINON, F., TSCHOPP, J. (2007). **Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation.** *Cell death and differentiation* (14), 10-22.
- MARTINON, F., BURNS, K., TSCHOPP, J. (2002). **The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro-IL-1 beta.** *Molecular cell* (10), 417-426.
- MATSUKAWA, A., AND YOSHINAGA, M. (1998). **Sequential generation of cytokines during the initiative phase of inflammation, with reference to neutrophils.** *Inflam Res* (47), 137-144.
- MATSUSHIMA, K., TAGUCHI, M., KOVACS, E.J., YOUNG, H.A., OPPENHEIM, J.J. (1986). **Intracellular localization of human monocyte associated interleukin 1 (IL 1) activity and release of biologically active IL 1 from monocytes by trypsin and plasmin.** *J Immunol* (136), 2883-91.
- MATZINGER, P. (2007). **Friendly and dangerous signals: is the tissue in control?** *Nat Immunol.* (8), 11-3.
- MEHTA, V.B., HART, J., AND WEWERS, M.D. (2001). **ATP-stimulated Release of Interleukin (IL)-1 β and IL-18 Requires Priming by Lipopolysaccharide and Is Independent of Caspase-1 Cleavage.** *J Biological Chemistry* (276), 3820-3826.
- MIZUTANI, H., SCHLECHTER, N., LAZARUS, G., BLACK, R.A., KUPPER, T.S. (1991). **Rapid and specific conversion of precursor interleukin 1 β (IL-1 β) to an active IL-1 species by human mast cell chymase.** *J Exp Med* (174), 821-5.
- MOSMANN, T.R. & COFFMAN, R.L. (1989). **TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion leads to different functional properties.** *Annu Rev Immunol* (7), 145-173.

N

- NETEA, M.G., SIMON, A., VAN DE VEERDONK, F., KULLBERG, B.-J., VAN DER MEER, J.W.M., JOOSTEN, L.A.B. (2010). **IL-1 β Processing in Host Defense: Beyond the Inflammasomes.** *PLOS Pathogens* 6 (2): e1000661.

P

- PELEGRIN, P. & SUPRENANT, A. (2006). **Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor.** *EMBO J.* (25), 5071-5082.
- PERREGAUX, D.G AND GABEL, C.A. (1998). **Post-Translational Processing of Murine IL-1: Evidence that ATP-Induced Release of IL-1 α and IL-1 β Occurs via a Similar Mechanism.** *Journal of Immunology* (160), 2469-2477.

- PFEIFFER, Z.A., GUERRA, A.N., HILL, L.M., GAVALA, M.L., PRABHU, U., AGA, M., HALL, D.J., BERTICS, P.J. (2007). **Nucleotide receptor signaling in murine macrophages is linked to reactive oxygen species generation.** Free Radic. Biol. Med. (42), 1506-1516.
- PHAM, C.T.N. (2006). **Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation.** Nat Rev Immunol (6), 541-550.
- POYET, J.L., SRINIVASULA, S.M., TNANI, M., RAZMARA, M., FERNANDES-ALNEMRI, T., AND ALNEMRI, E.S. (2001). **Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1.** J Biol Chem (276), 28309-28313.
- PRANTNER, D., DARVILLE, T., SIKES, J.D., ANDREWS, C.W.J., BRADE, H., RANK, R.G., AND NAGARAJAN, U.M. (2009). **Critical Role for Interleukin-1 β (IL-1 β) during *Chlamydia muridarum* Genital Infection and Bacterial Replication-Independent Secretion of IL-1 β in Mouse Macrophages.** Infection and Immunity (77), 5334-5346.

Q

- QU, Y., FRANCHI, L., NUNEZ, G., AND DUBYAK, G.R. (2007). **Nonclassical IL-1 β Secretion Stimulated by P2X7 Receptors Is Dependent on Inflammasome Activation and Correlated with Exosome Release in Murine Macrophages.** J Immunol (179), 1913-1925.

R

- RAO, V., SAUNES, M., JØRSTAD, S., & MOEN, T. (2008). **In Vitro Experiments Demonstrate that Monocytes and Dendritic Cells are Rendered Apoptotic by Extracorporeal Photochemotherapy, but Exhibit Unaffected Surviving and Maturing Capacity after 30 Gy Gamma Irradiation.** Scandinavian Journal of Immunology (68), 645-651.
- ROBACHE-GALLEA, S., MORAND, V., BRUNEAU, J.M., SCHOOT, B., TAGAT, E., REALO, E., CHOUAIB, S., AND ROMAN-ROMAN, S. (1995). **In vitro Processing of Human Tumor Necrosis Factor- α .** J. Biol. Chem. (270), 23688-23692.
- RUBARTELLI, A., GATTORNO, M., NETEA, M.G., AND DINARELLO, C.A. (2011). **Interplay between redox status and inflammasome activation.** Trends in Immunology (32), 559-566.

S

- SANZ, J.M. AND DI VIRGILIO, F. (2000). **Kinetics and Mechanism of ATP-Dependent IL-1 β Release from Microglial Cells.** J Immunol (164), 4893-4898.

- SASAKI, H., SATO, T., YAMAUCHI, N., OKAMOTO, T., KOBAYASHI, D., IYAMA, S., KATO, J., MATSUNAGA, T., TAKIMOTO, T., KOGAWA, K., WATANABE, N., NIITSU, Y. (2002). **Induction of heat shock protein 47 synthesis by TGF-beta and IL-1 beta via enhancement of the heat shock element binding activity of heat shock transcription factor 1.** J Immunol (168), 5178-5183.
- SAVILL, J., DRANSFIELD, I., GREGORY, C. AND HASLETT, C. (2002). **A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses.** Nature Rev Immunol (2), 965-975.
- SCARISBRICK, J. (2009). **Extracorporeal photopheresis: what is it and when should it be used?** Clinical and Experimental Dermatology (34), 757-760.
- SCHNURR, M., GALAMBOS, P., SCHOLZ, C., DAUER, M., KRUG, A., HARTMANN, G., EIGLER, A., AND ENDRES, S. (2002). **Dendritische Zellen: Träger tumorgerichteter Immuntherapie.** Dtsch Arztebl (99), 2408-2416.
- SCHONBECK, U., MACH, F., LIBBY, P. (1998). **Generation of biologically active IL-1 β by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 β processing.** J Immunol (161), 3340-6.
- SCHWARZ, T. (2005), **UV-induced regulatory T cells.** JDDG (3), 504-510.
- SHORTMAN, K. & LIU, Y.-J. (2002). **Mouse and human dendritic cell subtypes.** Nat Rev Immunol (2), 151-161.
- SINGER, I.I., SCOTT, S., HALL, G.L., LIMJUCO, G., CHIN, J., AND SCHMIDT, J.A. (1988). **Interleukin 1 β is localized in the cytoplasmic ground substance but is largely absent from the Golgi apparatus and plasma membranes of stimulated human monocytes.** J. Exp. Med. (167), 389-407.
- SKELDON, A AND SALEH, M. (2011). **The inflammasomes: molecular effectors of host resistance against bacterial, viral, parasitic, and fungal infections.** Front. Microbio. 2:15.doi:10.3389/fmicb.2011.00015.
- SOLLE, M., LABASI, J., PERREGAUX, D.G., STAM, E., PETRUSHOVA, N., KOLLER, B.H., GRIFFITHS, R.J., AND GABEL, C.A. (2001). **Altered Cytokine Production in Mice Lacking P2X₇ Receptors.** Journal of Biological Chemistry (276), 125-132.
- SRINIVASULA, S.M., POYET, J.L., RAZMARA, M., DATTA, P., ZHANG, Z., AND ALNEMRI, E.S. (2002). **The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1.** J Biol Chem (277), 21119-21122.
- STANLEY, E.R., CHEN, D.M. & LIN, H.S. (1978). **Induction of macrophage production and proliferation by a purified colony stimulating factor.** Nature (274), 168-170.
- STEHLIK, C. (2009). **Multiple Interleukin-1 β -Converting Enzymes Contribute to Inflammatory Arthritis.** Arthritis & Rheumatism (60), 3524-3530.
- STEINMAN, R.M., WITMER-PACK, M., AND INABA, K. (1993). **Dendritic cells: antigen presentation, accessory function and clinical relevance.** Adv Exp Med Biol. (329), 1-9.

STEINMAN, R.M. & COHN, Z.A. (1973). **Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution.** J Exp Med (137), 1142-1162.

STEPHEN, T.L., HARMS, F., FABRI, M., FLENNER, E., BESSLER, M., HAFKE, H., MEEMBOOR, S., KALKA, C., KALKA-MOLL, W. (2009). **In vitro generation of murine myeloid dendritic cells from CD34-positive precursors.** Cell Biology International (33), 778-784.

T

TAMBUR, A.R., ORTEGEL, J.W., MORALES, A., KLINGEMANN, H., GEBEL, H.M., AND THARP, M.D. (2000). **Extracorporeal Photopheresis Induces Lymphocyte but Not Monocyte Apoptosis.** Transplantation Proceedings (32), 747-748.

THANNICKAL, V.J. & FANBURG, B.L. (2000). **Reactive oxygen species in cell signaling.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol (279), 1005-1028.

TRENDELENBURG, G. (2008). **The inflammasome: central interface between stress signals and inflammatory reaction in neurodegenerative diseases?!** Neuroforum (2), 190-198.

U

ULLRICH, SE. (2005). **Mechanisms underlying UV-induced immune suppression.** Mutat Res. (571), 185-205.

V

VOSS, C.Y., FRY, T.J., COPPES, M.J., AND BLAJCHMAN, M.A. (2010). **Extending the Horizon for Cell-Based Immunotherapy by Understanding the Mechanisms of Action of Photopheresis.** Transfusion Medicine Reviews (24), 22-32.

W

WEAVER, C.T., HATTON, R.D., MANGAN, P.R., AND HARRINGTON, L.E. (2007). **IL-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineages.** Annu. Rev. Immunol. (25), 821-52.

X

XING, Y.X., LI, P., MIAO, Y.X., DU, W., WANG, C.B. (2008). **Involvement of ROS/ASMase/JNK signaling pathway in inhibiting UVA-induced**

apoptosis of HaCaT cells by polypeptide from Chlamys farreri. Free Radic Res (42), 12-19.

Z

ZHANG, X., GONCALVES, R. & MOSSER, D.M. (2008). **The Isolation and Characterization of Murine Macrophages.** Curr Protoc Immunol (83):14.1.1-14.1.14.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Das Verzeichnis enthält keine gängigen Abkürzungen (z.B., o.g., u.s.w., u.a.).

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AIM2	Absent in melanoma 2
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen präsentierende Zellen
Aqua bidest.	Doppelt destilliertes Wasser
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ATP	Adenosintriphosphat
BMDC	Bone-marrow derived dendritic cells
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CARD	Caspase recruitment domain
Ca ²⁺	Calciumion
CD	Nomenklatur für Oberflächenantigene (cluster of differentiation)
DAMP	Danger-associated molecular pattern
DZ	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (desoxyribonucleic acid)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay

FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoresceinthiocyanat
FSC	Vorwärtsstreuung (<i>forward scatter</i>)
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinsulfonat
HCl	Salzsäure
hIL-1 β	Humanes IL-1 β
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KO	Knock-Out
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucine rich repeat
Mal	MyD88 adaptor-like
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Mg ²⁺	Magnesium
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
mIL-1 β	Murines IL-1 β
MyD88	Myeloid differentiation factor 88

NAIP	Neuronal apoptosis inhibitory protein
NALP	NACHT-, LRR- and pyrin-domain-containing protein
NF- κ B	Nuclear Factor- κ B
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLR	Nod-like Rezeptor
NLRA	Nod-like receptor containing AD
NLRB	Nod-like receptor containing BIR
NLRC	Nod-like receptor containing CARD
NLRP	Nod-like receptor containing PYD
NLRX	Nod-like receptor containing X
NOD	Nucleotid-binding oligomerization domain
P2X7R	P2X7-Rezeptor
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PRR	Pattern recognition receptor
PYD	Pyrin domain
RNA	Ribonucleicacid
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Rounds per minute
RPMI-1640	Bezeichnung für ein spezifisches Zellmedium
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler

SSC	Seitwärtsstreuung (<i>side scatter</i>)
TEB	Tris-EDTA-BSA
TIR	Toll-/IL-1 Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor necrosis factor

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.	<i>Inflammasome: Zusammenschluss verschiedener Proteine (Bauernfeind et al., 2011).</i> ...7
Abb. 2.	<i>Inflammasom-Aktivierung und IL-1β Freisetzung dargestellt anhand des NLRP3-Inflammasoms (Bauernfeind et al., 2011).</i>9
Abb. 3.	<i>Inflammasom-Aktivierung und IL-1β Freisetzung exemplarisch dargestellt anhand des AIM2-Inflammasoms (Bauernfeind et al., 2011).</i>11
Abb. 4.	<i>Illustration der Extrakorporalen Photochemotherapy (Marshall, 2006).</i>18
Abb. 5.	<i>Schematische Darstellung der bis heute postulierten Hypothesen (Marshall, 2006).</i>19
Abb. 6.	<i>Schematische Darstellung der zeitlichen Abfolge des Versuchsaufbaus der experimentellen Photopherese.</i>34
Abb. 7.	<i>Der Einsatz von MOP in Kombination mit UVA führt über eine Zeitdauer von 24h zu einer starken Induktion von Apoptose in murinen Leukozyten.</i>41
Abb. 8.	<i>Der Einsatz der experimentellen Photopherese führt in murinen Leukozyten zur Induktion von Apoptose.</i>43
Abb. 9.	<i>Schematische Darstellung der zeitlichen Abfolge des Versuchsaufbaus in Anwesenheit von LPS.</i>44
Abb. 10.	<i>Durchflusszytometrische Analyse von Peritoneal-Makrophagen aus einer C57BL6/N WildtypMaus.</i>45
Abb. 11.	<i>Peritoneal-Makrophagen setzen in Anwesenheit von Methoxypsoralen (MOP) und UVA-Strahlung erhöhte Mengen an IL-1β frei.</i>46
Abb. 12.	<i>Durchflusszytometrische Analyse der Makrophagen-Expansion aus einer C57BL6/N Knochenmark-Kultur die mit 30% L929-Überstand versetzt wurde.</i>47
Abb. 13.	<i>UVA-Licht und MOP fördern die IL-1β Freisetzung nach "LPS-Priming" in aus dem Knochenmark mit L929-Überstand generierten Makrophagen.</i>48
Abb. 14.	<i>Durchflusszytometrische Analyse der DZ-Expansion aus einer C57BL6/N Knochenmark-Kultur.</i>49
Abb. 15.	<i>UVA-Licht und MOP fördern die IL-1β Freisetzung nach "LPS-Priming" mit 250pg/ml.</i>50
Abb. 16.	<i>UVA-Licht und MOP fördern die IL-1β Freisetzung nach "LPS-Priming" mit 5ng/ml.</i> 51
Abb. 17.	<i>Western-Blot: UVA Licht und MOP geförderte Aktivierung der Caspase-1 mit einhergehender Freisetzung der aktiven IL-1β Form in C57BL6/N Wildtyp-Mäusen.</i> ...52
Abb. 18.	<i>Schematische Darstellung der zeitlichen Abfolge des Versuchsaufbaus beim Einsatz der Apyrase.</i>53
Abb. 19.	<i>Der Einsatz der Apyrase (10U/ml) führt zu einer verstärkten IL-1β Freisetzung nach experimenteller Photopherese.</i>54

Abb. 20.	<i>Schematische Darstellung der zeitlichen Abfolge des Versuchsaufbaus in Abwesenheit... von LPS</i>	56
Abb. 21.	<i>LPS-unabhängige IL-1β Freisetzung hervorgerufen durch UVA-Licht und a) 400-, b) ... 800- und c) 1600ng/ml MOP.</i>	57
Abb. 22.	<i>Durchflusszytometrische Analyse der Knochenmarks-Kulturen zur Differenzierung von... DZ aus den einzelnen Knockout-Maus Linien.</i>	59
Abb. 23.	<i>Positiv-Kontrolle von C57BL6/N sowie AIM2-KO Maus zeigen im Gegensatz zu ASC-... und Caspase-1-KO Maus hohe mature-IL-1β Freisetzung.</i>	60
Abb. 24.	<i>Positiv-Kontrolle der Caspase-1-KO Maus zeigt im Gegensatz zu ASC-, AIM2-KO Maus und C57BL6/N Maus eine hohe pro-IL-1β Freisetzung.</i>	61
Abb. 25.	<i>Hohe Spezifität des murinen IL-1β ELISA für die mature Form.</i>	62
Abb. 26.	<i>UVA-Licht und MOP fördern die mature-IL-1β Freisetzung nach „LPS-Priming“ mit... 250pg bzw. 5ng/ml in (a) AIM2-, (b) ASC-, (c) Caspase-1-KO und (d) WT-Maus.</i>	63
Abb. 27.	<i>Western-Blot: UVA Licht und MOP geförderte Freisetzung der aktiven IL-1β Form in... ASC-KO Mäusen ohne Aktivierung der Caspase-1.</i>	65
Abb. 28.	<i>Western-Blot: UVA Licht und MOP geförderte Freisetzung der aktiven IL-1β Form in... Caspase-1-KO Mäusen ohne Aktivierung der Caspase-1.</i>	66
Abb. 29.	<i>Schematische Darstellung der zeitlichen Abfolge des Versuchsaufbaus in Anwesenheit... von LPS.</i>	67
Abb. 30.	<i>Humane mononukleäre Leukozyten setzen in Anwesenheit von MOP und UVA-Strahlung erhöhte Mengen an mature-IL-1β frei.</i>	68
Abb. 31.	<i>Höhere Freisetzung der mature-IL-1β Form im Vergleich zur pro-Form in humanen.... mononukleären Leukozyten in Anwesenheit von MOP und UVA.</i>	69
Abb. 32.	<i>Hohe Spezifität des humanen IL-1β ELISA für die mature Form.</i>	70
Abb. 33.	<i>Western-Blot: UVA-Licht und MOP geförderte Aktivierung der Caspase-1 mit..... einhergehender Freisetzung der aktiven IL-1β Form.</i>	71
Abb. 34.	<i>Schematische Darstellung der zeitlichen Abfolge des Versuchsaufbaus beim Einsatz des Caspase-1 Inhibitors z-YVAD-FMK.</i>	72
Abb. 35.	<i>Inhibition der IL-18 Freisetzung in humanen mononukleären Leukozyten durch Einsatz... des Caspase-1 Inhibitors z-YVAD-FMK.</i>	73
Abb. 36.	<i>Die ECP fördert die mature-IL-1β Freisetzung in Leukapheresat-Proben von Patienten.</i>	74
Abb. 37.	<i>Die ECP fördert die Freisetzung von pro-IL-1β in Leukapheresat-Proben von Patienten jedoch in geringerer Menge als die mature-IL-1β Form.</i>	75
Abb. 38.	<i>Die ECP fördert die IL-18 Freisetzung in Leukapheresat-Proben von Patienten.</i>	75
Abb. 39.	<i>Die ECP fördert die mature-IL-1β Freisetzung im peripheren Blut von Apherese- Patienten.</i>	76

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.	<i>Inflammasome und deren Aktivierungssignale (nach Bauernfeind et al., 2011).</i>	8
Tab. 2.	<i>Verwendete Geräte und Zubehör</i>	22
Tab. 3.	<i>Verbrauchsmaterial</i>	23
Tab. 4.	<i>Verwendete Antikörper und Farbstoffe für FACS-Messungen</i>	24
Tab. 5.	<i>Compensation Beads für die FACS-Kompensation sowie Magnet Beads</i>	25
Tab. 6.	<i>Verwendete Chemikalien</i>	25
Tab. 7.	<i>Weitere Reagenzien</i>	27
Tab. 8.	<i>Zytokine zur Generierung von DZ aus dem Knochenmark von Mäusen</i>	27

8.4 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gregor Bein sowie Herrn Prof Dr. Holger Hackstein für die Überlassung des interessanten Themas und der Möglichkeit dieses in Ihrem Institut durchzuführen bedanken.

Großer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Hackstein für die umfassende Betreuung, der interessanten Gespräche und der kollegialen Art die, zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Michael U. Martin für seine anregenden Ideen, der steten Gesprächsbereitschaft sowie der Vertretung der Arbeit am Fachbereich Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Ein weiterer Dank gilt der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Veit Hornung aus dem Universitätsklinikum Bonn für die fachlichen Anregungen, der Bereitstellung seiner Räumlichkeiten sowie diverser Knockout-Mäusen. Ein großer Dank gilt dabei Herrn Christopher Jakobs für seine kollegiale Zusammenarbeit im Laufe der Kooperation. Besten Dank!

Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Brüne aus der Pathobiochemie in Frankfurt am Main für die Bereitstellung der Caspase-1 KO Mäuse bedanken.

Namentlich möchte ich mich bei Frau Dr. Natalia Soriano-Sarabia für die Unterstützung, Ideen und die schöne Zeit mit Ihr bedanken. Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Gaby Haley, Frau Angelika Nockher, Frau Dr. Nelli Baal, Frau Sabine Kranz und Herrn Andreas Wachtendorf für die schöne Zeit in der Arbeitsgruppe, den Hilfestellungen und freundschaftliche Beziehung herzlichst bedanken.

Bedanken möchte ich mich noch bei allen Mitarbeitern im „Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin“ von dem Blutspende-Team bis hin zu der Routine.

Mein herzlichster Dank gebührt meiner Familie, meiner Ehefrau und meiner kleinen Tochter die mich im Laufe meiner Promotion sehr viel unterstützt haben. Ich danke Euch für Euer Vertrauen!

Danke!

8.5 Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt, und die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten habe.

Diese Arbeit hat noch keiner anderen Prüfungskommission zur Begutachtung vorgelegen.

Giessen, den