

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität  
Institut für Physiologie, Biochemie und Hygiene der Tiere  
Abteilung Anatomie und Physiologie  
&  
Arbeitsgruppe Immunbiologie und Angewandte Immunologie

---

**Durchflußzytometrische Detektion von Adrenocorticotropem  
Hormon in humanen Leukozytenpopulationen unter  
leistungsphysiologischen Kulturbedingungen**

Inaugural - Dissertation  
zur  
Erlangung des Grades

Doktor der Ernährungs- und Haushaltswissenschaft  
(Dr.oec.troph.)

der  
Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
zu Bonn

vorgelegt am 17. September 2002

von  
Karl Peter Linscheid  
aus Bonn

Referent: Priv.-Doz. Dr. Roland Goerlich

Koreferent: Prof. Dr. Heinrich Enbergs

Vorsitzende des  
Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Heide Schnabl

Tag der mündlichen Prüfung: 15. November 2002

Gedruckt bei: Druckerei Eberwein, Bonn-Bad Godesberg

## Kurzfassung

In Analogie zur systemischen Streßreaktion beschreibt die zelluläre Leistungsphysiologie Anpassungsmechanismen gegenüber belastenden Umweltfaktoren im mikroskopischen Maßstab. Neuropeptide aus Proopiomelanocortin, die in lokalen Leukozyten-Netzwerken synthetisiert werden und Signale übermitteln, bilden die Achse Hypothalamus-Hypophyse-Nebenniere innerhalb dieser zellulären Mikromilieus ab. In den hier beschriebenen Untersuchungen wurden kommerziell erhältliche monoklonale Antikörper und sekundäre Immunfluoreszenz für die spezifische durchflußzytometrische Detektion von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) in stimulierten humanen Leukozyten eingesetzt. Die Einflüsse einschlägiger Induktoren auf die Höhe der ACTH-Expression konnten mit Hilfe der mittleren relativen Fluoreszenzintensität bewertet werden. Durchflußzytometrische Charakteristika der zellulären Mikromorphologie bestätigten in Kombination mit einer Immunphänotypisierung, daß humane Lymphozyten und Monozyten des peripheren Blutes in Anpassungsreaktionen innerhalb leistungsphysiologischer Zellkulturmodelle eingebunden sind.

Aus den Untersuchungen ergaben sich Hinweise auf Optimierungsstrategien für die Probengewinnung, die Zellkultur und die leistungsphysiologische Leukozytenstimulation. Die Methodik kann in Richtung auf quantitative Studien mit direkter Immunfluoreszenz fortentwickelt werden und grundlegende Beiträge zum Verständnis des Zusammenspiels von Hormonen, Cytokinen und anderen Signalmolekülen in der Regulation funktioneller zellbiologischer Prozesse, wie Proliferation, Apoptose, zellulärer und humoraler Abwehr, leisten. Anwendungsmöglichkeiten sind *in-vitro*- und *ex-vivo*-Studien zu protektiven Wirkungen bzw. dem gesundheitsbezogenen Risikopotential von bioaktiven Lebensmittelinhaltsstoffen und Supplementen sowie immuntoxikologische Untersuchungen von Kontaminanten und Rückständen.

## Abstract

Modelling main aspects of the systemic stress reaction, cellular performance physiology describes coping with environmental challenge in microscale. Pro-opiomelanocortin-derived neuropeptides, synthesized and recognized in local leukocyte networks, project the hypothalamo-pituitary-adrenal axis into cellular micro-environments. In the present study, commercially available monoclonal antibodies and secondary immunofluorescence were used to flow cytometrically detect adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in stimulated human leukocytes. The effects of inducers, previously described in scientific literature, on the amount of ACTH synthesized was assessed by calculating the mean fluorescence intensity. Flow cytometric characteristics of cellular micromorphology in combination with immunophenotyping proved that human lymphocytes and monocytes from peripheral blood are involved in adaptive physiological reactions.

The results also helped to propose how to optimize blood sampling, cell culture and leukocyte stimulation. Direct fluorochrome labelling of antibodies may broaden this approach towards quantification. Thus, flow cytometry may further contribute substantially to understanding the interplay mediated by hormones, cytokines and other signal molecules in functional aspects, such as proliferation, apoptosis, cellular and humoral defense. *In vitro* and *ex vivo* studies on the health effects of food constituents, the beneficial and adverse potentials of bioactive compounds in food and supplements, or immunotoxicological investigations on contaminations and toxic residues are perspectives of application of the method.

# Verzeichnis der Abkürzungen

® = Registered Trademark,  
eingetragenes Warenzeichen

% = Prozent

**+1** = N-terminale Aminosäure der  
Primärstruktur bzw. erstes für  
eine Peptidsequenz codieren-  
des Basentriplett

°C = Grad Celsius

µL = Mikroliter

**2D** = zweidimensional

**-3'** = Terminationsrichtung der  
codogenen DNA in bezug auf  
die Transkription

**5'** = Initiationsrichtung der codogenen  
DNA in bezug auf die  
Transkription

**-90 - +120** = DNA-Codon- bzw.  
Aminosäure-Position in einer  
Gen- bzw. Peptid-Sequenz

**A** = Adenin(base der DNA)

**AAPH** = 2,2'-Azobis-  
(2-amidinopropan)-  
dihydrochlorid

**Ab** = Antikörper

**ACTH** = Adrenocorticotropes Hormon,  
Corticotropin

**Ala** = Alanin

**alpha** α = anti, Ligandenspezifität  
gegen ...; α-... bzw. ...-α zur  
Differenzierung bei Cytokinen,  
Hormonen etc.

**Arg** = Arginin

**ASCII** = American Standard Code for  
Information Interchange,  
Computer-Standardzeichensatz

**Asn** = Asparagin

**Asp** = Asparaginsäure

**Asx** = Asparagin oder Asparaginsäure

**AVP** = Arginin-Vasopressin

**B-** in B-Lymphozyten = im  
Knochenmark (Bone Marrow)  
reifende Lymphozyten

**BfA** = Brefeldin A

**BSA** = bovines Serumalbumin,  
Rinderserumalbumin

**C** = Cytosin(base der DNA),  
Kohlenstoff

**Ca** = Calcium

**CA** = Kalifornien

**cAMP** = zyklisches  
Adenosinmonophosphat

**CD** = Cluster of Differentiation =  
systematisierte, mit  
monoklonalen Antikörpern  
bestimmbare  
Zelldifferenzierungs-Antigene

**CD...<sup>+</sup>** = positiv für CD...

**cDNA** = revers transkribierte, zur  
mRNA komplementäre DNA

**cGMP** = zyklisches  
Guanosinmonophosphat

**Cl** = Chlor, NaCl = Natriumchlorid

**CLIP** = Corticotropin-Like Intermediate  
lobe Peptide = ACTH<sub>18-39</sub>

**cm** = Zentimeter

**ConA** = Concanavalin A, Lektin aus  
Canavalia ensiformis

**-COOH** = Carboxy-Terminus eines  
Peptids

**CPU** = Central Processing Unit,  
Computer-Zentraleinheit

**Cr** = Chrom, <sup>51</sup>Cr = radioaktives Isotop,  
Radiochrom

**CRH** = Corticotropin-Releasing-  
Hormon, Corticoliberin = CRF  
(Corticotropin Releasing Factor)

**D.5B** = DPBS mit 0,5 % FBS

**DNA** = Desoxyribonucleic Acid,  
Desoxyribonucleinsäure

**DNP** = Dinitrophenol

**DPBS** = Dulbecco's Phosphate  
Buffered Saline, Dulbeccos  
phosphatgepufferte Salzlösung

**EBV** = Epstein-Barr-Virus

**EDTA** Ethylendiamintetraacetat

**et al.** = et alii, und Mitarbeiter

**F(ab)<sub>2</sub>** = Dimer zweier  
antigenbindender Anteile eines  
Immunglobulins, variable  
Domänen

**FACS** = Fluorescence Activated Cell  
Sorter, Markenname der  
Becton-Dickinson-  
Durchflußzytometer

**FBS** = fetales bovines Serum

**FI** = relative Fluoreszenzintensität

**FITC** = Fluorescein-isothiocyanat

**FL**-(1, 2 ... n) = Fluoreszenz (1, 2 ... n)

**FSC** = Foreward Scatter,  
Vorwärtsstreulicht

**G** = Guanin(base der DNA)

**Gln** = Glutamin

**Glu** = Glutaminsäure

**Glx** = Glutamin oder Glutaminsäure

**Gly** = Glycin

**h** = Stunde(n), ...h= ...stündig

**H** = Wasserstoff, HCl = Hydrochlorid,  
in wässriger Lösung: Salzsäure

**His** = Histidin

**HIV** = Human Immunodeficiency Virus,  
humanes Immundefekt-Virus

**HPA** = (Achse) Hypothalamus-  
Hypophyse-Nebenniere

**HSP** = Hitzeschockprotein(e)

**html** = Hypertext Markup Language,  
Internet-Formularsprache

**http** = Hypertext Transmission  
Protocol, Internet-  
Übertragungsprotokoll

**I** = Iod, <sup>125</sup>I = Radioisotop, Radioiod

**IFN** = Interferon

**Ig** = Immunglobulin: IgA, IgD usw.

**IL**- = Interleukin: IL-1, IL-2 usw.

**Ile** = Isoleucin

**iniect.** = (Aqua ad) iniectabilia,  
(Wasser für) Injektionszwecke

**iNOS** = induzierbare NO-Synthase

**K** = Kanal, Intensitätsklasse der  
Strahlungsstärke; Kalium, KI =  
Kaliumiodid

**kappa** κ = Kappa-Kette des  
Immunglobulin-Moleküls

**L** = Liter

**lambda** λ = Wellenlänge  
elektromagnetischer Strahlung

**Leu** = Leucin

**LPH** = lipotropes Hormon, Lipotropin

**LPS** = Lipopolysaccharid

**Lys** = Lysin

**m** = Meter

**M** = Mol pro Liter, mol/L

**mAb** = monoklonale(r) Antikörper

**MB** = Megabyte

**Met** = Methionin

**MFI** = mittlere relative  
Fluoreszenzintensität

**mg** = Milligramm

**min** = Minute(n), ...min = minütig,  
min<sup>-1</sup> = pro Minute

**mL** = Milliliter

**mm** = Millimeter

**mM** = Millimol pro Liter, mmol/L

**Mon.** = Monensin

**MSH** = Melanozytenstimulierendes  
Hormon

**MTP** Mikroiterplatte

**MTT** = 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-  
2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid

**mu** = murin, von der Maus

**my** μ... = mikro... = 10<sup>-6</sup> (μg, μL, μM)

**N** = Stickstoff

**Na** = Natrium, NaI = Natriumiodid

**NaN<sub>3</sub>** = Natriumazid

**NDV** = Newcastle Disease Virus

**NH<sub>2</sub>-** = Aminoterminus eines Peptids

**nm** = Nanometer

**NO** = Stickstoffoxid

**O** = Sauerstoff

**OD** = optische Dichte  
**OS** = Operating System, Computer-Betriebssystem  
**p.a.** = pro alysi, zur Analyse  
**PBMC** = Peripheral Blood Mononuclear Cells = mononukleäre Leukozyten des peripheren Blutes  
**PBS** = Phosphate Buffered Saline, phosphatgepufferte Salzlösung  
**PC** = Personal Computer  
**PE** = Phycoerythrin  
**PFC** = plaque forming cell (Test)  
**pH** = pondus Hydrogenii, pH-Wert = negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration  
**Phe** = Phenylalanin  
**PMT** = Photomultiplier Tubes, Detektoren für die schwachen Signale aus dem Seitwärtsstreulicht  
**POMC** = Proopimelanocortin  
**Pro** = Prolin  
**Prod.-Nr.** = Produktnummer  
**R** = Rezeptor  
**R20B** = RPMI-1640-Medium mit 20 % FBS  
**RAM** = Random Access Memory, Computer-Arbeitsspeicher

**rho**  $\rho$  = spezifische Dichte  
**RPMI** = Roswell Park Memorial Institute (-1640 Zellkulturmedium)  
**RT** = Raumtemperatur  
**s** = Sekunde,  $s^{-1}$  = pro Sekunde  
**S** = Schwefel,  $^{35}\text{S}$  = radioaktives Isotop, Radioschwefel  
**Ser** = Serin  
**SRBC** = sheep red blood cells, Schafserythrozyten  
**SSC** = Side Scatter, Seitwärtsstreulicht  
**T** = Thymin(base der DNA)  
**T-** = T-Lymphozyten = im Thymus reifende Lymphozyten  
**T<sub>H1</sub>** = T-Helferzelle(n) vom Typ 1: Leicytokine IL-2, IFN- $\gamma$   
**T<sub>H2</sub>** = T-Helferzelle(n) vom Typ 2: Leicytokine IL-4, -5, -6, -10  
**Thr** = Threonin  
**™** = Trade Mark, Warenzeichen  
**TNF** = Tumornekrosefaktor  
**Trp** = Tryptophan  
**Tyr** = Tyrosin  
**UK** = Vereinigtes Königreich  
**USA** = Vereinigte Staaten von Amerika  
**Val** = Valin  
**w/v** = weight per volume, Masse pro Volumen  
**ZNS** = Zentrales Nervensystem

## Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1: Leistungsphysiologische Indikatoren.....	14
Tab. 2: Aminosäuresequenz von POMC und seine Peptid-Produkte.....	16
Tab. 3: Opiomelanocortine.....	18
Tab. 4: Materialien für die Zellkultur mit mononukleären Leukozyten.....	32
Tab. 5: Herstellung von 1-mL-Proben aus Kulturmedien mit doppeltem Gehalt an Stimulatoren und aus Zellsuspension mit doppeltem Serumgehalt und doppelter Zelldichte.....	37
Tab. 6: Materialien für die Zellkultur mit komplettem Blutspendematernal.....	40
Tab. 7: Herstellung von 1-mL-Proben aus Kulturmedien ohne bzw. mit Stimulatoren und Vollblut.....	41
Tab. 8: Materialien für die Markierung und Detektion von ACTH und Immunphänotypen.....	42
Tab. 9: ACTH-Expression in unstimulierten sowie mit CRH, LPS und NaCl stimulierten Leukozyten, durchschnittliche [n = 6] mittlere relative Fluoreszenzintensität aus der Durchflußzytometrie.....	53
Tab. 10: Monensin- und Brefeldin-A-Konzentrationen und Inkubationszeiten zur Sekretionsinhibition vor der durchflußzytometrischen Analyse.....	59
Tab. 11: Aminosäuresequenzen von ACTH aus verschiedenen Spezies und einige korrespondierende DNA-Teilsequenzen aus dem POMC-Gen.....	66

## Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1:	Schema ausgewählter Hauptkomponenten eines Durchflußzytometers ....	26
Abb. 2:	Möglichkeiten der graphischen Darstellung durchflußzytometrischer Daten.....	30
Abb. 3:	Regionen und Gates in der Durchflußzytometrie .....	31
Abb. 4:	Dexamethason - Inhibitor der ACTH-Synthese .....	37
Abb. 5:	Strukturen von MTT und seinem Metaboliten Formazan .....	38
Abb. 6:	Silikonisierte Glasröhrchen aufgestellt in Plastikstopfen in einer 24-Well-Zellkulturplatte .....	39
Abb. 7:	Inhibitoren des Golgi-Apparates, eingesetzt zur Hemmung der Sekretion von zellulären Exportpeptiden.....	39
Abb. 8:	Erfassung und Zuordnung der Ereignishäufigkeiten je Fluoreszenzkanal .....	47
Abb. 9:	In Fluoreszenzintensitäten transformierte Häufigkeitswerte aus Histogrammen .....	48
Abb. 10:	Zellstoffwechsel von PBMC im MTT-Test nach Kultur in hyperosmolarem Medium bzw. LPS .....	50
Abb. 11:	Durchflußzytometrische Detektion von Adrenocorticotropem Hormon in sezernierenden peripheren mononukleären Leukozyten mit Induktion durch Corticoliberin und Suppression durch Dexamethason .....	51
Abb. 12:	ACTH-Expression in 18 h mit CRH, LPS, und NaCl stimulierten, sezernierenden peripheren mononukleären Leukozyten .....	54
Abb. 13:	ACTH-Expression in 5 h mit CRH, LPS, und NaCl stimulierten mononukleären Leukozyten aus Vollblut .....	55

## Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung .....	3
Abstract .....	4
Verzeichnis der Abkürzungen .....	5
Verzeichnis der Tabellen.....	8
Verzeichnis der Abbildungen .....	9
Inhaltsverzeichnis.....	10
1 Einleitung .....	12
1.1 Problemstellung und wissenschaftliche Zielsetzung .....	12
1.2 Zelluläre Leistungsphysiologie .....	13
1.3 Adrenocorticotropes Hormon in der Achse Hypothalamus-Hypophyse- Nebenniere (HPA-Achse).....	14
1.3.1 Proopiomelanocortin (POMC) .....	15
1.3.2 Stimulation, Inhibition und Wirkung von ACTH in der HPA- Achse.....	18
1.4 Adrenocorticotropes Hormon und seine immunologischen Wirkungen in leukozytären Mikromilieus .....	20
1.5 Stimulation und Inhibition von ACTH in Leukozyten .....	22
1.6 Durchflußzytometrie und ACTH-Detektion .....	24
2 Material und Methoden .....	32
2.1 Leistungsphysiologische Zellkultursysteme .....	32
2.1.1 Zellkultur mit mononukleären Leukozyten .....	32
2.1.2 Zellkultur mit Vollblut .....	40

---

2.2	Markierung und Detektion von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) und Zelldifferenzierungsmarkern (CD) .....	42
2.2.1	Markierung von ACTH und CD .....	42
2.2.2	Durchflußzytometrische Analyse .....	45
2.3	Aufbereitung der durchflußzytometrischen Daten .....	45
2.3.1	Spezifische Auswahl und Transfer .....	45
2.3.2	Datentransformation und Bestimmung der mittleren relativen Fluoreszenzintensität .....	47
2.4	Statistische Auswertung .....	48
2.5	Bewertung der Daten als leistungsphysiologische Parameter .....	48
3	Ergebnisse .....	49
3.1	Ergebnisse der Vorversuche .....	49
3.2	Ergebnisse der Hauptversuche .....	52
4	Diskussion .....	56
4.1	Aussagefähigkeit von in-vitro-Modellen der zellulären Leistungsphysiologie .....	56
4.2	Vorversuche und Methodik .....	57
4.3	Ergebnisdiskussion .....	60
4.4	Methodisches Entwicklungspotential .....	64
4.4.1	Entwicklungsperspektiven für die Zellkultur .....	64
4.4.2	Entwicklungsperspektiven für die Durchflußzytometrie .....	66
5	Zusammenfassung .....	71
6	Literaturverzeichnis .....	74
	Dank .....	86

## **1 Einleitung**

Die Kommunikation zwischen den Zellen des Abwehrsystems verläuft über direkte Interaktionen und durch Signalübermittlung mit Hilfe von Mediatoren. Sie dient der Anpassung an Umwelteinflüsse auf den Organismus bzw. der Auseinandersetzung mit diesen zur Wahrung der körperlichen Integrität.

Erhöhte Anforderungen im Rahmen deutlich veränderter Umweltbedingungen, besonderer Stoffwechsellagen und immunologischer Herausforderungen, insbesondere Infektionen, induzieren leistungsphysiologische Anpassungsreaktionen. Die Erkenntnis, daß das Abwehrsystem eng mit dem endokrinen und dem Nervensystem verwoben ist, wird durch Forschungsergebnisse erweitert, die zeigen, daß akzessorische und immunkompetente Zellen nicht nur von Neuropeptiden beeinflußt werden, sondern diese selbst synthetisieren und sezernieren.

In der zellulären Leistungsphysiologie nimmt, wie auch in der systemischen Reaktion auf physikalische, chemische und biotische Noxen, das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) eine Schlüsselstellung ein. Zusammen mit anderen, als Streßhormone bezeichneten Mediatoren bildet es die Achse Hypothalamus-Hypophyse-Nebenniere (HPA) im Kontext leukozytärer Mikromilieus ab.

### **1.1 Problemstellung und wissenschaftliche Zielsetzung**

Zu den Interaktionen zwischen Abwehrsystem, Endokrinum und Nervensystem liegen aus Untersuchungen in den vergangenen 25 Jahren umfangreiche Erkenntnisse vor. In der Hauptsache sind grundlegende Zusammenhänge erforscht worden. Zeitlich parallel verlaufene Entwicklungen im Bereich der zellbiologischen Analytik wurden hierfür nur zum Teil ausgeschöpft, und eine Nutzung dieser Technologien zur funktionellen Bewertung von Umwelteinflüssen und Ernährungsfaktoren steht erst an ihrem Anfang.

In der ernährungsphysiologischen und ernährungsimmunologischen Forschung ist während dieses Zeitraums deutlich geworden, daß wesentliche gesundheitsbeeinflussende Wirkungen von nicht-nutritiven Lebensmittelinhaltsstoffen ausgehen, beispielsweise vom antioxidativen Potential und den immunologischen Wirkungen bestimmter Polyphenole und ihrer Metaboliten (BÖHM *et al.*, 1998, KOGA & MEYDANI, 2001). Für entsprechend zusammengesetzte, verarbeitete Lebensmittel

und Supplemente sind Nachweise der Wirksamkeit und gesundheitlichen Unbedenklichkeit gefordert (GROßKLAUS, 2000). Auch in diesem Zusammenhang soll die Immuntoxikologie Methoden entwickeln, mit deren Hilfe die subletale und gegebenenfalls die subklinische Toxizität von Stoffen und Stoffgemischen, auch solchen, die als Rückstände und Kontaminanten in Lebensmitteln vorkommen können, untersucht werden kann.

Zur Bewertung ernährungsbezogener Schutz- und Schadwirkungen wurde in den vergangenen Jahren in zunehmendem Maße die Durchflußzytometrie eingesetzt. Dabei wurden entsprechend den methodischen Fortschritten zunächst Einflüsse auf die Verteilung von Immunphänotypen untersucht, also Art, immunologische Prägung und Aktivierungszustand von Zellen des Abwehrsystems, sowie die funktionelle Kapazität, beispielsweise Phagozytoseleistung, Respiratorischer Burst und Proliferation. Später kamen mit der intrazellulären Antigendetektion Fragestellungen über die zelluläre Signalübermittlung und die Kommunikation zwischen Zellen hinzu.

Die Expression von Adrenocorticotropem Hormon in Leukozyten kann die Relevanz eines Stimulus dokumentieren und gleichzeitig Aufschluß über die leistungsphysiologische Kapazität der Zellen bzw. des lokalen Milieus im Umgang mit diesem Einfluß geben. Durchflußzytometrisch ist ACTH bisher im Rahmen der entwicklungsbiologischen Forschung in Hämozyten niederer Vertebraten detektiert worden (Kapitel 1.6, S. 24). Für humane Leukozyten waren zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit keine Veröffentlichungen verzeichnet.

Das primäre Ziel der nachfolgend dargestellten Forschungsarbeiten war daher, mit Hilfe von kommerziell verfügbaren monoklonalen Antikörpern, Immunfluoreszenz und Durchflußzytometrie ACTH in humanen Leukozyten des peripheren Blutes zu detektieren. Parallel dazu sollte untersucht werden, ob die einschlägigen Wirkungen ausgewählter Stimulatoren mit diesem System dokumentiert und bewertet werden können.

## **1.2 Zelluläre Leistungsphysiologie**

Mediatoren und Metaboliten, deren Konzentrationen sich im Rahmen der leistungsphysiologischen Reaktion spezifisch verändern, eignen sich als Indikatoren für die Stoffwechsellanpassung (Tab. 1, S. 14). Signalsubstanzen der systemischen

Streßreaktion werden von Leukozyten synthetisiert und sind in die Regulation zellulärer Anpassungsmechanismen eingebunden. Systemische und lokale Effekte und Reaktionskinetiken sind zum großen Teil ähnlich (vergl. GABRIEL *et al.*, 1992; HOFFMAN-GOETZ & PEDERSEN, 1994; BRINES *et al.*, 1996; PEDERSEN & NIEMAN, 1998).

**Tab. 1: Leistungsphysiologische Indikatoren.**

Substanzklasse	Vertreter	Wirkungsweise	Wirkungsradius
<b>1. Mediatoren</b>			
Hormone	CRH/AVP ACTH Endorphine Glucocorticoide	para- und endokrin	systemisch
Cytokine	Interleukine Interferone TNF	auto- und parakrin	lokal und systemisch
andere	Stickstoffmonoxid	auto- und parakrin	lokal (und systemisch?)
<b>2. Intrazelluläre Produkte</b>			
Hitzeschockproteine	HSP60 HSP70 HSP90	intrazellulär	intrazellulär

Abkürzungen: ACTH = Adrenocorticotropes Hormon, AVP = Arginin-Vasopressin; CRH = Corticotropin-Releasing-Hormon; HSP = Hitzeschockprotein; TNF = Tumornekrosefaktor

Regulatorische Neuropeptide sind im gesamten Tierreich verbreitet, und die Struktur ihrer Gene ist hochkonserviert. Dies weist auf die große Bedeutung der leistungsphysiologischen Anpassungsreaktion hin, die als stammesgeschichtlich wichtigster Mechanismus zur Erhaltung der Körperintegrität angesehen werden kann (OTTAVIANI *et al.*, 1997).

### 1.3 Adrenocorticotropes Hormon in der Achse Hypothalamus-Hypophyse-Nebenniere (HPA-Achse)

Zusammen mit anderen strukturell verwandten Neuropeptiden wird ACTH der Familie der endogenen Opiate oder opioiden Peptide zugeordnet (MAINS *et al.*, 1977). Die Produkte aller Peptidfamilien werden durch Prozessierung großer Vorläufermoleküle gebildet. Das Signalpeptid wird gekappt und das Prohormon über

einen universellen Mechanismus gespalten (DIXON *et al.*, 1987; LOH & PARISH, 1987). Die vielfältigen Spaltprodukte der Prohormone können unterschiedliche biologische Funktionen erfüllen. Defekte in der Prozessierung führen zu schwerwiegenden hormonellen Störungen (FURUTA *et al.*, 1997; ZHU *et al.*, 2002).

Die Gene der Präkursoren sind im Genom in einer oder wenigen Kopien repräsentiert. Daher liegt die Information für die gewebsspezifische differentielle Expression der Neuropeptide wahrscheinlich innerhalb der Gene.

Opioide Peptide sind zuerst als körpereigene Liganden der Opiatrezeptoren in Erscheinung getreten, deren Konsensussequenz Tyr-Gly-Gly-Phe ist. Beispiele sind die (immunologisch aktiven) Pentapeptide [Met]-Enkephalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) und [Leu]-Enkephalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) (PLOTNIKOFF *et al.*, 1985; DIXON *et al.*, 1987).

Mit molekularbiologischen Methoden konnten drei Vorläufermoleküle für Mediatoren der Opioidfamilie unterschieden werden:

- Präpro-opiomelanocortin (NAKANISHI *et al.*, 1978; NAKANISHI *et al.*, 1979),
- Präpro-enkephalin A (NODA *et al.*, 1982a; NODA *et al.*, 1982b; GUBLER *et al.*, 1982; COMB *et al.*, 1982)
- Präpro-dynorphin (KAKIDANI *et al.*, 1982)

### 1.3.1 Proopiomelanocortin (POMC)

Das Proopiomelanocortin(POMC)-Gen wird in der Hypophyse und in peripheren Geweben exprimiert (LACAZE-MASMONTEIL *et al.*, 1987). Seine Peptidprodukte werden aus der Hypophyse in den Blutstrom abgegeben. Die Freisetzung unterliegt der übergeordneten Kontrolle durch den Hypothalamus und wird hauptsächlich über die entsprechenden Liberine bzw. über Rückkoppelungs-Hemmung durch die Hormon-Endprodukte der Signalketten reguliert. Das Präkursorprotein wird gewebsspezifisch differentiell prozessiert: im Hypophysenvorderlappen zu ACTH und  $\beta$ -LPH, im Mittelteil - z.B. bei Ratte und Schaf - wird ACTH in  $\alpha$ -MSH und CLIP umgewandelt,  $\beta$ -LPH weiter zu  $\gamma$ -LPH und  $\beta$ -Endorphin. Die kleineren aus ACTH und  $\beta$ -LPH gebildeten, biologisch aktiven Peptide werden von Paaren basischer Aminosäurereste flankiert (ROBERTS & HERBERT, 1977; DIXON *et al.*, 1987) (Tab. 2, S. 16).



**Tab. 2: Aminosäuresequenz von POMC und seine Peptid-Produkte.**

Position bezogen auf ACTH									
+60	Gly	+80	Leu	+100	Gly	+120	Pro		
	Asp		Leu		Ser		Leu		
	Gly		Val		Pro		Val		
	Pro		Ala		Pro		Thr		
	Asp		Ala		Lys		Leu		
	Gly		Glu		Asp		Phe		
	Pro		Lys		Lys		Lys		
	Ala		Lys		Arg		Asn		
	Ala		Asp		Tyr		Ala		
	Thr		Glu		Gly		Ile		
	Ala		Gly		Gly		Ile		
	Gln		Pro		Phe		Lys		
	Gly		Tyr		Met		Asn		
	Pro		Arg		Thr		Ala		
Gly	Met	Ser	Tyr						
Asp	Glu	Glu	Lys						
Leu	His	Lys	Lys						
Glu	Phe	Ser	Gly						
His	Arg	Gln	Glu						
+70	Ser	+90	Trp	+110	Thr				

Labels for peptide products:  $\beta$ -LPH,  $\gamma$ -LPH,  $\beta$ -MSH,  $\gamma$ -LPH,  $\beta$ -MSH,  $\beta$ -LPH, Met-Enkephalin,  $\beta$ -LPH,  $\beta$ -End.,  $\beta$ -LPH,  $\beta$ -Endorphin.

Daten aus ROBERTS & HERBERT, 1977; CHANG *et al.*, 1980a; DIXON *et al.*, 1987; HADLEY & HASKELL-LUEVANO, 1999;

**Abkürzungen:** +1 = N-terminale Aminosäure der ACTH-Primärstruktur; -90 - +120 = auf ACTH bezogene Aminosäure-Position in der POMC-Sequenz; **Ala** = Alanin; **Arg** = Arginin; **Asn** = Asparagin; **Asp** = Asparaginsäure; **-COOH** = Carboxy-Terminus des POMC-Peptids; **Gln** = Glutamin; **Glu** = Glutaminsäure; **Gly** = Glycin; **His** = Histidin; **Ile** = Isoleucin; **Leu** = Leucin; **Lys** = Lysin; **Met** = Methionin; **NH<sub>2</sub>-** = Aminoterminus des POMC-Peptids; **Phe** = Phenylalanin; **Pro** = Prolin; **Ser** = Serin; **Thr** = Threonin; **Trp** = Tryptophan; **Tyr** = Tyrosin; **Val** = Valin

Die POMC-Produkte können in Melanocortine und opioide Peptide und erstere weiter in Melanotropine und Corticotropine gegliedert werden (HADLEY & HASKELL-LUEVANO, 1999) (Tab. 3, S. 18).

Die Struktur des POMC-Gens wurde mit Hilfe der cDNA von bovinem ACTH-beta-LPH aufgeklärt (NAKANISHI *et al.*, 1978; NAKANISHI *et al.*, 1979; NAKANISHI *et al.*, 1981; NUMA & NAKANISHI, 1981; DIXON *et al.*, 1987). Das Vorläufermolekül wird von zwei nicht-konsekutiven Desoxyribonukleinsäure(DNA)-Segmenten kodiert. Das kleinere Exon enthält die Information für das Signalpeptid, das größere repräsentiert die biologisch aktiven Peptide. Das humane Gen ist um ein nicht-translatiertes Exon

und ein entsprechendes Intron erweitert. Die Nukleotidsequenz der cDNA des bovinen Gens läßt darauf schließen, daß das ACTH- $\beta$ -LPH-Strukturgen sich durch sukzessive Duplikation von MSH-kodierenden Einheiten entwickelt hat. Die vier repetitiven Einheiten wurden in einer Abfolge von Substitutionen, Additionen und Deletionen zum rezenten Genabschnitt umgewandelt (NAKANISHI *et al.*, 1979).

**Tab. 3: Opiomelanocortine.**

Melanocortine	Melanotropine	$\alpha$ -, $\gamma$ -MSH, $\beta$ -LPH
	Corticotropin	ACTH
-----		
Opioide Peptide	Endorphine	$\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -Endorphin

Abkürzungen: ACTH = adrenocorticotropes Hormon; LPH = Lipotropin; MSH = Melanocytenstimulierendes Hormon

### 1.3.2 Stimulation, Inhibition und Wirkung von ACTH in der HPA-Achse

Die innerhalb der HPA-Achse vermittelte ACTH-Induktion stehen unter der übergeordneten Kontrolle des Zentralen Nervensystems (ZNS), das z.B. bei traumatischen Einflüssen auf den Organismus die systemische Reaktion mitbestimmt.

Direkte Effekte auf die ACTH-Sekretion wurden im Nagermodell an Hypophysen-Präparaten bzw. an hypophysären Tumorzelllinien untersucht. Zu den Faktoren, die ohne ZNS-Beteiligung wirken können gehören zunächst die synergistisch stimulierenden klassischen Liberine CRH und AVP (GILLIES *et al.*, 1982), aber auch die Cytokine IL-1 (WOLOSKI *et al.*, 1985), IL-2 (KARANTH & MCCANN, 1991), IL-6 (WOLOSKI *et al.*, 1985) und IL-10 (HUGHES *et al.*, 1994).

Anhand der Wirkung von Lipopolysaccharid (LPS, exogenes Pyrogen) läßt sich das Prinzip der ACTH-Induktion darstellen. Während bakterieller Infektionen sowie experimentell induziert LPS eine Signalkaskade, an deren Anfang eine erhöhte Expression von induzierbarer NO-Synthase (iNOS) und damit steigende Produktion des Mediators Stickstoffoxid (NO) sowie der proinflammatorischen Cytokine Interleukin 1 (IL-1, endogenes Pyrogen), IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  und antiinflammatorischen Cytokine IL-10 und IL-13 steht. Eine systemische Wirkung von NO wird derzeit

diskutiert (RASSAF *et al.*, 2002; JOSHI *et al.*, 2002). Stickstoffoxid induziert Corticoliberin (CRH) und bewirkt so die Sekretion von ACTH (McCANN *et al.*, 2000).

Der Effekt einer Stimulation der HPA-Achse kann von weiteren Faktoren synergistisch oder antagonistisch beeinflusst werden. So ist die durch LPS induzierte und über CRH und Arginin-Vasopressin (AVP) regulierte hypophysäre ACTH-Sekretion von den osmotischen und den Volumenverhältnissen im Organismus abhängig. Hypervolämie und Hyperosmolalität dämpfen die ovinen Plasmaspiegel an Liberinen und ACTH (DADOUN *et al.*, 1999).

Die anhaltende Identifizierung neuer ACTH-Induktoren bestätigt die HPA-Achse als umfassenden Effektorweg für systemische leistungsphysiologische Anpassungsreaktionen (MERALI *et al.*, 2002).

Die ACTH-Expression und -Sekretion wird im Sinne einer Rückkoppelungshemmung von den Endprodukten in der HPA-Achse inhibiert. Nicht-steroidale Inhibitoren können, wie z.B. NO, an der Signalübertragung im Zuge der ACTH-Induktion beteiligt oder, wie  $\beta$ -Endorphin, Abkömmlinge von POMC oder anderen Prohormonen sein (JESSOP, 1999).

ACTH wirkt primär auf die Nebennierenrinde, wo das Hormon die Synthese und Sekretion von Glucocorticoiden, Mineralocorticoiden und androgenen Steroiden über die Transformationsrate von Cholesterol zu Pregnenolon stimuliert. Der Signalweg führt von den ACTH-Rezeptoren über eine membrangebundene Adenylylcyclase. Neben diesen adrenalen Effekten wirkt ACTH im Fettgewebe lipolytisch und, über die Freisetzung von Insulin aus den pankreatischen  $\beta$ -Zellen, hypoglykämisch. Beta-LPH stimuliert die Freisetzung von Fettsäuren aus dem Fettgewebe. Es hat zwar keine direkte Opiataktivität, wird aber durch Proteolyse in Endorphine umgewandelt (DIXON *et al.*, 1987).

Die Leukozytenzahl und phänotypische Verteilung steht im Rattenmodell mit dem endokrinen Tagesprofil, gemessen als Corticosteron, im Zusammenhang. Steigende Hormonspiegel nach dem Übergang in die aktive Phase und nach mildem Immobilisationsstreß gehen mit einer geringeren Leukozyten- und Gesamtlymphozytenzahl einher (DHABHAR *et al.*, 1994). Physische Aktivität wirkt sich auf die Menge und phänotypische Verteilung von Leukozyten im peripheren Blut aus. Akute Anstrengung läßt die Leukozytenzahl ansteigen, in der Erholungsphase sinkt sie wieder ab. Der kurzfristigste Effekt betrifft die Lymphozyten, deren Zahl im

peripheren Blut ansteigt, dann innerhalb von einer Stunde nach dem Training reaktiv wieder absinkt und sich innerhalb von 24 h wieder auf den Ausgangswert einstellt (GABRIEL *et al.*, 1992; HOFFMAN-GOETZ & PEDERSEN, 1992). Zwischen untrainierten, trainierten und übertrainierten Personen sind deutliche Unterschiede feststellbar. Klinisch-epidemiologisch ist moderates Training am günstigsten; Bewegungsmangel und häufige erschöpfende Anstrengung fördern vor allem Atemwegsinfektionen (BRINES *et al.*, 1996). Neuropeptide beeinflussen wahrscheinlich über leistungsphysiologische Situationen hinaus allgemein regulatorisch die Rezirkulation von Leukozyten und ihre Migration zwischen Blutkreislauf und Geweben (OTTAWAY & HUSBAND, 1994).

#### **1.4 Adrenocorticotropes Hormon und seine immunologischen Wirkungen in leukozytären Mikromilieus**

Regulatorische Neuropeptide und ihre Rezeptoren sind in Vertebraten und Invertebraten (OTTAVIANI & FRANCESCHI, 1997; OTTAVIANI *et al.*, 1998) verbreitet. In humanen Leukozyten sind POMC und seine Produkte (OATES *et al.*, 1988; REDER *et al.*, 1988) sowie die entsprechenden Rezeptoren (RAMACHANDRAN *et al.*, 1987; SMITH *et al.*, 1987) auf verschiedenen Ebenen der Expression nachgewiesen worden. Untersuchungen an Milz-Lymphozyten der Ratte mit <sup>125</sup>I-ACTH legen nahe, daß das Peptid an den Melanocortin-5-Rezeptor bindet und über Endocytose in Lysosomen gelangt (CLARKE, 1999). Die Bindung von  $\beta$ -Endorphin an seine Rezeptoren auf Lymphozyten wird durch hohe Konzentrationen von ACTH inhibiert (BORBONI *et al.*, 1989). Corticotropin erhöht die Konzentrationen von zyklischem Adenosin-Monophosphat (cAMP) und zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) in lymphoiden Zellen. Seine biologische Aktivität ist calciumabhängig. Während die immunsupprimierende Wirkung hoher ACTH-Konzentrationen cAMP-vermittelt ist, könnten immunstimulatorische Effekte mit der Ca-Aufnahme im Zusammenhang stehen (JOHNSON *et al.*, 1988; CLARKE, 1995). Die Konzentrationen von zyklischen Nucleotiden in Lymphozyten werden von einer Reihe von Agonisten beeinflusst, die z.T. mit der ACTH-Expression im Zusammenhang stehen, darunter LPS, das in T-Lymphozyten cAMP und in B-Lymphozyten cGMP induziert (COFFEY & HADDEN, 1985).

Im Chemotaxiskammer-Assay induzierten CRH und ACTH<sub>1-24</sub> die Migration von humanen Monozyten, während ACTH<sub>1-39</sub> und  $\alpha$ -MSH keine Effekte ausübten (GENEDANI *et al.*, 1992). Die Phagozytoseleistung von Hämozyten der Posthornschncke (*Planorbarius corneus* L.) sowie der urodelen Amphibien *Salamandra s. salamandra* (Feuersalamander) und *Triturus c. carnifex* für Bakterien war nach Zugabe von ACTH *in vitro* erhöht (OTTAVIANI *et al.*, 1991; OTTAVIANI *et al.*, 1992a). Die Phagozytose von Latex-Beads durch murine peritoneale Makrophagen, durchflußzytometrisch gemessen als prozentualer Anteil von Zellen, die Beads phagozytiert hatten, wurde dagegen von ACTH<sub>1-39</sub> und insbesondere von ACTH<sub>1-24</sub> gehemmt (ICHINOSE *et al.*, 1994).

Auf die Antikörperproduktion übt ACTH unterschiedliche Effekte aus. Der *plaque forming cell* (PFC) Test auf die Produktion muriner Antikörper gegen Schafserythrozyten (SRBC) bzw. Dinitrophenol(DNP)-Ficoll ergab eine Suppression bereits zu einem frühen Zeitpunkt (JOHNSON *et al.*, 1982). Demgegenüber war die Proliferation und Antikörpersekretion humaner B-Zellen *in vitro* erhöht, wenn zusätzliche Stimuli, wie z.B. IL-2, in den Kulturen eingesetzt wurden (ALVAREZ-MON *et al.*, 1985). Mit Tetanus-Toxoid stimulierte, humane mononukleäre Leukozyten aus peripherem Blut (PBMC) zeigten eine erhöhte Antikörpersynthese im höheren ( $10^{-9}$  und  $10^{-11}$  M) bzw. eine Suppression im niedrigen Konzentrationsbereich ( $10^{-13}$  und  $10^{-17}$  M) (MUNN & LUM, 1989).

In Experimenten zum Einfluß von ACTH auf die IgE-Synthese wurden humane mononukleäre Leukozyten des peripheren Blutes (PBMC) mit IL-4 und monoklonalen Antikörpern gegen CD40 stimuliert. Die IgE-Produktion war konzentrationsabhängig gesteigert oder vermindert. Ähnliche Wirkungen gehen von CRH und  $\alpha$ -MSH sowie weiteren Neuropeptiden aus. Im Unterschied zu früheren Befunden (BOST *et al.*, 1990, s.o.) hatte ACTH keine Wirkung auf die IgG- oder IgM-Synthese in diesem Kultursystem. Der Einfluß auf Lymphozyten ist von akzessorischen Zellen abhängig. (AEBISCHER *et al.*, 1994; STADLER *et al.*, 1994; AEBISCHER *et al.*, 1996).

Vergleichende Untersuchungen an verschiedenen Wirbeltier-Spezies, die unterschiedliche stammesgeschichtliche Entwicklungsstadien repräsentieren, lassen einen Übergang erkennen: von Arten, die nur Immunglobulin (Ig)M besitzen, zu solchen, die zusätzlich IgG exprimieren. Mit der Möglichkeit zum Klassenswitch geht die Fähigkeit zur Synthese von ACTH in lymphoiden Zellen einher. So wird das

Peptid bei urodelen Amphibien in Lymphozyten gebildet, während es bei anuranen nur in Phagozyten nachweisbar ist (OTTAVIANI *et al.*, 1992b).

Für einen Peptidabschnitt aus dem variablen Teil der schweren Kette von humanem IgG<sub>1</sub> mit ACTH-ähnlicher Aminosäuresequenz sind immunsupprimierende Eigenschaften *in vitro* beschrieben. Eine regulatorische Funktion ist denkbar, wenn während des Maximums der spezifischen humoralen Immunantwort hohe Antikörpertiter erreicht werden (NAVOLOTSKAYA *et al.*, 2000).

Adrenocorticotropes Hormon beeinflusst die T-Zell-Proliferation (SANDI *et al.*, 1990). Während es die T-Zell-vermittelte Zytotoxizität im Recall (JOHNSON *et al.*, 1987) verstärken kann, ist die Produktion von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) durch T-Zellen (JOHNSON *et al.*, 1984; PETERSON *et al.*, 1987) supprimiert und infolge dessen die Makrophagen-abhängige Tumorzell-Toxizität (KOFF & DUNEGAN, 1985; PECK, 1987) beeinflusst. Die Alloantigen-induzierte T-Zell-Proliferation in Lymphozytenkulturen der Ratte ist in Anwesenheit von ACTH moderat erhöht, und ebenso ist die Zytotoxizität (<sup>51</sup>Cr-Freisetzung) gesteigert (GONSALKORALE *et al.*, 1995).

### **1.5 Stimulation und Inhibition von ACTH in Leukozyten**

Immunologische und zelluläre leistungsphysiologische Signale lösen die Freisetzung vom CRH in Milz, Thymus und entzündetem Gewebe aus. Peripheres CRH wirkt als parakriner Mediator über die Bindung an CRH-R1- und CRH-R2-Rezeptoren auf benachbarte Zellen des Abwehrsystems. Sein Einfluß ist sowohl *in vivo* als auch *in vitro* proinflammatorisch. Einige dieser Effekte gehen möglicherweise von CRH-ähnlichen Peptiden wie z.B. dem Urocortin aus, das in Zellen des Immunsystems nachweisbar ist und eine hohe Affinität zu CRH-R2 hat (BAIGENT, 2001).

Die Induktion der ACTH-Synthese in Leukozyten kann - mit zum Teil fließenden Übergängen zwischen den genannten Gruppen - durch physikalische, chemische, biochemische, (patho)physiologische und mikrobiologische Stimulatoren hervorgerufen werden. Inhibitorische Einflüsse gehen vor allem von den hormonellen Endprodukten der HPA-Achse und ihren synthetischen Analoga aus.

Die Wirkung von Hyperthermie (38 - 44 Grad Celsius [°C] , 20 min. bis über Nacht) auf Leukozyten wurde hauptsächlich mit molekularbiologischen und proteinbiochemischen Methoden anhand der Gentranskription und Expression von

Hitzeschockproteinen (HSP) untersucht (FERRIS *et al.*, 1988; JOSLIN *et al.*, 1991; JAQUIER-SARLIN *et al.*, 1995; HOUSBY *et al.*, 1999). Die Temperaturabhängigkeit und Kinetik der HSP70-Synthese kann auch durchflußzytometrisch analysiert werden, und die Ergebnisse stimmen mit denen aus Referenzmethoden (*metabolic labelling* mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin, Western-Immunoblot) überein (BACHELET *et al.*, 1998). Corticoliberin bzw. ACTH (ELISA) waren in murinen Milzzellen, humanen PBMC sowie aus den PBMC angereicherten Lymphozyten, T-Zellen bzw. CD4+ T-Lymphozyten und B-Zellen um den Faktor 12 - 24 (für CRH) bzw. 14 (für ACTH) hyperthermisch induzierbar (KRAVCHENCO & FURALEV, 1994).

Hyperosmolarität konnte mit Hilfe unvollständig verdünnter Zellkulturmedien und Hypoxie durch Absenken des Sauerstoffgehaltes im Inkubator auf 5 Prozent (%) modelliert werden. Beide Bedingungen induzierten (8× - 27× bzw. 10× - 26×) die CRH- und (14× - 19× bzw. 23×) die ACTH-Expression (KRAVCHENCO & FURALEV, 1994). Die Bedeutung des osmotischen Wertes für immunologische Regulationsmechanismen geht auch aus Untersuchungen zur Expression des proinflammatorischen Cytokins Interleukin 8 hervor, die durch Zusatz von Kaliumiodid (KI), Natriumiodid (NaI) und Natriumchlorid (NaCl) induziert und durch wässriges Verdünnen des Zellkulturmediums supprimiert werden konnte (SHAPIRO & DINARELLO, 1995; SHAPIRO & DINARELLO, 1997).

Corticoliberin und AVP bewirkten, wie in der Hypophyse, synergistisch die ACTH-Freisetzung aus Leukozyten auf (radiometrisch) mehr als die 20fache Konzentration. Leukozytäres ACTH entfaltete in der murinen Nebennieren-Tumorzelllinie Y-1 steroidogene Aktivität. Die Synthese wurde durch Dexamethason supprimiert (SMITH *et al.*, 1986).

Um Erkenntnisse über die Wirkungen von LPS, LPS + IL-4 und Concanavalin A (Con A) auf die Proteinsynthese und den Stoffwechsel von Maus-Splenozyten zu gewinnen, wurden Mäuse mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin radioaktiv markiert (*in-vivo*-Verfahren) bzw. Milzzellen in Gegenwart von  $^{35}\text{S}$ -Methionin kultiviert (*in-vitro*-Markierung). Proben von immobilisierten und Kontroll-Tieren wurden parallel untersucht. Die streßbedingten Veränderungen waren bei B Zellen minimal, abgesehen von einer geringgradigen Abnahme der Proliferationskapazität. Im Gegensatz dazu gab es ausgeprägte Effekte auf T-Zellen. Im zweidimensionalen (2D-)Gel war erkennbar, daß diese T-Zellen im Vergleich zu Kontrolltieren mehr als

100 neue Proteine exprimierten (DOMINGUEZ-GERPE & LEFKOVITS, 1996). Quantitative Untersuchungen (ELISA) zu Effekten von LPS und ConA (beide  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) wurden an Maus-Splenozyten und verschiedenen Fraktionen humaner mononukleärer Blutleukozyten durchgeführt. Unter LPS war CRH aus B-Zellen unverändert, aus T-Lymphozyten dagegen  $32\times$  erhöht. Umgekehrte Verhältnisse lagen für ConA vor, das praktisch keine Wirkung auf T-Zellen ausübte, B-Zellen dagegen zur CRH-Sekretion bis auf die  $21\times$  Konzentration stimulierte. Die Werte der übrigen Zellfraktionen lagen innerhalb dieser Spannweite. Die Konzentrationen von ACTH aus humanen Lymphozyten stiegen unter LPS auf das 10fache und unter ConA auf das 3fache an (KRAVCHENCO & FURALEV, 1994). Immunradiometrische Detektion der LPS-Wirkung auf mononukleäre Zellen ergab eine auf ca. das 3fache erhöhte ACTH-Konzentration (HARBOUR-MCMENAMIN *et al.*, 1985).

Einflüsse des Newcastle-Disease- (NDV) (SMITH & BLALOCK, 1981; WESTLY *et al.*, 1986) und des humanen Immundefekt-Virus (HIV) (HASHEMI *et al.*, 1998) deuten auf eine Beteiligung leukozytärer Neuropeptide bei Interferon-vermittelten antiviralen Abwehrprozessen hin. Die POMC-Transkription in Epstein-Barr-Virus(EBV) -transformierten humanen B-Lymphozyten und -Zelllinien wird von Dexamethason nicht beeinflusst (OATES *et al.*, 1988; OATES *et al.*, 1990).

Den Effekt systemisch wirksamer Umweltfaktoren demonstrieren Untersuchungen an bovinen Lymphozyten. Die Tiere wurden 14 h im Lastwagen transportiert und verblieben entweder für weitere 24 h im stehenden Fahrzeug oder wurden für die Ruhephase in den Stall verbracht. Nach 72stündiger Nachinkubation von PBMC war eine transportbedingte ungefähre Verdoppelung der ACTH-Sekretion durch Lymphozyten, gemessen im Radioimmunassay, feststellbar. Die Stimulation persistierte bei Zellmaterial von Tieren, die im Lastwagen belassen worden waren, und ging in den Bereich des Ausgangswertes zurück, wenn die Rinder im Stall geruht hatten (DIXIT *et al.*, 2001).

## **1.6 Durchflußzytometrie und ACTH-Detektion**

Die Durchflußzytometrie dient der Messung unterschiedlicher physikalischer und chemischer Merkmale von einzelnen Zellen oder Partikeln - also z.B. Zellkerne, Chromosomen, Bakterien, Zellorganellen, Liposomen oder Viren - in Suspension. Sie

werden mit einem hohen analytischen Durchsatz bis  $> 3000$  pro Sekunde ( $s^{-1}$ ) vermessen, während sie einzeln nacheinander einen Lichtstrahl passieren. Es können in heterogenen Gemischen auch verhältnismäßig seltene Ereignisse, etwa mit Häufigkeiten um  $10^{-7}$ , identifiziert werden. Neben der Analyse besteht mit entsprechendem technischen Aufwand die Möglichkeit, markierte Subpopulationen durch automatisiertes Sortieren anzureichern (SCHAUER *et al.*, 1996; BOECK *et al.*, 2001).

Unterschiedliche Partikeln im Größenbereich von 1 bis  $30 \mu m$  lassen sich anhand ihrer morphologischen Eigenschaften identifizieren, die im Durchflußzytometer zur charakteristischen Streuung des einfallenden Lichts führen. Die in der Verlängerung des einfallenden Strahls gemessene Lichtintensität (Vorwärtsstreulicht = FSC) und die Partikelgröße sowie die Intensität im rechten Winkel zur Einfallrichtung (Seitwärtsstreulicht = SSC) und die morphologische Komplexität des Partikels sind jeweils miteinander korreliert. Zur Komplexität tragen bei Zellen die Strukturierung der Membranen, die Granularität und die Morphologie des Zellkerns bei. Anhand ihrer Streulichteigenschaften lassen sich so Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten des peripheren Blutes unterscheiden.

Aus dem Seitwärtsstreulicht werden desweiteren Fluoreszenzsignale detektiert. Sollen mehrere Wellenlängenbereiche gemessen werden können, so ist das Durchflußzytometer üblicherweise mit einem Laserlicht-Generator ausgestattet, der monochromatisches, polarisiertes Licht emittiert. Die übertragene Energie regt die Zelle, speziell deren Pyridin- und Flavinnucleotide zur Abgabe von längerwelligem, unpolarisiertem Fluoreszenzlicht (Autofluoreszenz) an (BOECK, 2001). Es ist ein guter Indikator für die strukturelle Integrität der Zelle, denn morphologisch intakte Zellen geben, auch wenn sie nicht mehr vital sind, relativ niedrige Autofluoreszenzsignale ab. Insbesondere aber dienen Fluorochrome, mit denen Zellbestandteile direkt oder in Kombination mit spezifischen Sonden markiert oder die das Produkt fluorogener Substrate sind, zur Identifizierung struktureller oder funktioneller Charakteristika.

Das Vorwärtsstreulicht wird typischerweise zum größten Teil ausgeblendet und die restliche Intensität durch eine Photodiode erfaßt, während das Seitwärtsstreulicht aufgrund seiner Polarisierung und Wellenlängen über Strahlenteiler, dichroische Spiegel und optische Filter zerlegt und auf Verstärkerröhren (*Photo-*

*multiplier Tubes* = PMT) gelenkt wird. So werden mit Geräten, die mit *einem* Lasergenerator ausgestattet sind, üblicherweise bis zu drei Fluoreszenzparameter meßbar (Abb. 1, S. 26). Diese unterschiedlichen Wellenlängenbereiche werden häufig auch als Kanäle bezeichnet. Der Begriff Kanäle soll hier aber den diskreten Intensitätsbereichen vorbehalten bleiben, in die die (nach der klassischen Physik) kontinuierlich modulierten Lichtintensitäten und die daraus in den PMT erzeugten kontinuierlichen Spannungsschwankungen nach analog/digital-Wandlung klassiert werden. Daher werden die Merkmale Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht, Fluoreszenz(en-1, 2 ... n = FL-1, FL-2 ... FL-n) und gegebenenfalls Zeit (bei kinetischen Studien, SEAMER & SKLAR, 2001) als Parameter bezeichnet.

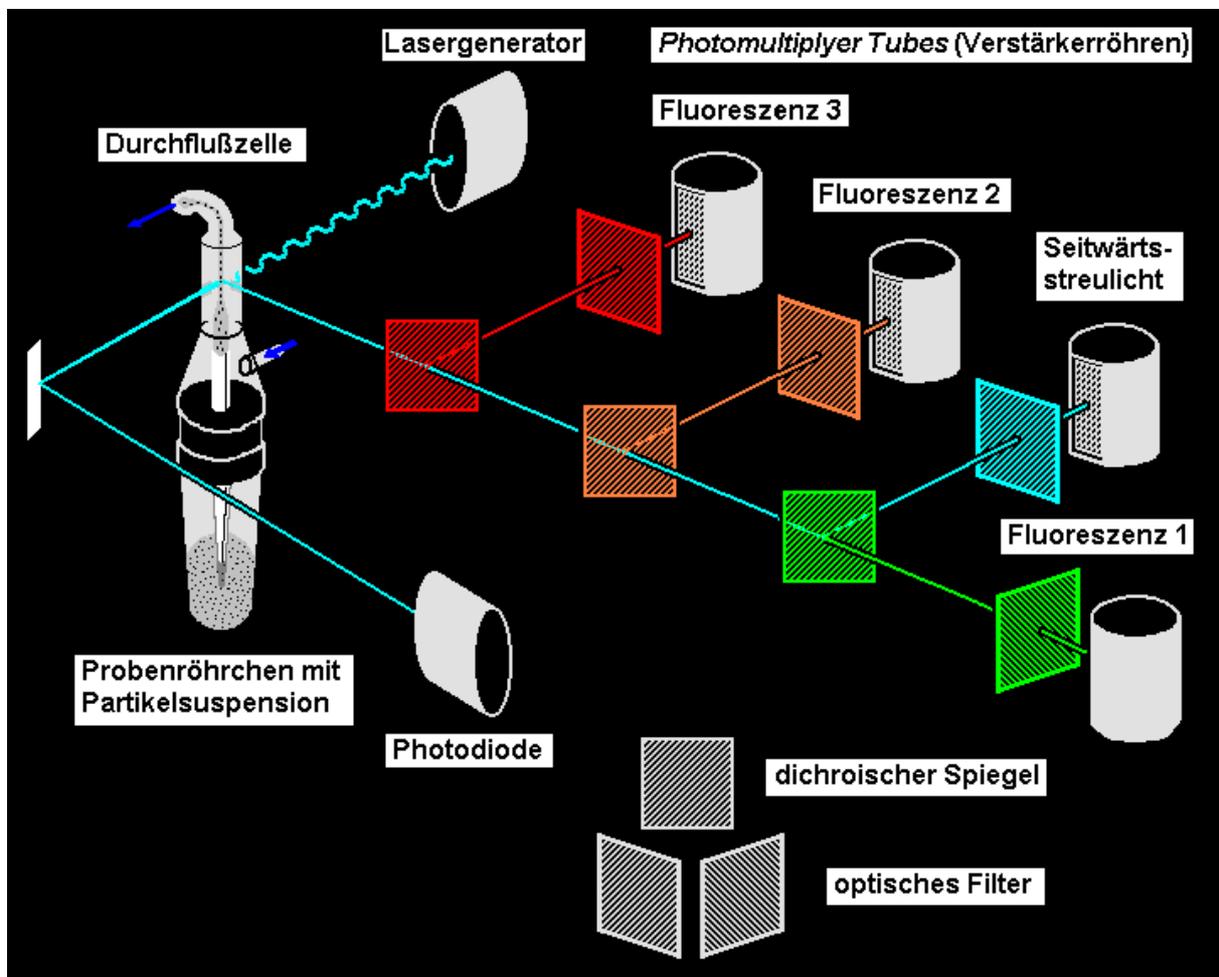


Abb. 1: Schema ausgewählter Hauptkomponenten eines Durchflußzytometers

Jedes Meßereignis ist somit durch eine Schar von Merkmalsausprägungen repräsentiert, die computergestützt in einen Datensatz umgewandelt und auf einem Datenträger gespeichert werden kann. Für einen der Parameter, üblicherweise die

relative Größe (Vorwärtsstreulicht), kann ein Schwellenwert eingestellt werden, der erreicht werden muß, damit einem Ereignis ein Datensatz zugeordnet wird. Ebenso wird in der Regel vorab der Umfang der Messung, also die Zahl der erfaßten Ereignisse, festgelegt. So erzeugt z.B. die Messung von 10 000 Partikeln mit Erfassung beider Streulicht- und dreier Fluoreszenzparameter eine Matrix von 50 000 Werten aus 10 000 Fünftupeln. Sie werden in einer Listmode-Datei gespeichert, die neben der Matrix auch Informationen über Art und Einstellung des Durchflußzytometers, Beginn und Ende der Messung und, soweit vom Bediener eingegeben, verwendete Reagenzien und Anmerkungen zum Experiment enthält (SEAMER *et al.*, 1997; SHAPIRO, 2001).

Aus der Datei können die Ergebnisse in vielfältiger Weise ausgelesen und weiter ausgewertet werden (Abb. 2, S. 30):

- Einzelne Parameter können anhand der Ereignishäufigkeit je Kanal in einem Histogramm dargestellt werden. Die Dichtefunktion kann als tabulierter Text ausgelesen und gespeichert oder für andere Anwendungen zur Verfügung gestellt werden.
- Die Korrelation von mehreren Parametern kann in zwei- oder dreidimensionalen Diagrammen dargestellt werden. Bei den zweidimensionalen werden Punktwolkendiagramme (*Dotplots*, für Streulichtparameter: *Scatterplots*), die korrelierte Daten zweier ausgewählter Parameter auf Basis jedes einzelnen Ereignisses darstellen, von Verteilungsdichte-Diagrammen unterschieden: 2D-Histogramme (*Density Plots*) stellen zwei Parameter als zweidimensionale Häufigkeitsverteilung dar, *Contour Plots* ordnen gleichen Häufigkeiten von Ereigniskombinationen eine gemeinsame Kennzeichnung analog den Höhenlinien auf einer Landkarte zu. Die Häufigkeiten einzelner Merkmalskombinationen lassen sich im *Perspective Plot* in der schrägen Aufsicht als "Gebirge" darstellen. Mit dreidimensionalen Drei-Parameter-Diagrammen kann z.B. die relative Expressionsdichte eines Antigens, anhand des Fluoreszenzsignals, in den über die Streulichteigenschaften unterscheidbaren Zellpopulationen dargestellt werden.

Ein wirksameres Mittel für die nähere Analyse und detailliertere Auswertung durchflußzytometrischer Daten ist aber das elektronische Auswählen von Ereignissen durch sogenannte Regionen und logische Verknüpfen dieser Regionen zu sogenannten Gates. So können beispielsweise die Signale von strukturell intakten

Zellen mit niedriger Autofluoreszenz über den Bool-Operator "AND" (exklusives, logisches Und) mit den Ereignissen in eine Schnittmenge gebracht werden, die anhand ihrer Streulichteigenschaften als von Monozyten hervorgerufen erkannt worden sind. Daraus läßt sich wiederum ein Histogramm erstellen, aus dem die mittlere relative Fluoreszenzintensität (MFI) und damit die relative Antigendichte dieser Monozyten errechnet werden kann.

Die Durchflußzytometrie liefert relative Daten. Die Signalintensität hängt bei den Fluoreszenzparametern außer von gleichbleibenden Markierungsbedingungen auch von der Spezifität der Nachweisreaktion ab. Dies sind die Voraussetzungen, die bei einem Assay erfüllt sein müssen. Unterschiedliche Mengen an gebundenem bzw. umgesetzten Nachweisreagenz kennzeichnen dann die unterschiedlichen Einflüsse der variierten Versuchsbedingungen. Im Sinne der Vergleichbarkeit müssen aber auf Seiten der Messung gleiche Intensitäten zu verschiedenen Zeitpunkten gleiche Signale hervorrufen. Denn die Stärke der Lichtquelle (Laser, Lichtbogen etc.) nimmt mit zunehmendem Alter ab. Ebenso sinkt die Empfindlichkeit der Detektoren. Daher muß das Gerät mit Hilfe eines Standards regelmäßig kalibriert werden. Über die Detektorempfindlichkeit und elektronische Signalverstärkung werden die Intensitätswerte dabei der bekannten Signalstärke angepaßt.

Für die Grundeinstellung werden in der Regel Kalibrationspartikeln definierten Durchmessers eingesetzt, die ungefärbt zur Einstellung der Streulichtdetektoren sowie zusätzlich mit definierter Fluorochromierung zur Einstellung der Fluoreszenzdetektoren dienen. Mit biologischem Standardmaterial kann bei Bedarf, z.B. für DNA-Analysen, eine Feineinstellung vorgenommen werden.

Dem jeweiligen Fluoreszenzdetektor vorgeschaltet sind optische Bandpass-Filter, die möglichst die Bereiche außerhalb des Emissionsmaximums eines Fluorochroms sowie den Spektralbereich, in dem sich die Emissionsspektren zweier "benachbarter" Fluorochrome überschneiden, herausfiltern sollen. Dennoch spricht ein Teil des von einem Fluoreszenzfarbstoff emittierten Lichts praktisch immer auch einen nicht dafür vorgesehenen Detektor an. So wird die von Fluorescein-isothiocyanat (FITC) emittierte grüne Fluoreszenz über den ersten Fluoreszenzdetektor (FL-1) gemessen, streut aber auch in FL-2, den Detektor für Phycoerythrin (PE) und andere im orangen Bereich emittierende Fluorochrome. Der Einfluß dieser

Störstrahlung muß elektronisch kompensiert werden, und der Einstellung dieser Kompensation dienen ebenfalls die fluoreszierenden Standardpartikeln.

Die intrazelluläre Cytokinmarkierung mit durchflußzytometrischer Auswertung hat sich innerhalb weniger Jahre zur Standardmethode entwickelt. Die Mediatoren können auf Einzelzell-Ebene detektiert werden, und die Probenvorbereitung dauert, je nach Fragestellung, nur wenige Stunden.

Die Durchflußzytometrie wurde zum Nachweis von Adrenocorticotropem Hormon in Blutzellen von verschiedenen Tierarten eingesetzt. So wurde das Neuropeptid in Leukozyten des Wasserfroschs (*Rana esculenta*) mit Hilfe poly- und monoklonaler Antikörper und sekundärer Immunfluoreszenz detektiert (OTTAVIANI *et al.*, 1992b). Bei der Posthornschnecke (*Planorbarius corneus* L.) enthalten die zur Phagozytose von Bakterien befähigte Zellen nach immunocytochemischer mikroskopischer Analyse mit polyklonalen Antikörpern ACTH-immunreaktives Antigen. Es handelt sich um eine von zwei Hämozyten-Arten sowie Zellen mit Resorptionsfunktion aus dem Gastrointestinaltrakt. Der Gehalt an ACTH-immunreaktiven Antigenen in den Hämozyten wurde durchflußzytometrisch bestätigt (OTTAVIANI *et al.*, 1990; OTTAVIANI *et al.*, 1991).

Immunzytochemische Untersuchungen an Leukozyten des Menschen bzw. der Ratte wurden fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Konventionelle Studien erlaubten die Zuordnung der Fluoreszenz zu einer von fünf Intensitätsstufen (0 - 4<sup>+</sup>) nach visuellem Eindruck. Mit Hilfe der digitalen Bildauswertung von Aufnahmen mit dem konfokalen Laserscanning-Fluoreszenzmikroskop konnten die Intensitäten in Grauwerten dargestellt und quantifiziert werden (REDER, 1992; LYONS & BLALOCK, 1995).

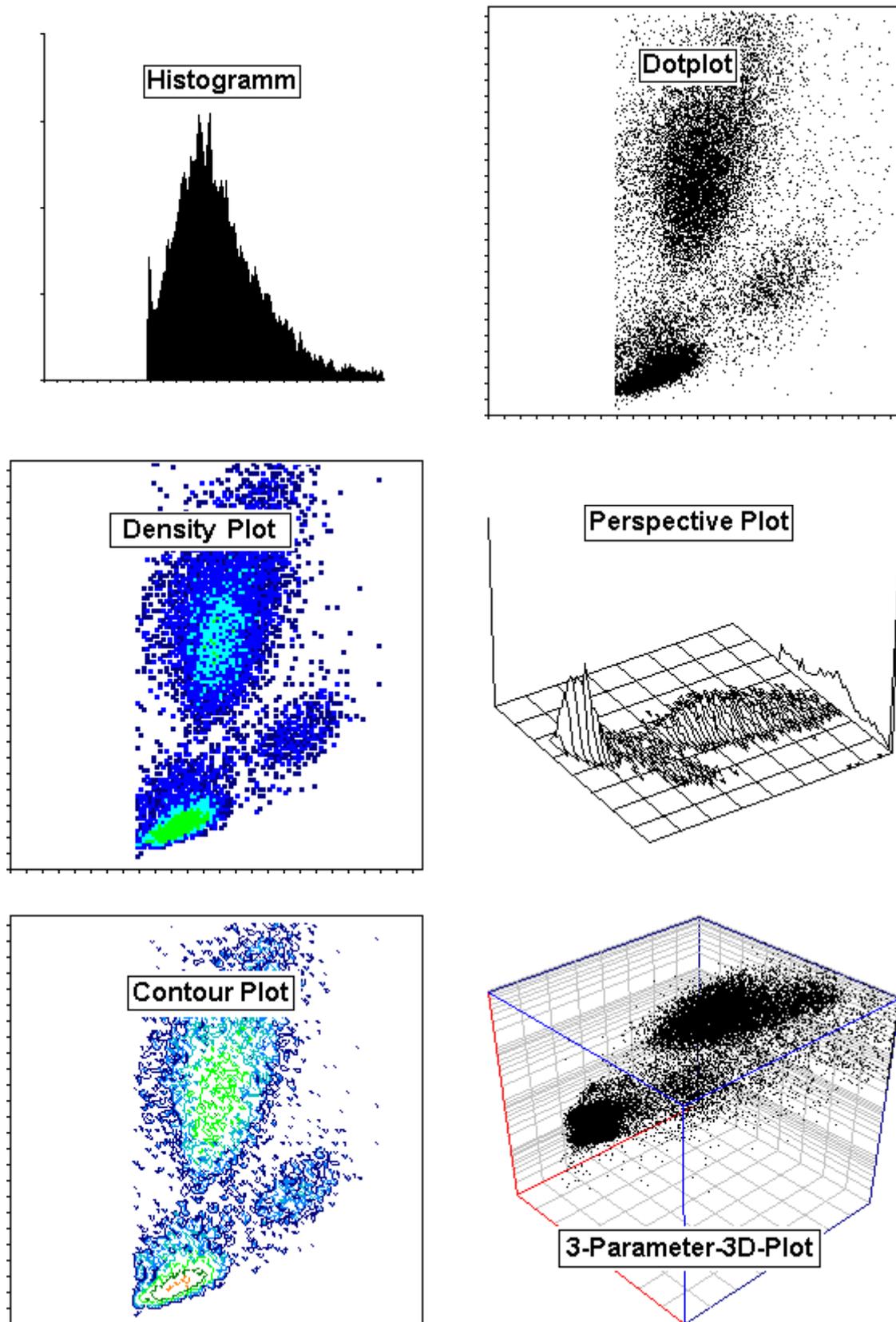
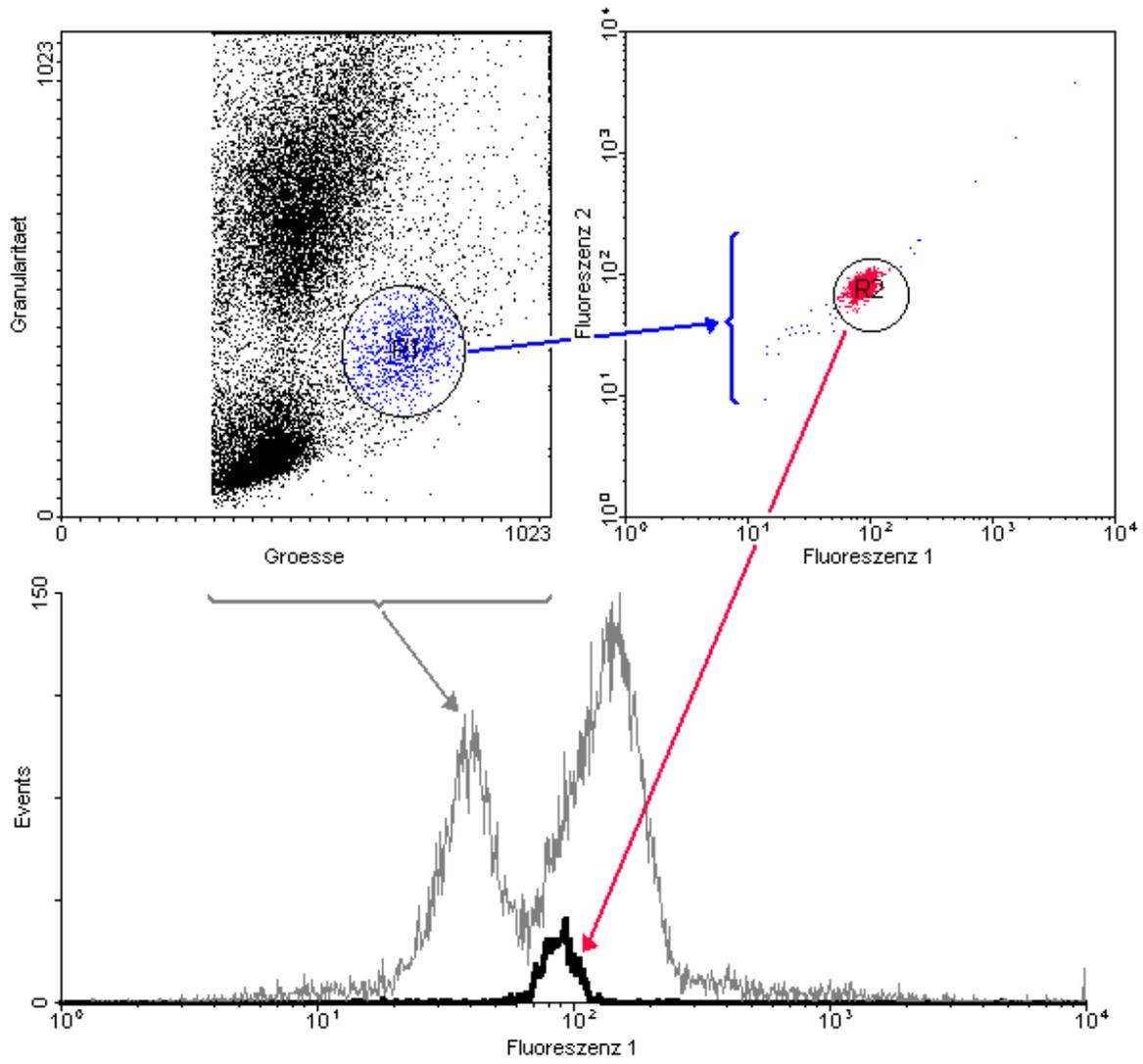


Abb. 2: Möglichkeiten der graphischen Darstellung durchflußzytometrischer Daten



**Abb. 3: Regionen und Gates in der Durchflußzytometrie**

## 2 Material und Methoden

Die Vorversuche betrafen die Funktionalität und Spezifität des durchflußzytometrischen Detektionssystems sowie den Zellstoffwechsel unter leistungsphysiologischer Stimulation. In den Hauptversuchen sollte die Corticotropin(ACTH)-Expression durch Corticoliberin (CRH) und einschlägige ACTH-Induktoren beeinflusst werden.

### 2.1 Leistungsphysiologische Zellkultursysteme

Die Vorversuche wurden überwiegend mit mononukleären Leukozyten durchgeführt, wie sie auch in den Hauptversuchen eingesetzt wurden. Darüber hinaus wurden Hauptversuche mit komplettem *Buffy Coat* aus Spenderblut durchgeführt.

#### 2.1.1 Zellkultur mit mononukleären Leukozyten

Mononukleäre Leukozyten wurden aus Spenderblut über Dichtegradienten-Zentrifugation angereichert (modifiziert nach BØYUM, 1968), in definierter Zellzahl über Nacht mit ACTH-Induktoren inkubiert und nach Formalin-Fixierung konserviert aufbewahrt.

**Tab. 4: Materialien für die Zellkultur mit mononukleären Leukozyten.**

Material	Spezifikation, Bezugsquellen, Formulierung
Spenderblut	Aliquots von <i>Buffy-Coats</i> aus Blutspendematerial vom Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin der Universität Bonn
Sterilbank	Sterile Werkbank Gelaire® TCA 72, Flow Laboratories, Meckenheim (Rheinland)

**Tab. 4: Materialien für die Zellkultur mit mononukleären Leukozyten.**

Material	Spezifikation, Bezugsquellen, Formulierung		
Zentrifugen- röhrchen	Polypropylen-Tubes	15 mL	50 mL
		Produktnummer (Prod.-Nr.)	
	Greiner, Solingen	188261 bzw. 188271	227261 bzw. 227270
	Nunc, Wiesbaden	366036 bzw. 366060	373660 bzw. 373687
DPBS	Sterile phosphatgepufferter Natriumchloridlösung, Dulbeccos Modifikation, ohne zweiwertige Kationen, Zellkultur-Grad		
	Biochrom	Prod.-Nr. L-1825	
	Invitrogen, Karlsruhe	Gibco™, Prod.-Nr. 14190-094	
	Sigma, Taufkirchen	Prod.-Nr. D-8537	
Pipetten	serologisch, einweg, Greiner: Volumen, Produktnummer (Prod.-Nr.)		
	1 mL, 604181	2 mL, 710180	5 mL, 606180
	10 mL, 607180	25 mL, 760180	
Gradient	Steriler Ficoll-Diatrizaot-Dichtegradient, $\rho = 1077$ g/L		
	Biochrom	Biocoll 1,077, Prod.-Nr. L6115	
	Sigma	Histopaque®-1077	Hybrimax®, Prod.-Nr. H-8889
Zentrifuge	temperierbar mit Ausschwingrotor		
	Heraeus, Hanau	Megafuge 1.0R	
		Varifuge K Typ 4500	
Zellkulturmedium aus			
• RPMI- Medium	Roswell Park Memorial Institute(RPMI)-1640		
	Biochrom	Prod.-Nr. F-1275	
	Invitrogen	Prod.-Nr. 11835-030	
	Sigma	Prod.-Nr. R-7509	
• FBS	Steriles fetales bovines Serum		
	Biochrom	Prod.-Nr. S-2113	
	Invitrogen	Prod.-Nr. 16250-086	
	Sigma	Prod.-Nr. F-2442	

**Tab. 4: Materialien für die Zellkultur mit mononukleären Leukozyten.**

Material	Spezifikation, Bezugsquellen, Formulierung
<b>Zellzahl-Bestimmung</b>	
• Trypanblau	Trypanblau-Lösung, 0,4 %, Prod.-Nr. T-8154, Sigma
• 96er-U-MTP	96-Well-Mikrotiterplatte, Rundboden, Nunc, Prod.-Nr. 163320
• Zählkammer	Hämacytometer Neubauer improved, doppelte Netzteilung, amtl. geeicht, Prod.-Nr. 717805 bzw. 717820, mit Borosilikat-Deckglas, Prod.-Nr. 723055, Brand, Wertheim
• Mikroskop	SM-LUX, Leitz, Wetzlar
• Rechner, Software	Palm m500, Palm, Wokingham, Berkshire, UK, mit Software-Schnittstelle SheetsToGo, Avantgo, München, zu Microsoft Excel, Microsoft, Unterschleissheim
<b>Zellkulturmedium mit ACTH-Stimulatoren bzw. -Inhibitor</b>	
• CRH	Corticotropin Releasing Factor, Prod.-Nr. C-3042, Sigma: 2102 µL 10 <sup>-5</sup> M Stammlösung aus 0,1 mg angesetzt
• LPS	Lipopolysaccharid aus <i>Escherichia coli</i> 055:B5, Zellkultur-Grad, Prod.-Nr. L-6529, Sigma
• NaCl	Natriumchlorid, Zellkultur-Grad, Prod.-Nr. S-5886, Sigma
• Dexamethason	Sigma, Prod.-Nr. 8893
<b>Test des Zellstoffwechsels</b>	
• 96er-F-MTP	96-Well-Mikrotiterplatte, Flachboden, Nunc, Prod.-Nr. 167008
• MTT	Cell Proliferation Kit I (MTT), Roche, Mannheim, Prod.-Nr. 1465007, bestehend aus <ul style="list-style-type: none"> <li>- Arbeitslösung mit 5 mg mL<sup>-1</sup> 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) in PBS, unsteril;</li> <li>- Arbeitslösung für die Zell-Lysierung und MTT-Löslichkeitsvermittlung aus 10 % SDS in 0,01 M HCl.</li> </ul>
• Photometer	Titertek Plus MS2 Reader für 96-Well-Mikrotiterplatten, ICN, Eschwege, mit Filtersatz 405 nm / 450 nm / 550 nm / 600 nm / 690 nm
<b>Sekretions-Inhibitoren</b>	
• Monensin	Sigma, Prod.-Nr. M-5273, Stammlösung zu 10 mM in 100% Ethanol
• Brefeldin A	Sigma, Prod.-Nr. B-6542, Stammlösung
Kulturgefäße	Sterile silikonisierte Glasröhrchen für die Spurenelemente-Bestimmung, 7,0 mL, 100 × 13 mm, Vacutainer, Prod.-Nr. 367737, Becton Dickinson, Heidelberg
Halterung	24-Well-Zellkulturplatten

**Tab. 4: Materialien für die Zellkultur mit mononukleären Leukozyten.**

Material	Spezifikation, Bezugsquellen, Formulierung		
	Greiner	Prod.-Nr. 662160	
	Nunc	Prod.-Nr. 143982	
Frischhaltefolie	Polyethylen-Haushaltsfolie, Plus Vertriebs GmbH, Mülheim/Ruhr		
Inkubator	Begasungsbrutschrank CO <sub>2</sub> Auto Zero, Heraeus, Hanau		
Fixativ	Formaldehyd, 4%ig in DPBS, aus 37%iger Lösung, <i>p.a.</i> , Methanolstabilisiert, Prod.-Nr. 1.04003		
Waschlösung aus PBS, 0,5 % BSA, 0,1 % NaN <sub>3</sub>			
• PBS	Phosphatgepufferte Natriumchlorid-Lösung (technische Qualität, modifiziert nach Holtzhauer, 1997)		
	Reagenz	Sigma, Prod.-Nr.	Menge
	NaCl	S-9888	8,0 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	S-5136	1,08 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	P-5379	0,2 g
	H <sub>2</sub> O <i>bidest.</i>		<i>ad</i> 1000 mL
• BSA	Rinderserumalbumin, Fraktion V, Sigma , Prod.-Nr. A-9418		
• NaN <sub>3</sub>	Natriumazid, Sigma, Prod.-Nr. S-2002		

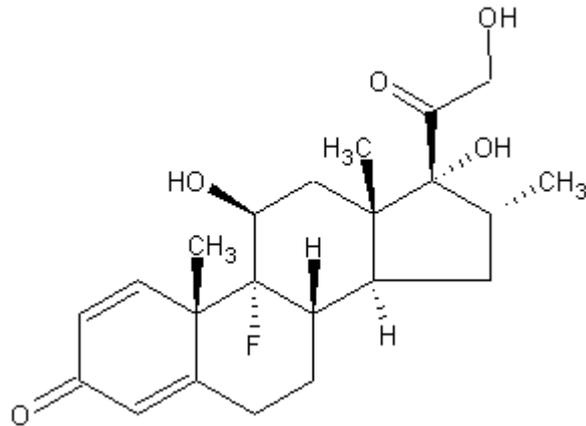
Aliquots von 10 mL *Buffy Coat* wurden in 50-mL-Zentrifugenröhrchen mit dem selben Volumen DPBS durch Invertieren behutsam bis zur Homogenität gemischt. In 15-mL-Zentrifugenröhrchen wurden je 6 mL dieser Mischung auf 5 mL Dichtegradient überschichtet und 30 min mit 1800 min<sup>-1</sup> bei RT zentrifugiert. Das danach im oberen Teil des Zentrifugenröhrchens befindliche Gemisch aus Blutplasma und DPBS wurde bis auf eine Schichtdicke von ca. 1 cm abgenommen. Die darunter, auf dem Gradienten liegende Interphase aus mononukleären Leukozyten und Thrombozyten wurde vorsichtig mit einer sterilen serologischen 2-mL-Kunststoffpipette in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt, wobei möglichst geringe Anteile des Gradienten erfaßt werden sollten.

Jedes 15-mL-Zentrifugenröhrchen wurde bis max. zu 1/3 mit Interphase gefüllt und mit dem ins restliche freie Volumen aufgefüllte DPBS behutsam bis zur Homogenität durchmischt. Die nachfolgende 10min Zentrifugation mit 1500 min<sup>-1</sup> bei RT resultierte in einer mit Thrombozyten angereicherten flüssigen Phase und einem Zellpellet im Konus des Zentrifugenröhrchens. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet behutsam aufgeklopft bzw. mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette in ca. 3 mL DPBS mit 0,5 % FBS (D.5B) resuspendiert.

An dieser Stelle kann das auf verschiedene Zentrifugenröhrchen verteilte Zellmaterial eines Spenders über jeweils mehrere kleine Volumina in einem Röhrchen zusammengeführt werden. Der Röhrcheninhalt wurde nach Auffüllen mit D.5B behutsam bis zur Homogenität durchmischt. Die nachfolgende 10min Zentrifugation mit  $1200 \text{ min}^{-1}$  bei RT resultierte in einem weiter von Thrombozyten abgereicherten Zellpellet, das entsprechend dem zuvor beschriebenen Verfahren resuspendiert wurde. Während das Pellet in Zellkulturmedium mit 20 % FBS-Anteil (R20B) aufgenommen wurde, wurde anhand der Trübung der Suspension darauf geachtet, daß die Zelldichte noch sicher über  $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  lag.

Von der Zellsuspension wurden  $20 \mu\text{L}$  in einem der 96 Wells einer Rundboden-Mikrotiterplatte mit dem selben Volumen Trypanblau-Lösung durch mehrfaches vorsichtiges Pipettieren homogen vermischt und im Hämacytometer ausgezählt (Hinweise bei LINDL & BAUER, 1994). Bei Zelldichten, die wesentlich über  $6 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  – entspr.  $> 20$  Zellen je Kleinquadrat - lagen, wurde im Verhältnis 1 + 9 vorverdünnt. Die Anzahlen vitaler und devitaler Zellen je Kleinquadrat wurden im Palm-Handheld erfaßt, das die Zelldichte und -vitalität aus - je nach vorliegender Zelldichte - ein bis vier Großquadraten auf Zellen pro mL hochrechnete. Mit R20B wurde auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  eingestellt.

In RPMI-1640 wurden die ACTH-Induktoren aus den Stammlösungen bis auf das Doppelte der Endkonzentration verdünnt bzw. reines RPMI-1640 für den Kontrollansatz bereitgestellt. In Vorversuchen wurden in gleicher Weise Medien mit  $2 \times 10^{-8}$  bzw.  $2 \times 10^{-7}$  M Dexamethason (für Endkonzentrationen  $1 \times 10^{-8}$  bzw.  $1 \times 10^{-7}$  M) (Abb. 4, S. 37) und 0,45 / 0,9 / 1,35 / 1,8 % w/v NaCl (für Endkonzentrationen 0,225 / 0,45 / 0,675 / 0,9 %) eingesetzt. Durch Mischen von  $500 \mu\text{L}$  der Zellsuspension mit  $500 \mu\text{L}$  von einer dieser Lösungen ergab sich jeweils der komplette Ansatz (Tab. 5, S. 37).



**Abb. 4: Dexamethason - Inhibitor der ACTH-Synthese**

**Tab. 5: Herstellung von 1-mL-Proben aus Kulturmedien mit doppeltem Gehalt an Stimulatoren und aus Zellsuspension mit doppeltem Serumgehalt und doppelter Zelldichte.**

500  $\mu$ L RPMI-1640

- ohne Zusatz bzw. mit 500  $\mu$ L RPMI-1640
- $2 \times 10^{-7}$  M CRH bzw. + 20 % FBS
- 50  $\mu$ g (100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) LPS bzw. Zelldichte  $1 \times 10^6$  mL<sup>-1</sup>
- 0,8 % w/v NaCl



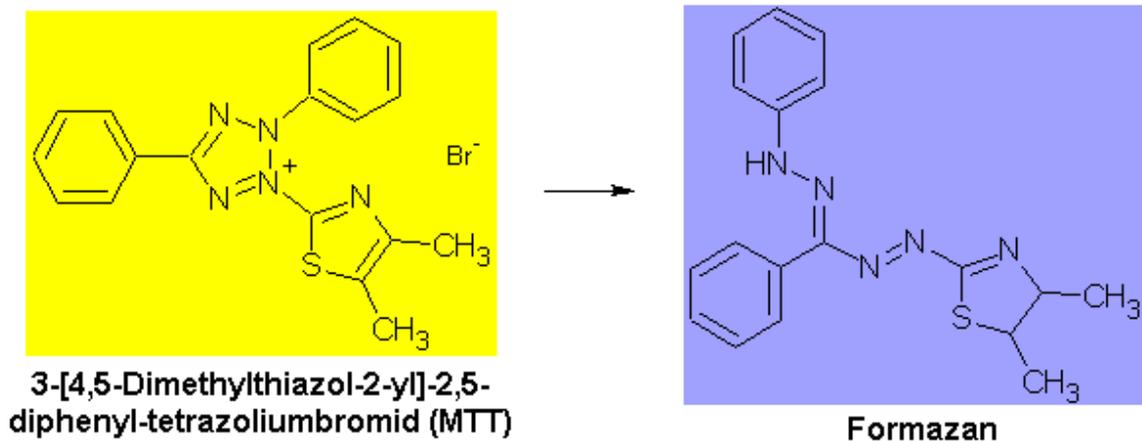
1000  $\mu$ L RPMI-1640 mit 10 % FBS, Zelldichte  $5 \times 10^5$  mL<sup>-1</sup>

- ohne Zusatz bzw. mit
- $10^{-7}$  M CRH bzw.
- 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> LPS bzw.
- 0,4 % w/v NaCl,

in Vorversuchen

- 0,225 / 0,45 / 0,675 / 0,9 % w/v NaCl bzw.
- $10^{-8}$  M /  $10^{-7}$  M Dexamethason.

Die Stoffwechselaktivität der PBMC aus sechs Blutspenden unter Einfluß von komplettem Medium mit Zusätzen von 0,225 / 0,45 / 0,675 bzw. 0,9 % w/v NaCl wurde in 200- $\mu$ L-Ansätzen in Flachboden-MTP mit 96 Wells untersucht. Sechsfach-Ansätze wurden für die letzten 4 h der Kultur mit je 10  $\mu$ L der (gelben) MTT-Arbeitslösung versetzt. Nach Ablauf der Inkubation und mikroskopischer Prüfung auf (blauviolette) Formazan-Kristalle (Abb. 5, S. 38) wurden die Zellen lysiert und das entstandene Formazan in Lösung gebracht. Die optische Dichte (OD) wurde mit dem ELISA-Reader bei einer Testwellenlänge von 550 nm mit einer Hintergrundsubtraktion bei 690 nm gemessen (MOSMANN, 1983; LINDL & BAUER, 1994), die Daten in Microsoft Excel übertragen und ausgewertet. Im Anschluß daran wurde gleicher Weise die Stoffwechselaktivität unter Einfluß von NaCl (+ 0,4 % w/v) bzw. LPS (50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) untersucht.



**Abb. 5: Strukturen von MTT und seinem Metaboliten Formazan**

Die Proben für die ACTH-Detektion wurden entweder direkt in 24-Well-Kulturplatten angesetzt, oder in silikonisierten Glasröhrchen und dann in 24-Well-Kulturplatten aufgestellt, in die zu diesem Zweck geeignete Stopfen eingepaßt waren. Im letzteren Fall waren auf den Ecken der Kulturplatten gleichhohe Plastikröhrchen in zwei übereinandersitzenden Stopfen aufgestellt. Diese hielten den Deckel der Kulturplatte auf Abstand zur Oberseite der Kulturröhrchen, so daß im Inkubator ungehinderter Gasaustausch mit den Proben sichergestellt war. Die Platten wurden zum Schutz vor Kontamination mit Frischhaltefolie verpackt (Abb. 6, S. 39).



pumpe und Saugflasche abgenommen, das Zellpellet aufgeklopft und in 2 mL Formaldehyd-Fixativ über 20 min bei RT fixiert. Nach Auffüllen mit 3 mL PBS wurde wieder 10 min mit  $2000 \text{ min}^{-1}$  bei RT zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Zellpellet aufgeklopft und in 1 mL PBS / 0,5 % BSA / 0,01 %  $\text{NaN}_3$  bis zur Markierung für die Durchflußzytometrie konserviert.

### 2.1.2 Zellkultur mit Vollblut

In diesem Ansatz wurde ein definiertes Volumen des Spenderblutes für 5 h in Zellkulturmedium mit ACTH-Induktoren inkubiert und nach Lysieren der Erythrozyten und Fixierung konserviert aufbewahrt.

**Tab. 6: Materialien für die Zellkultur mit komplettem Blutspendematerial,** die zusätzlich zu den in Kap. 2.1.1, S. 32, aufgezählten Posten gebraucht wurden.

Material	Spezifikation, Bezugsquellen, Formulierung
Eppendorf-Caps	Reaktionsgefäße, 1,5 mL, Eppendorf
Lyselösung	FACS™ Lysing Solution (Becton Dickinson, Heidelberg, Prod.-Nr. 92-0002), aus $10\times$ Stammlösung mit <i>Aqua ad iniect.</i> verdünnt

In 1,5-mL-Reaktionsgefäßen wurden je 850  $\mu\text{L}$  Medium bzw. Medium mit Stimulatoren für die vorgesehenen Endkonzentrationen (s. Kap. 2.1.1) bezogen auf 1000  $\mu\text{L}$  vorbereitet. Je 100  $\mu\text{L}$  Blutspendematerial wurden hinzupipettiert, behutsam durchmischt und in 24-Well-Kulturplatten mit eingepaßten Stopfen aufgestellt. Die offenen Deckel der Reaktionsgefäße hielten den Deckel der Kulturplatte auf Abstand zur Oberseite, so daß im Inkubator ungehinderter Gasaustausch mit den Proben sichergestellt war. Die Kulturplatte wurde mit Frischhaltefolie verpackt. Nach 3 h wurden je 50  $\mu\text{L}$  Monensin zu einer Endkonzentration von  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  für die letzten 2 h hinzugegeben (Tab. 7, S. 41).

**Tab. 7: Herstellung von 1-mL-Proben aus Kulturmedien ohne bzw. mit Stimulatoren und Vollblut.**

850 $\mu\text{L}$ RPMI-1640	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• ohne Zusatz bzw. mit</li> <li>• <math>1,18 \times 10^{-7}</math> M CRH bzw. + 100 <math>\mu\text{L}</math> Blutspendematernal</li> <li>• <math>58,83 \mu\text{g mL}^{-1}</math> LPS bzw.</li> <li>• 0,47 % w/v NaCl</li> </ul>	
⇓	
950 $\mu\text{L}$ RPMI-1640	nach 3 h:
<ul style="list-style-type: none"> <li>• ohne Zusatz bzw. mit</li> <li>• <math>1,05 \times 10^{-7}</math> M CRH bzw.</li> <li>• +</li> <li>• <math>52,63 \mu\text{g mL}^{-1}</math> LPS bzw.</li> <li>• 0,42 % w/v NaCl</li> </ul>	50 $\mu\text{L}$ RPMI-1640 mit 20 $\mu\text{M}$ Monensin, in Vorversuchen Kontrollen ohne Monensin
⇓	
1000 $\mu\text{L}$ RPMI-1640	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• ohne Zusatz bzw. mit</li> <li>• <math>1 \times 10^{-7}</math> M CRH bzw.</li> <li>• <math>50 \mu\text{g mL}^{-1}</math> LPS bzw.</li> <li>• 0,4 % w/v NaCl</li> </ul>	

Nach Ablauf der Inkubation wurden die Kulturröhrchen 10 min mit  $2000 \text{ min}^{-1}$  bei RT zentrifugiert, der Überstand mit Vakuumpumpe und Saugflasche abgenommen, das Zellpellet aufgeklopft, in 1 mL Lyselösung 15 min bei RT fixiert und die Erythrozyten lysiert. Nach 10min Zentrifugation mit  $2000 \text{ min}^{-1}$  bei RT wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet aufgeklopft und in 1 mL PBS / 0,5 % BSA / 0,01 %  $\text{NaN}_3$  bis zur Antigen-Markierung für die Durchflußzytometrie konserviert.

## 2.2 Markierung und Detektion von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) und Zelldifferenzierungsmarkern (CD)

### 2.2.1 Markierung von ACTH und CD

Das Adrenocorticotrope Hormon wurde nach Permeabilisierung der Zellmembranen markiert, wodurch sowohl intrazellulär vorliegendes als auch gegebenenfalls in Membranrezeptoren extrazellulär gebundenes ACTH erfaßt wurde.

**Tab. 8: Materialien für die Markierung und Detektion von ACTH und Immunphänotypen.**

Material	Spezifikation, Bezugsquellen, Formulierung	
Probenröhrchen	Falcon® 2052, 12 × 75 mm, Rundboden, mit Verschuß, steril, Becton Dickinson	
Permeabilisierungslösung aus		
• Waschlösung	PBS mit BSA und NaN <sub>3</sub> , s. Kap. 2.1.1 mit 0,5 % Saponin aus <i>Quillaja saponaria</i> , Sigma, Prod.-Nr. S-2149	
• Saponin	0,5 % w/v Saponin aus <i>Quillaja saponaria</i> , Sigma, Prod.-Nr. S-2149	
Antikörper (Ab)	Spezifität, Klon, Ig-Isotyp	Bezugsquelle, Produktnummer
• anti-( $\alpha$ )ACTH-Antikörper	gegen C-terminales Epitop, Klon 02A3, mu-IgG <sub>1</sub>	DAKO, Hamburg, M-3501
	gegen C-terminales Epitop, Klon 56, mu-IgG <sub>1</sub>	Biodesign, Saco / Maine, USA, über Dunn Labortechnik, Asbach, E54056M
	gegen N-terminales Epitop, Klon 57, mu-IgG <sub>1</sub>	Biodesign → Dunn, E54057M
• Isotyp-Kontrolle	$\alpha$ <i>Aspergillus-niger</i> -Glucose-Oxidase, Klon DAK-GO1, mu-IgG <sub>1</sub> $\kappa$	DAKO, X 0931

**Tab. 8: Materialien für die Markierung und Detektion von ACTH und Immunphänotypen.**

Material	Spezifikation, Bezugsquellen, Formulierung
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sekundär-antikörper</li> </ul>	Kaninchen- $\alpha$ mu-Ig, F(ab) <sub>2</sub> , FITC-konjugiert, aus Kaninchen DAKO, F 0313  Kontrolle: Präimmun-F(ab) <sub>2</sub> , FITC-konjugiert, aus Kaninchen DAKO, X 0929  $\alpha$ mu-IgG <sub>1</sub> FITC, Klon A85-1, IgG <sub>1</sub> $\kappa$ aus Ratte Becton Dickinson / Pharmingen, 553443
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Monozyten-marker</li> </ul>	$\alpha$ CD14 PE, Klon M $\Phi$ P9, Becton Dickinson, 347497 mu-IgG2b $\kappa$
<ul style="list-style-type: none"> <li>• B-Lymphozyten-Marker</li> </ul>	$\alpha$ CD20 PE, Klon B-H20, Diaclone, Besançon, Frankreich, über Hölzel Diagnostika, Köln, 854.152.010 mu-IgG2a
Kalibrierungspartikel	CaliBRITE™-Beads, Becton Dickinson, Prod.-Nr. 340486
Datenakquisition	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Durchflußzytometer</li> </ul>	FACScan, Gerät Nr. 82776, Becton Dickinson, mit Argonionen-Laser, Emissionswellenlänge $\lambda = 488$ nm, 2 Streulichtparameter, Standard-Filtersatz für 3 Fluoreszenzparameter
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Computer</li> </ul>	Apple Macintosh Quadra 650, Apple Computer GmbH, Feldkirchen
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Betriebssystem</li> </ul>	MacOS 7.6.1
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Software</li> </ul>	FACSCComp für die Kalibration des Durchflußzytometers; CELLQuest 3.3 für die Datenakquisition
Auswertung der durchflußzytometrischen Daten	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Computer</li> </ul>	PC, CPU Intel Pentium III, 128 MB RAM

**Tab. 8: Materialien für die Markierung und Detektion von ACTH und Immunphänotypen.**

Material	Spezifikation, Bezugsquellen, Formulierung
• Betriebssystem	Microsoft Windows 98 SE
• Software	WinMDI 2.8.13 vom 19.01.2000, Joseph Trotter, The Scripps Research Institute, FACS Core Facility, La Jolla, CA 92037, USA <a href="http://facs.scripps.edu/software.html">http://facs.scripps.edu/software.html</a> für das Gating und Auslesen durchflußzytometrischer Daten
	Microsoft Word 97 SR-1 für die makrogestützte Umwandlung von Tabulatoren in Zeilenvorschübe
	Microsoft Excel 97 SR-1 für die Sammlung, Transformation und deskriptiv-statistische sowie Vorbereitung der analytisch-statistischen Auswertung

Jede Probe wurde in Aliquots zu je 300 µL auf drei Probenröhrchen für die durchflußzytometrische Bestimmung der Autofluoreszenz sowie der Fluoreszenz durch den Sekundärantikörper und nach spezifischer Färbung aufgeteilt. In Vorversuchen wurden darüber hinaus Isotypkontrollen mitgeführt und die Mengen an Primär- und Sekundärantikörper variiert. Diese vorbereitenden Untersuchungen wurden überwiegend mit dem monoklonalen Antikörper gegen ACTH ( $\alpha$ ACTH-mAb) von DAKO (M 3501) und dem F(ab)<sub>2</sub>-FITC gegen murines Ig (DAKO F 0313) durchgeführt.

Im ersten Schritt wurden die für die ACTH-Detektion vorgesehenen Proben mit je 20 µL einer Arbeitslösung aus einem Volumen  $\alpha$ ACTH-mAb mit drei Volumina Permeabilisierungslösung und die Kontrollen mit einem entsprechenden Volumen ohne Antikörper versetzt. Nach 30min Inkubation bei 4 °C wurde mit je 2 mL Permeabilisierungslösung aufgefüllt und 10 min bei 4 °C mit 2000 min<sup>-1</sup> zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet aufgeklopft, wieder mit je 2 mL Permeabilisierungslösung aufgefüllt und abermals 10 min bei 4 °C mit 2000 min<sup>-1</sup> zentrifugiert (Inkubation des Primärantikörpers und

zweimaliges Waschen). Nachdem der Überstand abgesaugt und das Zellpellet aufgeklöpft worden war, wurde mit je 100  $\mu\text{L}$  Permeabilisierungslösung aufgefüllt.

Im zweiten Schritt wurden wieder je Probe 20  $\mu\text{L}$  Antikörperlösung vorbereitet, die für Vorversuche anteilig vom  $\text{F(ab)}_2\text{-FITC}$  4  $\mu\text{L}$  bzw. für die Hauptversuche vom  $\alpha\text{IgG}_1\text{-FITC}$  0,4  $\mu\text{L}$  enthielten. Nach Inkubation der ACTH- und Referenzproben mit dieser Färbelösung bzw. der Autofluoreszenzproben mit 20  $\mu\text{L}$  reiner Permeabilisierungslösung für 30 min bei 4 °C wurde zweimal wie oben beschrieben gewaschen. Abschließend wurde das Zellpellet jeweils in 200  $\mu\text{L}$  Waschlösung ohne Saponin aufgenommen und, bis zur durchflußzytometrischen Analyse innerhalb von 30 min, im Eiswasserbad bei Dunkelheit aufbewahrt.

### *2.2.2 Durchflußzytometrische Analyse*

Die Proben wurden im kalibrierten Durchflußzytometer bei hohem Durchfluß gemessen. Es wurden je Probe 20 000 Ereignisse akquiriert. Der Schwellenwert für das Vorwärtsstreulicht wurde knapp unterhalb einer für kleine Lymphozyten typischen Mindestintensität gesetzt. Die Intensitätswerte für alle drei Fluoreszenzparameter wurden erfaßt. Dadurch stand ein Autofluoreszenzwert in den ACTH- und den Referenzproben auch dann zur Verfügung, wenn zwei unterschiedlich fluorochromierte Antikörper, z.B.  $\alpha\text{ACTH}/\alpha\text{IgG}_1\text{-FITC}$  +  $\alpha\text{CD14-PE}$ , parallel eingesetzt wurden. Die Daten der fünf Parameter wurden im Listmode-Format gespeichert.

## **2.3 Aufbereitung der durchflußzytometrischen Daten**

### *2.3.1 Spezifische Auswahl und Transfer*

Aus den Daten wurden in WinMDI Dotplots generiert. In den Scatterplots wurden Regionen auf Ereignisse mit jeweils typischen Streulichteigenschaften für Lymphozyten, Monozyten und - im Falle der Stimulation von komplettem Blutspendematernal - neutrophile Granulozyten gelegt. Nach Gating dieser Populationen wurden in den jeweiligen Fluoreszenzplots Regionen auf alle Ereignisse mit für morphologisch intakte Zellen charakteristischen Autofluoreszenzwerten gelegt.

Durch Gating einer Schnittmenge aus Ereignissen mit geeigneten Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften konnten dann die Inhalte der Histogramme für Fluoreszenz 1, den "ACTH-Parameter", auf die aussagekräftigen Werte begrenzt werden (s. Abb. 3, S. 31).

Die Resultate der Vorversuche wurden qualitativ anhand der übereinandergeblendeten Histogramme (*histogram overlay*) beurteilt. Dabei sollte das Referenzsignal des Sekundärantikörpers möglichst gut mit der Autofluoreszenz übereinstimmen, während sich das Signal des kompletten Detektionssystems aus  $\alpha$ ACTH-mAb und Sekundärantikörper möglichst deutlich von der Referenz abheben sollte.

Aus den Histogrammen der Hauptversuche wurden die auf die verschiedenen Kanäle entfallenen Häufigkeiten als tabulierte ASCII-Textdatei ausgelesen. Die Tabulatorbefehle wurden in MS Word mit Hilfe einer Makro-Routine in Zeilenvorschübe umgewandelt, wodurch ein Datenimport in Tabellenspalten von MS-Excel-Arbeitsblättern möglich wurde. Ein Direktimport aus dem tabulierten Format wäre dagegen wegen der zu geringen Zeilenlänge in Excel nicht erfolgreich gewesen. Die Daten der beiden experimentellen Grundansätze der Hauptversuche, 18h PBMC-Stimulation bzw. 5h Stimulation des kompletten Zellmaterials, wurden in jeweils einer Datei erfaßt. Jede dieser Dateien beruht somit auf Rohdaten aus 144 Listmode-Dateien. Der jeweilige Proband ist in der ersten Spalte des Tabellenblatts ausgewiesen, die fortlaufenden Kanalnummern der Histogramme in der nächsten Spalte. Die Spaltenköpfe geben Auskunft über die analysierte Zellart sowie den zugrundeliegenden experimentellen Ansatz und den Markierungszustand der Probe. Die Anzahl der Ereignisse je untersuchter Zellpopulation ist als kumulierte Häufigkeit über den nach individuellem Kanal aufgelisteten Ereignissen wiedergegeben (Abb. 8, S. 47).

	A	B	C	D	E	F	G	H	
1	Zellart		Lymphozyten			Lymphozyten			
2	Stimulation		Kontrolle 1			Kontrolle 2			
3	Proband	Kanal	Autofluor.	2nd Step	ACTH-Signal	Autofluor.	2nd Step	ACTH-Signal	Aut
4	Ereignisse		4230	4438	4469	4176	4233	4205	
5	1	1	3	0	0	0	0	0	0
6	1	2	0	0	0	0	0	0	0
7	1	3	0	0	0	0	0	0	0
8	1	4	0	0	0	0	0	0	0
9	1	5	0	0	0	0	0	0	0
10	1	6	0	0	0	0	0	0	0
11	1	7	0	0	0	0	0	0	0
12	1	8	0	0	0	0	0	0	0
13	1	9	0	0	0	0	0	0	0
14	1	10	0	0	0	0	0	0	0
15	1	11	0	0	0	0	0	0	0

**Abb. 8: Erfassung und Zuordnung der Ereignishäufigkeiten je Fluoreszenzkanal**

### 2.3.2 Datentransformation und Bestimmung der mittleren relativen Fluoreszenzintensität

Jeder der 1024 Kanäle entspricht einer Intensitätsklasse der relativen Fluoreszenz. Diese relativen Fluoreszenzintensitäten sind einem logarithmisch in vier Dekaden bis  $10^4$  eingeteilten Bereich zugeordnet, in dem der Kanal (K) 256 die Fluoreszenzintensität (FI)  $10^1$ , K 512  $\rightarrow$  FI  $10^2$ , K 768  $\rightarrow$  FI  $10^3$  und K 1024  $\rightarrow$  FI  $10^4$  repräsentiert. Allgemein wird dieser Zusammenhang durch die Gleichung

$$FI = 10^{\left(\frac{K}{256}\right)}$$

beschrieben. In einem weiteren Tabellenblatt wurden die Kanalnummer auf Basis dieser Gleichung in Intensitäten umgerechnet und mit den zugehörigen Häufigkeiten zu Gesamtintensitäten pro Kanal multipliziert. Diese wurden zur totalen relativen Fluoreszenzintensität aufsummiert, aus der sich nach Division durch die Gesamtzahl der Ereignisse die mittlere relative Fluoreszenzintensität als Maß für die ACTH-Expression ergab (Abb. 9, S. 48).

Zur Bereinigung des mittleren relativen Fluoreszenzwertes wurde von dem Ergebnis aus der Probe mit  $\alpha$ ACTH-Antikörper plus Sekundärantikörper der entsprechende Mittelwert des Hintergrundes (= Sekundärantikörper alleine) subtrahiert. Die beiden bereinigten Ergebnisse der Doppelbestimmung wurden gemittelt.

B5		=10^(18hroh!B5/256)						
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Zellart		Lymphozyten			Lymphozyten		
2	Stimulation		Kontrolle 1			Kontrolle 2		
3	Proband	Intensität	Autofluor.	2nd Step	ACTH-Signal	Autofluor.	2nd Step	ACTH-Signal
4	Gesamtfluoreszenz		38,7115354	122,269401	262,212971	39,8073789	79,4057989	216,829018
5	1	1,009	3,0271051	0	0	0	0	0
6	1	1,018	0	0	0	0	0	0
7	1	1,027	0	0	0	0	0	0
8	1	1,037	0	0	0	0	0	0
9	1	1,046	0	0	0	0	0	0
10	1	1,055	0	0	0	0	0	0
11	1	1,065	0	0	0	0	0	0
12	1	1,075	0	0	0	0	0	0

**Abb. 9: In Fluoreszenzintensitäten transformierte Häufigkeitswerte aus Histogrammen**

### 2.4 Statistische Auswertung

Die Daten aus der MTT-basierten Analyse des Zellstoffwechsels und aus den Stimulationsexperimenten wurden mit Hilfe des verteilungsunabhängigen Vorzeichen-Rangtests nach Wilcoxon auf statistische Abweichungen im Vergleich mit den Kontrollexperimenten untersucht. Bei der Fallzahl von 6 Probanden und einem Signifikanzniveau von 0,95 ( $r[6; 0,975] = 0$ ) ist dieses Kriterium erfüllt, wenn alle Differenzwerte das gleiche Vorzeichen haben und damit die Rangsumme gleich der Summe der Ränge ist (WERNER, 1984).

### 2.5 Bewertung der Daten als leistungsphysiologische Parameter

Im Rahmen der leistungsphysiologischen Anpassungsreaktion wird, neben anderen Neuropeptiden, ACTH in Leukozyten induziert. Sofern sich der Anstieg der Expression intrazellulär in einer Zunahme des Antigens widerspiegelt, sollte durchflußzytometrisch eine höhere mittlere relative Fluoreszenzintensität detektierbar sein.

### 3 Ergebnisse

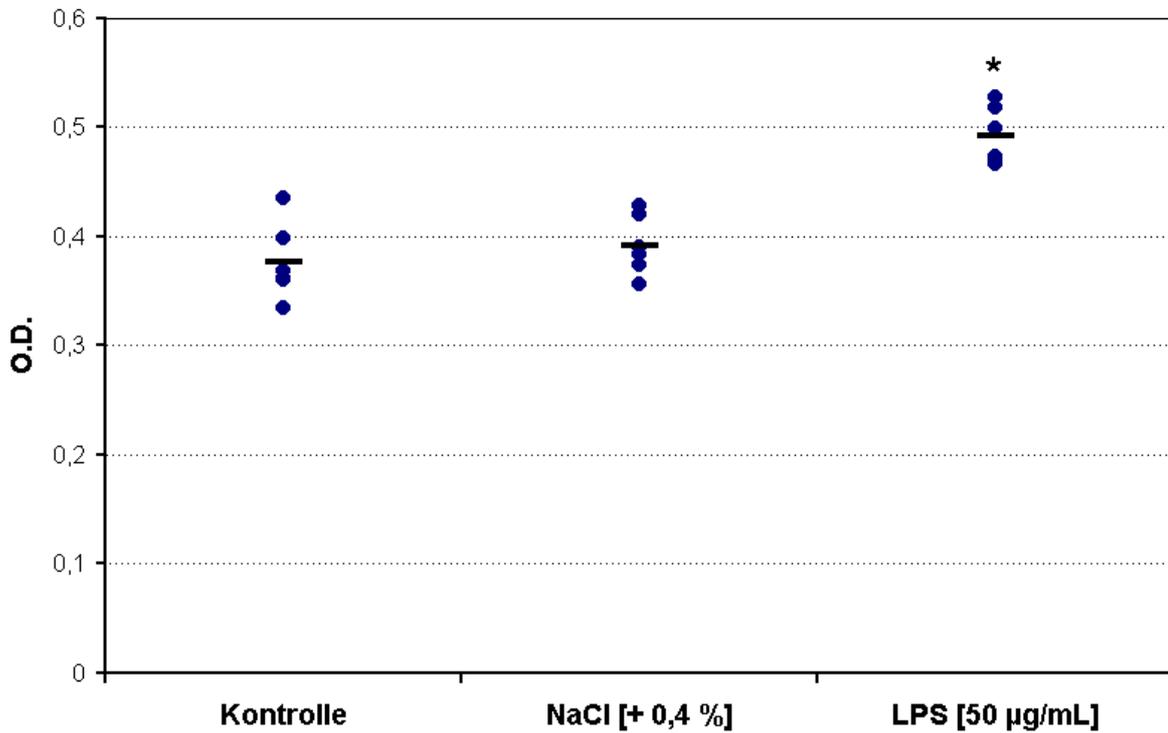
Die Vorversuche betrafen die Funktionalität und Spezifität des durchflußzytometrischen Detektionssystems sowie den Zellstoffwechsel unter leistungsphysiologischer Stimulation. Die durchflußzytometrischen Daten wurden qualitativ anhand übereinandergelegter Histogramme, der MTT-Test quantitativ photometrisch ausgewertet. Die Hauptversuche dienten dazu, die Höhe der Corticotropin(ACTH)-Basisexpression, die Stimulierbarkeit durch Corticoliberin (CRH) und den Einfluß spezifischer Induktoren halbquantitativ einzuschätzen. Zu diesem Zweck wurden die um das Hintergrundsignal bereinigte, mittleren relativen Fluoreszenzintensitäten bestimmt.

#### 3.1 Ergebnisse der Vorversuche

Der Zellstoffwechsel wurde sowohl vom NaCl-hyperosmolaren Medium als auch durch LPS beeinflusst. Die in Vierteln bis auf ein zusätzliches isotonisches Äquivalent ansteigenden Salzkonzentrationen hatten nach 4h Inkubation bei + 0,225 % und +0,45 % geringe Auswirkungen auf die Metabolisierung von MTT durch die Leukozyten (92 bzw. 89 % der optischen Dichte (OD) der Kontrolle). Bei + 0,675 % und 0,9 %, war der Stoffwechsel deutlich gedämpft (58 bzw. 53 % OD), wobei vor der Auflösung mikroskopisch keine Formazan-Kristalle mehr erkennbar waren.

Die aus diesem Ergebnis für die weiteren Experimente abgeleitete Konzentration von + 0,4 % NaCl führte nach 18h Inkubation zu geringen,  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  LPS zu einer signifikant gesteigerten Formazanbildung (104 % bzw. 131 % OD).

Die Vorversuche wurden hauptsächlich mit dem gegen den C-Terminus von ACTH gerichteten Antikörper, dem FITC-gekoppelten F(ab)<sub>2</sub>-Fragment gegen murines Ig sowie den entsprechenden Isotyp-Kontrollen von DAKO durchgeführt. Verglichen mit Signalen aus der Markierung immunphänotypischer Antigene (CD) oder auch höher exprimierter Cytokine, wie z.B. Interferon- $\gamma$ , hob sich das Signal nur schwach von der Referenz ab. Daher wurden größere Antikörpermengen, gemessen an der Zellzahl der Proben bis zum 6fachen des für CD oder Cytokine Üblichen, eingesetzt.



**Abb. 10: Zellstoffwechsel von PBMC im MTT-Test nach Kultur in hyperosmolarem Medium [+ 0,4 % NaCl] bzw. LPS [50 µg mL<sup>-1</sup>], p < 0,05**

Die Fluoreszenz-Intensitäten (FI) aus den Isotyp-Kontrollansätzen lagen im Bereich der Referenzsignale [ $\alpha\mu$ -Ig-F(ab)<sub>2</sub>-FITC bzw.  $\alpha\mu$ -IgG<sub>1</sub>-FITC alleine]. Somit scheint keine wesentliche unspezifische Antikörperbindung stattgefunden zu haben. Die Fluoreszenz nahm nach CRH-Applikation zu und unter Einfluß von Dexamethason dosisabhängig ab (Abb. 11, S. 51).

Aus den einschlägigen Stimulationszeiten wurden 18 h und 42 h ausgewählt. Die längere Inkubation ergab keine weitere Zunahme der FI. Auch führten die Inhibitoren des Golgi-Apparates Monensin und Brefeldin A hier zu keiner Intensivierung, sondern zur Suppression der Fluoreszenz. Keine erkennbare ACTH-Expression lag nach Stimulation von 20 % komplettem Blutspendematernal in 80 % Zellkulturmedium in 24-Well-Zellkulturplatten über 18 bzw. 42 h vor.

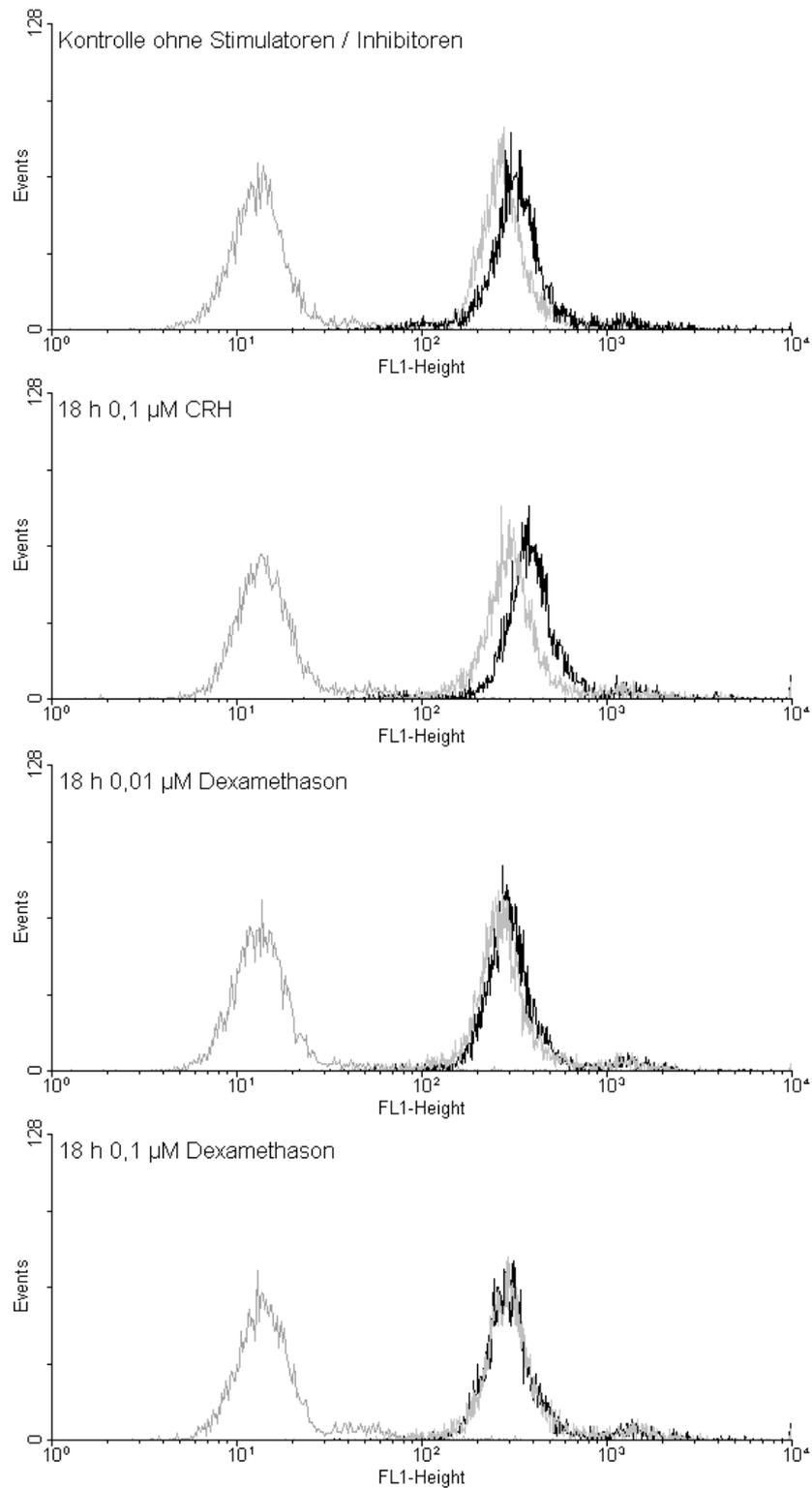


Abb. 11: **Durchflußzytometrische Detektion von Adrenocorticotropem Hormon in sezernierenden peripheren mononukleären Leukozyten mit Induktion durch Corticoliberin und Suppression durch Dexamethason.** Grau: Autofluoreszenz (links) bzw. Referenz (Sekundärantikörper), schwarz: ACTH-Signal.

Zum Abschluß der Vorversuche wurden vergleichende Untersuchungen mit drei für ACTH spezifischen monoklonalen Antikörpern durchgeführt. Der Klon 56 von Biodesign gegen ACTH-C-Terminus zeigte die deutlich günstigsten Bindungseigenschaften. Im direkten Vergleich rief Klon 02A3 von DAKO gegen ACTH-N-Terminus unter 5 % und Klon 57 von Biodesign gegen ACTH-C-Terminus weniger als 10 % der entsprechenden mittleren FI (MFI) hervor.

Der Sekretionsinhibitor Monensin führte in den Kulturen mit mononukleären Leukozyten über 18 h wiederum zu keiner Signalverstärkung. In 1-mL-Kulturen aus 10 % komplettem Blutspendematerial und 90 % Zellkulturmedium mit 5stündiger Stimulation bewirkte eine Monensin-Applikation über die letzten 2 h erhöhte Fluoreszenz, wohingegen eine Einwirkung über die gesamte Inkubationsdauer zu ausgeprägtem Zelluntergang führte.

Zum Abschluß der Vorversuche wurde beim Sekundärantikörper auf den spezifisch gegen murines IgG<sub>1</sub> gerichteten Klon umgestellt, der ohne erkennbare Kreuzreaktivität zusammen mit phänotypspezifischen nicht-IgG<sub>1</sub>-mAb eingesetzt werden konnte.

### **3.2 Ergebnisse der Hauptversuche**

Die Ergebnisse der Hauptversuche mit mononukleären Leukozyten nach Dichtegradienten-Zentrifugation (PBMC) bzw. mit komplettem Blutspendematerial sind in Tab. 9, S. 53, und in Abb. 12, S. 54, bzw. Abb. 13, S. 55, dargestellt.

Die Reaktivitäten der einzelnen Spendermaterialien waren heterogen und die durchschnittliche Basisexpression in den Kontrollen vergleichsweise hoch (min. 55 % der Intensität nach Stimulation). Beide Protokolle erbrachten tendenziell ähnliche Ergebnisse. Die kürzere Stimulation mit Komplettermaterial und Monensin ergab um ca. den Faktor 1,5 (Lymphozyten) bis 2 (Monozyten) höhere, mittlere relative Fluoreszenzintensitäten als der PBMC-Ansatz.

Keiner der Stimulatoren verursachte eine durchgehend konsistente Veränderung der Meßwerte. Im Vorzeichen-Rangtest nach Wilcoxon waren die Rangsummen in jedem Fall kleiner als die Gesamtsumme der Ränge, so daß sich auch bei deutlicher durchschnittlicher Signalzunahme keine statistische Signifikanz ergab.

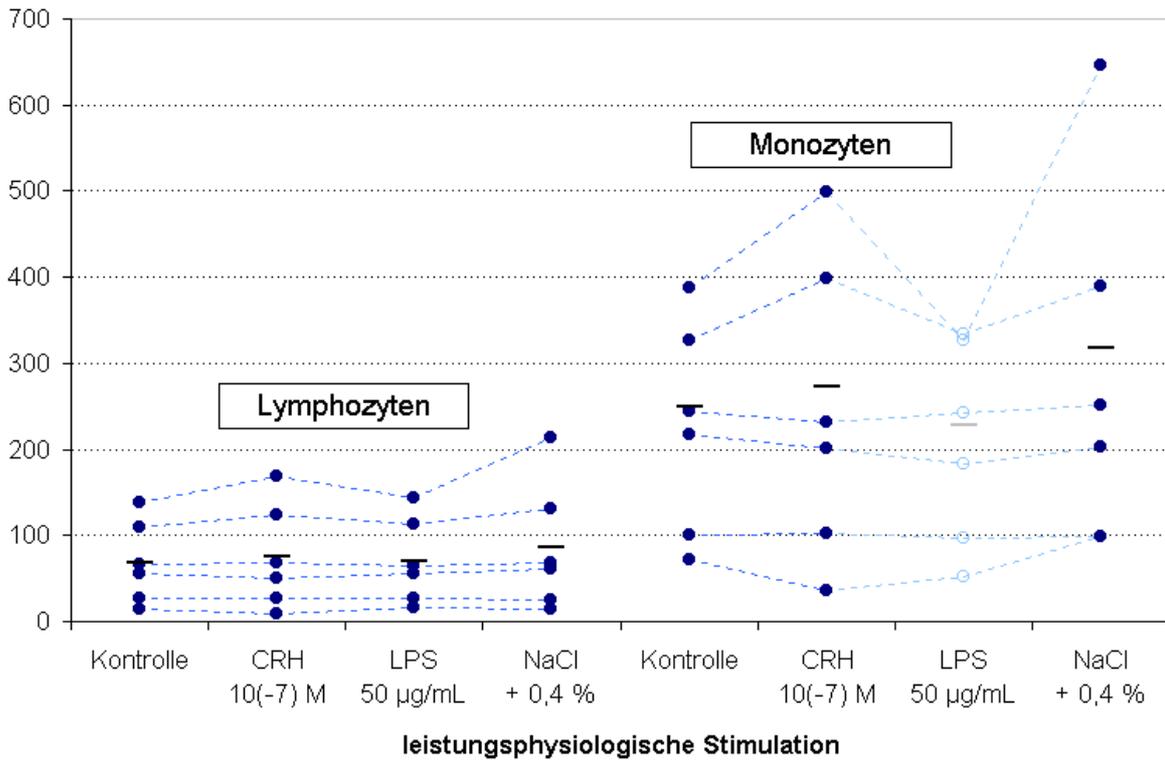
**Tab. 9: ACTH-Expression in unstimulierten sowie mit CRH, LPS und NaCl stimulierten Leukozyten, durchschnittliche [n = 6] mittlere relative Fluoreszenzintensität aus der Durchflußzytometrie.**

	PBMC 18 h		Komplettmaterial 5 h, 2 h Monensin [1 µM]	
	Lymphozyten	Monozyten	Lymphozyten	Monozyten
<b>Kontrolle</b>	68,9	249,0	163,4	320,2
<b>CRH</b> [ $10^{-7}$ M]	74,6	273,4	165,6	578,4
<b>LPS</b> [50 µg mL <sup>-1</sup> ]	70,0	(227,5)	174,2	-
<b>NaCl</b> [+ 0,4 %]	85,5	317,9	166,5	567,3

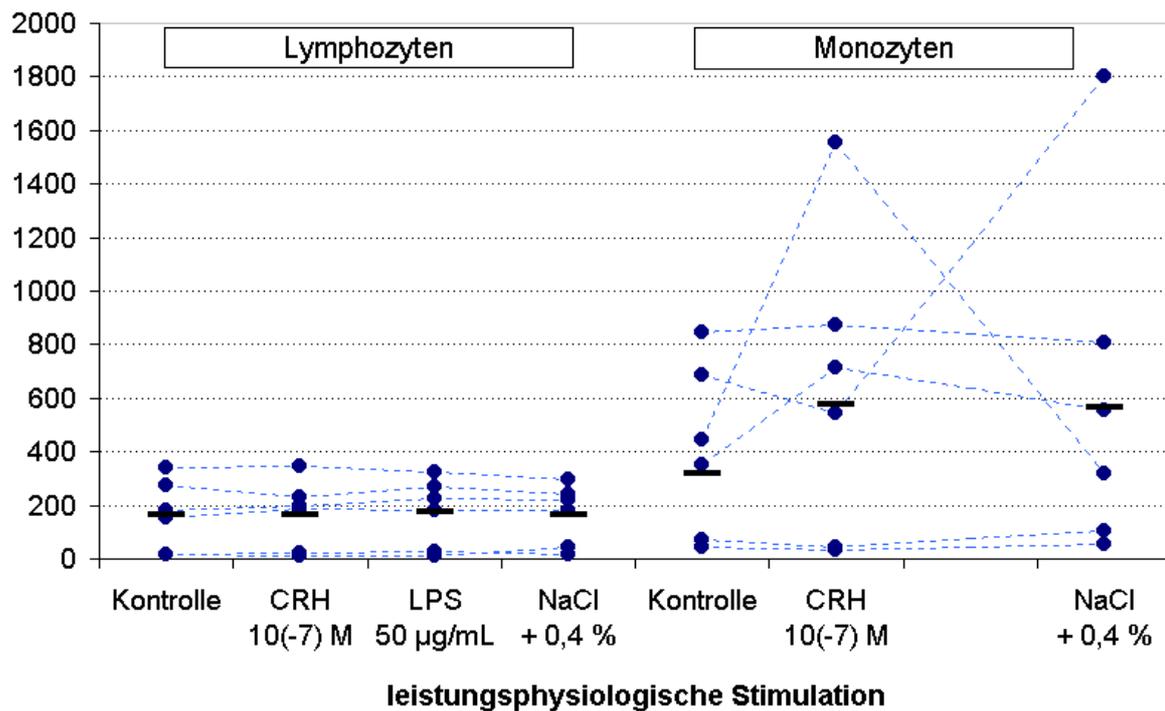
PBMC und Vollblut von jeweils 6 unabhängigen Spendern; der eingeklammerte Wert LPS-stimulierter Monozyten ist methodisch unsicher. Abkürzungen: PBMC = periphere mononukleäre Leukozyten, CRH = Corticotropin Releasing Hormon, LPS = Lipopolysaccharid (aus *Escherichia coli* 055:B5)

Die ACTH-Expression nach Stimulation mit 50 µg mL<sup>-1</sup> LPS wich bei den Lymphozyten jeweils nicht bzw. nicht erkennbar positiv (vergl. Kap. 2.5; S. 48) von der Basisexpression ab. Eine Monozytenpopulation war anhand ihrer Streulicht-Eigenschaften praktisch nicht mehr erkennbar. Daher sind die in Tab. 9, S. 53, und Abb. 12, S. 54, wiedergegebenen Werte aus den wenigen passenden Ereignissen nur als Hinweis aufzufassen. Eine Immunphänotypisierung schlug ebenfalls fehl, da im Gegensatz zur Kontrolle und den übrigen Stimulationen in den LPS-induzierten Proben kein CD14 identifizierbar war.

ACTH-Expression als mittlere relative Fluoreszenzintensität



**Abb. 12:** ACTH-Expression in 18 h mit CRH [ $10^{-7}$  M], LPS [ $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ], und NaCl [+ 0,4 % hyperosmolar] stimulierten, sezernierenden peripheren mono-nukleären Leukozyten, gemessen als durchschnittliche [ $n = 6$ ] mittlere relative Fluoreszenzintensität im Durchflußzytometer. Linien verbinden jeweils zum selben Probanden gehörende Meßwerte; Balken kennzeichnen Mittelwerte; Werte LPS-stimulierter Monozyten sind methodisch unsicher; Abkürzungen: CRH = Corticotropin Releasing Hormon, LPS = Lipopolysaccharid (aus *Escherichia coli* 055:B5), MFI = mittlere relative Fluoreszenzintensität

**ACTH-Expression als mittlere relative Fluoreszenzintensität**

**Abb. 13:** ACTH-Expression in 5 h mit CRH [ $10^{-7}$  M], LPS [ $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ], und NaCl [+ 0,4 % hyperosmolar] stimulierten mononukleären Leukozyten aus Vollblut, gemessen als durchschnittliche [ $n = 6$ ] relative Fluoreszenzintensität im Durchflußzytometer. Linien verbinden jeweils zum selben Probanden gehörende Meßwerte; Balken kennzeichnen Mittelwerte; Abkürzungen: CRH = Corticotropin Releasing Hormon, LPS = Lipopolysaccharid (aus *Escherichia coli* 055:B5), MFI = mittlere relative Fluoreszenzintensität

Innerhalb der Granulozytenpopulation war keine ACTH-Expression nachweisbar. Ein Vergleich der Signale von Referenz (Sekundärantikörper alleine) mit komplettem Dektektionssystem ergab keine konsistenten Unterschiede.

## 4 Diskussion

Primärkulturen humaner Leukozyten bieten als Bewertungsmodell für Substanzen und Konditionen, die Anpassungsreaktionen im Rahmen der zellulären Leistungsphysiologie induzieren, mehrere Vorteile:

- Leukozyten sind leicht zugänglich, und ihre Gewinnung stellt für gesunde Probanden nur eine minimale Belastung dar.
- Sie liegen in Suspension vor und erfüllen damit eine wichtige Voraussetzung für die durchflußzytometrische Analyse.
- Sie sind eine heterogene Zellpopulation, die in der Durchflußzytometrie anhand ihrer Streulichteigenschaften mikromorphologisch, über ihre charakteristischen membranständigen Differenzierungsantigene immunphänotypisch und funktionell sowie durch die Detektion intrazellulär synthetisierter Mediatoren weiter funktionell differenziert werden kann.
- Leukozyten lassen sich vergleichsweise einfach in Kultur nehmen. Die Reaktionszeiten, innerhalb derer sich Kenngrößen zellulärer leistungsphysiologischer Prozesse verändern, stimmen mit den einschlägigen Zellkulturzeiten für mononukleäre Leukozyten überein.

### 4.1 Aussagefähigkeit von *in-vitro*-Modellen der zellulären Leistungsphysiologie

Da wesentliche Teile der HPA-Achse im Kontext leukozytärer Mikromilieus abgebildet sind, können leistungsphysiologische Anpassungsreaktionen auf zellulärer Ebene *in vitro* bewertet werden. Mit Leukozyten als Repräsentanten des Abwehrsystems kommt den modellierten Prozessen gegebenenfalls eine direkte gesundheitsbezogene Bedeutung zu.

Allerdings sind *in vitro* modellierte Teilaspekte von physiologischen Abläufen, die *in vivo* einer übergeordneten Regulation unterliegen, in ihrer Aussagekraft grundsätzlich eingeschränkt, wenn Rückschlüsse auf den Organismus gezogen werden sollen. Jedoch ist das wissenschaftlich in Nervensystem, Endokrinum und Immunsystem unterteilte Netzwerk zwar komplex reguliert, es scheint in seiner Reaktivität auf erhöhte exogene Anforderungen aber

einem stereotypen Muster unterworfen zu sein. Diese als Adaptationssyndrom bezeichnete physiologische Gesetzmäßigkeit setzt Untersuchungen über reizspezifische Anpassungsreaktionen enge Grenzen (PACAK *et al.*, 1998).

Vor diesem Hintergrund liegt ein Vorteil von leistungsphysiologischen Zellkulturmodellen darin, daß Mediatoren einschließlich der beteiligten Neuropeptide im Zusammenhang eines leukozytären Mikromilieus wirken können. Damit bleiben die Reaktivität auf die darin vorhandenen Akteure bezogen und die ermittelten Effekte auf diesen Kontext beschränkt. So sind unter Umständen wesentlich spezifischere Aussagen möglich, als wenn ein Stimulator systemisch appliziert, also z.B. intravenös injiziert, und ein auf diesen Reiz hin sezernierter Mediator in analoger Weise, etwa als Plasmakonzentration, analysiert wird. Ein Nachteil besteht in der Empfindlichkeit gegenüber den Störgrößen, die durch die Aufarbeitung der Zellen und die Zellkultur eingebracht werden.

## 4.2 Vorversuche und Methodik

Unspezifische, d.h. hier: nicht durch die Stimulatoren bedingte, die ACTH-Expression betreffende Einflüsse sollten in der Zellkultur möglichst ausgeschlossen werden. Daher wurden die Bestandteile des kompletten Zellkulturmediums auf das unbedingt Erforderliche begrenzt.

Als Basis diente RPMI-1640-Medium ohne Phenolrot, das in sterilen, gegen Luftaustausch geschützten Aliquots gelagert wurde. Die pH-Stabilität während der Inkubation wurde durch CO<sub>2</sub>-Begasung unterstützt. Auf Phenolrot als pH-Indikator, das *in vitro* oxidative Vorgänge beeinflusst (DUGAS *et al.*, 2000), wurde verzichtet. Auch das oft eingesetzte 2-Mercaptoethanol wurde nicht verwendet, da es die ACTH-Wirkung auf Leukozyten inhibiert (JOHNSON *et al.*, 1982). Antibiotika waren wegen der kurzen Kulturdauer nicht erforderlich.

Heparin wird als Antikoagulans für PBMC- und Vollblut-Kulturen empfohlen (McCoy Jr., 2001). Insbesondere in Studien zur Wirkung von LPS auf Monozyten ist es Ethylendiamintetraacetat (EDTA) vorzuziehen (BRUNIALTI *et al.*, 2002).

Monozyten sind eine in der zellulären Leistungsphysiologie wichtige Leukozytenpopulation. Mikroskopisch und durchflußzytometrisch war erkennbar, daß ein großer Teil dieser Zellen in den Kulturplatten adhärent geworden und

dadurch selektiv abgereichert worden war. Im Eiswasserbad vorgekühltes Medium bzw. PBS und vorsichtiges Pipettieren brachten wenige Zellen zusätzlich in Suspension und schädigten sie unverhältnismäßig stark. Daher wurde zum Ende der Vorversuche hin und für die Hauptversuche mit PBMC auf silikonisierte Glasröhrchen umgestellt.

Corticoliberin diente in den Vorversuchen der ACTH-Induktion, vor allem aber validierte es die Funktionalität und Spezifität des Detektionssystems. In den Hauptversuchen sollte es ein Standard sein, an dessen Effekt die Wirksamkeit der beiden Stimulatoren LPS und Hyperosmolarität abgeschätzt werden sollte.

Da Hinweise aus der Durchflußzytometrie vorlagen, daß bereits 5 % isotonische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl w/v) im Zellkulturmedium als Stimulator wirken können (SCHWAN & LINSCHIED, unveröffentlicht), wurde, statt eine Stammlösung von Zellkulturmedium unvollständig zu verdünnen (KRAVCHENCO & FURALEV, 1994; Kap. 1.5, S. 22), einer normalen Arbeitslösung NaCl zugesetzt. Aus Untersuchungen zur Intensität des Zellstoffwechsels ergab sich eine Konzentration von + 0,4 % als angemessen.

Vor dem Hintergrund der im Vergleich zum CRH-Effekt hohen intrazellulären ACTH-Basisexpression wurde für die Hauptversuche eine hohe LPS-Konzentration ausgewählt, deren Größenordnung einschlägig als geeignet ausgewiesen war (HARBOUR-McMENAMIN *et al.*, 1985; KRAVCHENCO & FURALEV, 1994; LYONS & BLALOCK, 1995; DOMINGUEZ-GERPE & LEFKOVITS, 1996). Da der Stoffwechsel von Leukozyten, die für 18 h mit  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  LPS inkubiert worden waren, signifikant über dem der Kontrollzellen lag, stand die Vitalität nicht infrage.

In zahlreichen Studien zur Expression von Mediatoren wurden Inhibitoren des Golgi-Apparates eingesetzt, die eine Sekretion der Exportprodukte verhindern und zur intrazellulären Akkumulation des Antigens führen. In Tab. 10, S. 59, sind exemplarisch einige dieser Arbeiten und die darin verwendeten Konzentrationen von Monensin und Brefeldin A aufgeführt. In den Vorversuchen zur ACTH-Stimulation in Leukozyten zeigte sich bei PBMC allgemein ein hemmender Effekt beider Wirkstoffe. Die Signalverstärkung durch Monensin während der letzten beiden Stunden der 5h Kultur von 10 % komplettem Blutspendematernal in 90 %

Zellkulturmedium war trotz der zytotoxischen Wirkung einer 5h Applikation Anlaß, den Golgi-Inhibitor in gleicher Weise während der Hauptversuche einzusetzen.

**Tab. 10: Monensin- und Brefeldin-A-Konzentrationen und Inkubationszeiten zur Sekretionsinhibition vor der durchflußzytometrischen Analyse.**

Monensin (Mon.)	Brefeldin A (BfA)	Autoren
1 $\mu\text{M}$ , 1 - 12 h		VITALE <i>et al.</i> , 2000
2 $\mu\text{M}$ , 6 - 12 h		BARAN <i>et al.</i> , 2001
2 $\mu\text{M}$ , 16 h		SULLIVAN <i>et al.</i> , 2000
1,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (2,5 $\mu\text{M}$ ), 4 - 48 h		ROSTAING <i>et al.</i> , 1999
	5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 2 h	KARKMANN <i>et al.</i> , 1999
2 $\mu\text{M}$ , 3 - 12 h	1,4 $\mu\text{M}$ (0,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), 3 - 12 h	SCHUERWEGH <i>et al.</i> , 2001
	10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 6 h oder 2 $\mu\text{M}$ Mon. + 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ BfA, 6 h	BUENO <i>et al.</i> , 2001
6 $\mu\text{M}$ , 4 h	20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 4 h	MENDES <i>et al.</i> , 2000

Intrazelluläre Antigene müssen den Antikörpern, mit denen sie markiert werden sollen, zugänglich gemacht werden. Zu diesem Zweck werden die Zellmembran und die Membranen der Kompartimente, die das Antigen enthalten, permeabilisiert. Zuvor wird die Zelle fixiert und damit die Antigene in ihrem jeweiligen Kompartiment verankert. Dadurch werden Verluste bei der Zellpermeabilisierung vermindert. Die hier untersuchten, ACTH-exprimierenden Leukozyten wurden mit dem nicht-koagulierenden Standard-Fixativ Formaldehyd behandelt (ASSENMACHER *et al.*, 1994; KARKMANN *et al.*, 1999; KOESTER & BOLTON, 2001a).

Saponin, das sich aus *Quillaja saponaria* (*Rosaceae*) gewinnen läßt, ist ein Standardreagenz zum permeabilisieren von Leukozyten (JACOB *et al.*, 1991; ASSENMACHER *et al.*, 1994; SCHAUER *et al.*, 1996; KARKMANN *et al.*, 1999). Obwohl

erprobte Alternativmethoden existieren und - wie auch für Golgi-Inhibition und Fixierung - Fertigpräparate im Handel sind (MILLARD *et al.*, 1998; BARAN *et al.*, 2001), lieferte Saponin im leistungsphysiologischen Zellkulturmodell konsistente Ergebnisse (BACHELET *et al.*, 1998) und sollte in Untersuchungen eingesetzt werden, in denen es um Aussagen über die Antigenmenge geht (KOESTER & BOLTON, 2001a).

### 4.3 Ergebnisdiskussion

Die drei wesentlichen Ergebnisse der Vorversuche bestätigen die Funktionsfähigkeit und Spezifität des Detektionssystems:

- Mit einem für die Immunhistochemie entwickelten, in vergleichsweise hoher Konzentration eingesetzten, murinen monoklonalen Antikörper (mAb) wurde ACTH in humanen Leukozyten des peripheren Blutes markiert. Durch sekundäre Immunfluoreszenz mit Hilfe eines fluorochromierten divalenten antigenbindenden Antikörperfragments [ $\alpha$ mu-Ig-F(ab)<sub>2</sub>-FITC] wurde das Peptid durchflußzytometrisch detektierbar. Kontrollansätze mit unspezifischem Immunglobulin(Ig)-Isotyp bestätigten, daß die Markierung antigenspezifisch war.
- Ausgehend von einer deutlichen basalen ACTH-Expression kam es unter dem Einfluß von Corticoliberin in einschlägiger Konzentration ( $10^{-7}$  M) zur ACTH-Induktion, die unter  $10^{-8}$  M Dexamethason partiell und unter  $10^{-7}$  M Dexamethason komplett inhibiert wurde. Auch dieser Befund bestätigt die Spezifität der Bindung.
- Gleiche Konzentrationen von monoklonalen Antikörpern (mAb) eines anderen Herstellers (Biodesign) mit unterschiedlicher Spezifität (ACTH-N- bzw. -C-Terminus, Klon 57 bzw. 56) führten zu deutlich unterschiedlicher Markierung. So können die schwächer markierenden Antikörper als unbeabsichtigte Isotypkontrolle angesehen werden.

In den Hauptversuchen wurde zusätzlich zu Corticoliberin als einschlägiger Induktor der ACTH-Expression in Leukozyten Lipopolysaccharid (LPS) bzw. NaCl-hyperosmolares Medium als Stimulator eingesetzt. Die Expressionsniveaus unterlagen in dem verwendeten Blutspendematernal deutlichen individuellen Unterschieden. Infolge dieser Heterogenität waren die im Durchschnitt relativ

deutlichen Zunahmen der ACTH-Expression unter Einfluß von Corticoliberin und von NaCl statistisch nicht signifikant. Die für CRH vorgesehene Funktion eines Standardstimulators für ACTH war ebenfalls nicht erfüllt.

Mit ihrem Isotyp IgG<sub>1</sub> gehören die kommerziell verfügbaren murinen monoklonalen Antikörper (mAb) gegen ACTH zu der Immunglobulin-Subklasse, mit der auch die meisten Immunphänotypen (CD u.a.) und Mediatoren (Cytokine) durchflußzytometrisch detektiert werden. Indem in den Hauptversuchen PE-fluorochromierte  $\alpha$ CD20- und  $\alpha$ CD14-mAb anderer Subklassen sowie ein spezifisch gegen murines IgG<sub>1</sub> gerichteter, FITC-konjugierter Antikörper in Kombination eingesetzt wurde, wurden Aussagen über die ACTH-Expression in Leukozyten-Subpopulationen möglich.

Die Markierung von CD14 diente dazu, abzusichern, daß die Monozyten anhand ihrer Streulichteigenschaften erfolgreich ausgewählt worden waren. Durch Detektion von CD20 wurde deutlich, daß die zum Teil inhomogenen Fluoreszenzintensitäten (im durchflußzytometrischen Fluoreszenzdiagramm) innerhalb der im Streulichtdiagramm selektierten Lymphozytenpopulation nicht mit dem Immunphänotyp zusammenhängen, soweit dies aus der Färbung deutlich werden konnte. In bezug auf die Frage, bei welcher Lymphozytenpopulation die ACTH-Synthese bevorzugt induzierbar ist (KRAVCHENCO & FURALEV, 1994; LYONS & BLALOCK, 1995; DOMINGUEZ-GERPE & LEFKOVITS, 1996), brachte dieser Ansatz daher keine zusätzlichen Erkenntnisse.

Die durchschnittlichen Basiswerte der ACTH-Expression, gemessen als relative Fluoreszenzintensität, lagen stets über der Hälfte des Durchschnitts der stimulierten Proben, d.h. der durchschnittliche Stimulationsindex lag in jedem Fall unter 2. Dieser Befund steht im Kontrast zu im Kap. 1.5, S. 22, dargestellten, zum Teil wesentlich höheren Literaturwerten. Hierbei sind methodische Unterschiede zu beachten. Das durchflußzytometrisch detektierte ACTH war zellgebunden. Die PBMC sezernierten zum Zeitpunkt ihrer Fixierung uneingeschränkt, die Sekretion der Leukozyten aus Komplettmaterial war durch Monensin blockiert, worin die höhere relative Fluoreszenz trotz kürzerer - nach einschlägigen Maßstäben suboptimal kurzer (SMITH & BLALOCK, 1981; SMITH *et al.*, 1986; KRAVCHENCO & FURALEV, 1994; LYONS & BLALOCK, 1995) - Stimulation begründet liegen könnte. In quantitativen Studien und Bioassays, die deutlichere Unterschiede dokumentierten

(SMITH & BLALOCK, 1981; KRAVCHENCO & FURALEV, 1994) wurde ACTH aus Zellkulturüberständen nachgewiesen, wo es wahrscheinlich anderen stoffkinetischen Einflüssen als in den Zellen unterlag. Quantitative Studien mit intrazellulärer ACTH-Detektion nutzten Zell-Lysate unstimulierter Hämocyten niederer Vertebraten (OTTAVIANI *et al.*, 1992b) bzw. einer humanen Zelllinie (H9-T-Lymphom), die mit dem Glykoprotein gp120 aus HIV stimuliert wurde und unter diesem Einfluß eine signifikante, aber ebenfalls nur leicht gesteigerte ACTH-Synthese (ca.  $\times 1,7$ ) zeigte (HASHEMI *et al.*, 1998).

In Untersuchungen mit fluoreszenzmikroskopischer Auswertung wurden die Signale in visuelle Intensitätsklassen (Scores) eingeteilt und ergaben maximale Stimulationsindices um 5 (REDER, 1992) oder erfaßten den prozentualen Anteil immunreaktiver Zellen (SMITH & BLALOCK, 1981; LYONS & BLALOCK, 1995).

Aus Kulturgefäßen gehen Stoffe in Lösung (HELMRICH & BARNES, 1998), die nicht unbedingt zelltoxische, sondern z.B. wachstumsfördernde (LINCOLN & GABRIDGE, 1998) oder hormonelle Wirkungen (ISHIKAWA *et al.*, 2001) ausüben können. Ob und inwieweit sie die ACTH-Expression beeinflussen, ist nicht bekannt. Auch die in den Hauptversuchen eingesetzten, silikonisierten Glasröhrchen können kontaminierende Elemente an das Medium abgeben, unter denen sich toxische Schwermetalle befinden. Der Hersteller (Becton Dickinson) gibt im Datenblatt Maximalwerte aus der atomabsorptionsspektrometrischen Analyse nach 4h wässriger Extraktion an:

Calcium	400,0 µg/L	Magnesium	60,0 µg/L	Eisen	60,0 µg/L
Zink	40,0 µg/L	Kupfer	8,0 µg/L	Blei	2,5 µg/L
Mangan	1,5 µg/L	Arsen	1,0 µg/L	Chrom	0,9 µg/L
Antimon	0,8 µg/L	Cadmium	0,6 µg/L		

Unter LPS-Einfluß war bei der gewählten Konzentration von  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  weder bei der Über-Nacht-Stimulation von mononukleären Zellen alleine, noch bei der 5stündigen Stimulation des kompletten Blutspendematerials eine Zunahme der ACTH-Expression erkennbar. Vielmehr büßten die Monozyten weitgehend ihre strukturelle Integrität ein, so daß sie praktisch nicht mehr anhand ihrer Streulichteigenschaften identifizierbar waren. Auch die Detektion des immunphänotypischen Markers für Monozyten, CD14, mit Hilfe eines fluoro-

chromierten monoklonalen Antikörpers schlug fehl. Da die Markierung an permeabilisierten Zellen versucht wurde, ist davon auszugehen, daß das Fehlen der CD14-Moleküle kein Nebeneffekt der Anwendung des Sekretionsinhibitors Monensin war. In den nicht mit LPS behandelten Proben war das CD14-Antigen, dessen Expression u.a. der Regulation durch die HPA-Achse unterliegt (NOCKHER & SCHERBERICH, 1997), im erwarteten Umfang markiert.

Zur Wirkung unterschiedlicher LPS-Konzentrationen auf die Vitalität von peripheren mononukleären Leukozyten und die CD14-Expression durch bzw. -Antigendichte auf/in Monozyten liegen zum Teil kontroverse Ergebnisse vor. So waren unter dem Einfluß von  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  aus den *Salmonella-enterica*-Serotypen *typhimurium* und *abortusequi* sowie aus *Escherichia coli* Re und anderer mikrobieller Zellwandbestandteile membrangebundenes und lösliches CD14 von humanen Monozyten nach 44stündiger Kultur erhöht, und schon  $10 \text{ pg mL}^{-1}$  LPS stimulieren die monozytäre CD14-Membranexpression. Ab  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  LPS schien sich eine rückläufige Tendenz abzuzeichnen. Bei 15h Inkubation blieb die CD14-Dichte auf PBMC und angereicherten Monozyten unter dem Wert der Kontrolle (MARCHANT *et al.*, 1992; LANDMANN *et al.*, 1996).

Aus den durchflußzytometrischen Streulichtsignalen ergibt sich der Eindruck, daß die Monozyten unter LPS-Einfluß im Wege der Apoptose untergegangen sind. In den eingesetzten Größenordnungen ( $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  aus *Escherichia coli* K-235) kann LPS die Apoptoserate in vorbelasteten PBMC erhöhen (KURITA-OCHIAI *et al.*, 1999), obwohl für Monozyten eher eine antiapoptotische Wirkung beschrieben ist. Diese ist bei  $1 \text{ ng mL}^{-1}$  LPS aus *Escherichia coli* 0127:B8 am effektivsten ( $p < 0,05$ ), bei  $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  aber bereits nicht mehr signifikant (HEIDENREICH *et al.*, 1997). Trotzdem wird für diese Konzentration nach 3h Inkubation über keinen signifikant gesteigerten, nach 6 - 12 h nur über geringfügig erhöhten Zelluntergang berichtet. Auch die CD14-Expression kann unter diesen Bedingungen und Monensin-Einfluß (s.o.) noch unverändert sein (SCHUERWEGH *et al.*, 2001).

Lipopolysaccharid wirkt also im Bereich  $\text{ng mL}^{-1}$ , der pathogenetisch bedeutsam ist, stimulierend auf die CD14-Expression und supprimierend auf die Apoptoserate von Monozyten. Im höheren  $\mu\text{g-mL}^{-1}$ -Bereich, wo der zelluläre und

der Plasma-CD14-Pool erschöpft sind (BAZIL & STROMINGER, 1991; MALISZEWSKI, 1991; ANTAL-SZALMAS *et al.*, 2000), kehren sich die Verhältnisse um.

Die unterschiedlichen Niveaus der Basisexpression erwecken zusammen mit den individuellen Stimulationsergebnissen den Eindruck einer Teilung der Reaktivitäten in Gruppen mit niedriger bzw. hoher ACTH-Expression. Hinweise auf unterschiedliche systemische Reaktivitätslagen der HPA-Achse ergaben sich aus Untersuchungen an Sepsispatienten, deren Prognose mit der steroidogenen Reaktivität korreliert war. Zwar waren die Plasma-ACTH-Ausgangswerte von gesunden Kontrollprobanden sowie überlebenden und nicht-überlebenden Patienten im Durchschnitt unterschiedslos und der Unterschied der niedrigeren Plasma-ACTH-Reaktivität der später Verstorbenen auf injiziertes CRH nicht signifikant, aber die Cortisol-Plasmaspiegel ohne und mit CRH-Stimulation waren signifikant positiv mit der Verlaufsprognose korreliert (SCHROEDER *et al.*, 2001).

#### **4.4 Methodisches Entwicklungspotential**

Möglichkeiten, das vorgestellte Detektionssystem zu verbessern, ergeben zunächst aus den vorangegangenen Ausführungen zum Probenmaterial und zur Zellkulturtechnik. Darüber hinaus kann der Versuch unternommen werden, die ACTH-spezifischen Antikörper zu fluorochromieren, und dadurch die Probenvorbereitung zu vereinfachen und die Methodik zu erweitern und zu vertiefen.

##### *4.4.1 Entwicklungsperspektiven für die Zellkultur*

Frisches Vollblut sollte sich für leistungsphysiologische Zellkulturmodelle besser eignen als das bisher verwendete Beiprodukt aus der Blutspende, auf das bis zum Einsatz in der Zellkultur mehr belastende Einflüsse einwirken.

Psychische Einflüsse auf die ACTH-Synthese, die vor allem in Tiermodellen in ihrer Wirkung auf die HPA-Achse untersucht worden sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht näher dargestellt werden. Sie könnten aber insbesondere für humane *ex-vivo*-Interventionsstudien von Bedeutung sein, wo durch sorgfältige Gestaltung der Rahmenbedingungen die Belastung der Probanden zu minimieren wäre. Denkbare Konsequenz suboptimaler Bedingungen für die leukozytäre

ACTH-Synthese könnte die direkte Stimulation sein. Wenn peripheres Blut als Untersuchungsmaterial verwendet wird, so ist aber vor allem an den hemmenden Einfluß erhöhter Glucocorticoidspiegel zu denken.

Die Vollblut-Kultur kommt ohne die Belastungen aus, die während einer Dichtegradientenzentrifugation und der notwendigen begleitenden Manipulationen entstehen, und die Inkubationszeit kann auf wenige Stunden beschränkt werden. In diesem Zusammenhang könnte es sich als günstiger erweisen, auf die bisherige Golgi-Inhibition zu verzichten, da die entsprechenden Wirkstoffe zwar eine intrazelluläre Akkumulation von Exportpeptiden bewirken, zugleich aber die Prozessierung von Prohormonen stören und die Regulation der Freisetzung von Neuropeptiden durchbrechen können. (MISUMI *et al.*, 1986; DINTER & BERGER, 1998; BÄCK *et al.*, 2000; JACKSON, 2000).

Das in der Zellkultur humaner PBMC eingesetzte RPMI ist im Vergleich zu humanem Plasma hyperosmolar (SHAPIRO & DINARELLO, 1997). Ob dies Konsequenzen für die ACTH-Expression hat und ob die Osmolarität ohne entscheidende Nebenwirkungen angepaßt werden kann, sollte gegebenenfalls untersucht werden.

Die ACTH-Basisexpression läßt sich möglicherweise reduzieren, sobald inerte Zellkulturmaterialien entwickelt werden, die geringere Mengen von hormonell wirksamer Kontaminanten und Schwermetallen freisetzen.

Leistungsphysiologische Zellkulturmodelle zur Wirkung von oxidativem Streß und die Effekte von antioxidativ wirksamen Nährstoffen und Lebensmittelinhaltsstoffen könnten zu einem Haupteinsatzbereich der durchflußzytometrischen ACTH-Detektion werden. Oxidativer Streß, modelliert in Kulturen humaner PBMC unter Einfluß von 2,2'-Azobis-(2-amidinopropan)-dihydrochlorid (AAPH), erhöht die durch Hitzeschock induzierte Synthese von Hitzeschockproteinen (HSP). Dabei war die HSP-Expression in Leukozyten von Probanden, die mit Antioxidantien supplementiert wurden, signifikant höher als bei Kontrollprobanden (PENG *et al.*, 2000). In durchflußzytometrischen Untersuchungen mit Hitzeschock als alleinigem Induktor zeigten Referenzanalysen im Western-Immunoblot, daß die mittlere Fluoreszenzintensität der HSP-Signale ein geeigneter Parameter für die Abschätzung der HSP-Expression war (BACHELET *et al.*, 1998). Vor diesem



**Tab. 11: Aminosäuresequenzen von ACTH aus verschiedenen Spezies und einige korrespondierende DNA-Teilsequenzen aus dem POMC-Gen.**

**Lymphozyten-ACTH Maus** (SMITH *et al.*, 1990)

NH <sub>2</sub> -	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val	...
5'-	TCC	TAC	TCC	ATG	GAG	CAC	TTC	CGC	TGG	GGC	AAG	CCG	GTG	...
...	Gly	Lys	Lys	Arg	Arg	Pro	Val	Lys	Val	Tyr	Pro	Asn	<b>Val</b>	...
...	GGC	AAG	AAA	CGG	CGC	CCG	GTG	AAG	GTG	TAC	CCC	AAC	GTT	...
...	Ala	Glu	<b>Asn</b>	Glu	Ser	Ala	Glu	Ala	Phe	Pro	Leu	Glu	Phe	-COOH
	GCT	GAG	AAC	GAG	TCG	GCG	GAG	GCC	TTT	CCC	CTA	GAG	TTC	-3'

**ACTH Schwein** (*Sus scrofa domestica*) (SHEPHERD *et al.*, 1956; GRAF, 1972)

NH <sub>2</sub> -	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val	...
...	Gly	Lys	Lys	Arg	Arg	Pro	Val	Lys	Val	Tyr	Pro	Asn	Gly	...
...	Ala	Glu	Asp	Glu	<b>Leu</b>	Ala	Glu	Ala	Phe	Pro	Leu	Glu	Phe	-COOH

**ACTH Hund** (*Canis familiaris*) (MOL *et al.*, 1991)

NH <sub>2</sub> -	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val	...
...	Gly	Lys	Lys	Arg	Arg	Pro	Val	Lys	Val	Tyr	Pro	Asn	Gly	...
...	Ala	Glu	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Ala	Phe	Pro	<b>Val</b>	Glu	Phe	-COOH

**ACTH Rind** (*Bos taurus*) (CHANG *et al.*, 1980a)

NH <sub>2</sub> -	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val	...
5'-	TCT	TAC	TCC	ATG	<b>GAA</b>	CAC	TTC	CGC	TGG	GGC	AAG	CCG	GTG	...
...	Gly	Lys	Lys	Arg	Arg	Pro	Val	Lys	Val	Tyr	Pro	Asn	Gly	...
...	GGC	AAG	AAG	CGG	CGC	<b>CCG</b>	GTG	AAG	GTG	TAC	CCC	AAC	GGC	...
...	Ala	Glu	Asp	Glu	Ser	Ala	<b>Gln</b>	Ala	Phe	Pro	Leu	Glu	Phe	-COOH
	GCC	GAG	GAC	GAG	TCG	GCG	<b>CAG</b>	GCC	TTT	CCC	<b>CTC</b>	<b>GAA</b>	TTC	-3'

**ACTH Schaf** (*Ovis aries*) (LI *et al.*, 1955)

NH <sub>2</sub> -	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val	...
...	Gly	Lys	Lys	Arg	Arg	Pro	Val	Lys	Val	Tyr	Pro	<b>Ala</b>	Gly	...
...	<b>Glu</b>	<b>Asp</b>	Asp	Glu	<b>Ala</b>	<b>Ser</b>	Glu	Ala	Phe	Pro	Leu	Glu	Phe	-COOH

**ACTH Kaninchen** (*Oryctolagus cuniculus*) (MULAY *et al.*, 1986)

NH <sub>2</sub> -	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val	...
...	Gly	Lys	Lys	Arg	Arg	Pro	Val	Lys	Val	Tyr	Pro	Asn	Gly	...
...	Ala	Glu	<b>Asn</b>	Glu	Ser	Ala	Glu	Ala	Phe	Pro	<b>Val</b>	Glu	<b>Val</b>	-COOH

**ACTH Finnwal** (*Balaenoptera physalus*) (PANKOV *et al.*, 1976)

NH <sub>2</sub> -	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val	...
...	Gly	Lys	Lys	Arg	Arg	Pro	Val	Lys	Val	Tyr	Pro	Asn	Gly	...
...	Ala	Glu	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Ala	Phe	Pro	Leu	Glu	Phe	-COOH

**ACTH Seiwal** (*Balaenoptera borealis*) (PANKOV *et al.*, 1977)

NH <sub>2</sub> -	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val	...
...	Gly	Lys	Lys	Arg	Arg	Pro	Val	Lys	Val	Tyr	Pro	Asn	Gly	...
...	Ala	Glu	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Ala	Phe	Pro	Leu	Glu	Phe	-COOH

**Tab. 11: Aminosäuresequenzen von ACTH aus verschiedenen Spezies und einige korrespondierende DNA-Teilsequenzen aus dem POMC-Gen.**

**ACTH Huhn (*Gallus gallus*) (HAYASHI *et al.*, 1991)**

NH <sub>2</sub> -	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val	...
...	Gly	<b>Arg</b>	Lys	Arg	Arg	Pro	<b>Ile</b>	Lys	Val	Tyr	Pro	Asn	Gly	...
...	<b>Val</b>	<b>Asp</b>	<b>Glu</b>	Glu	Ser	Ala	Glu	<b>Ser</b>	<b>Tyr</b>	Pro	<b>Met</b>	Glu	Phe	-COOH

**ACTH Truthahn (*Meleagris gallopavo*) (CHANG *et al.*, 1980b)**

NH <sub>2</sub> -	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val	...
...	Gly	<b>Arg</b>	<b>Arg</b>	<b>Lys</b>	Arg	Pro	<b>Ile</b>	Lys	Val	Tyr	Pro	Asn	Gly	...
...	<b>Ser</b>	<b>Val</b>	<b>Asx</b>	<b>Glx</b>	<b>Glx</b>	<b>Gln</b>	<b>Ala</b>	<b>Ser</b>	<b>Tyr</b>	Pro	<b>Val</b>	Glu	Phe	-COOH

**ACTH Strauß (*Struthio camelus*) (LI *et al.*, 1978)**

NH <sub>2</sub> -	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val	...
...	Gly	<b>Arg</b>	Lys	Arg	Arg	Pro	Val	Lys	Val	Tyr	Pro	Asn	Gly	...
...	<b>Val</b>	<b>Gln</b>	<b>Glu</b>	Glu	<b>Thr</b>	<b>Ser</b>	Glu	<b>Gly</b>	Phe	Pro	Leu	Glu	Phe	-COOH

Unterscheide gegenüber der humanen Aminosäure- bzw. Gensequenz sind halbfett gedruckt. **Abkürzungen:** **+1** = Erstes für die ACTH-Peptidsequenz codierendes Basentriplett bzw. N-terminale Aminosäure der ACTH-Primärstruktur; **+10 / +20 / +30** = DNA-Codon- bzw. Aminosäure-Position in der ACTH-Sequenz; **-3'** = Terminationsrichtung der codogenen DNA in bezug auf die Transkription; **5'** = Initiationsrichtung der codogenen DNA in bezug auf die Transkription; **A** = Adenin(base der DNA); **Ala** = Alanin; **Arg** = Arginin; **Asn** = Asparagin; **Asp** = Asparaginsäure; **Asx** = Asparagin oder Asparaginsäure; **C** = Cytosin(base der DNA); **-COOH** = Carboxy-Terminus des (ACTH-)Peptids; **G** = Guanin(base der DNA); **Gln** = Glutamin; **Glu** = Glutaminsäure; **Glx** = Glutamin oder Glutaminsäure; **Gly** = Glycin; **His** = Histidin; **Ile** = Isoleucin; **Leu** = Leucin; **Lys** = Lysin; **Met** = Methionin; **NH<sub>2</sub>-** = Aminoterminus des (ACTH-)Peptids; **Phe** = Phenylalanin; **Pro** = Prolin; **Ser** = Serin; **T** = Thymin(base der DNA); **Thr** = Threonin; **Trp** = Tryptophan; **Tyr** = Tyrosin; **Val** = Valin

Die grundlegende Bedeutung von ACTH für die physiologischen Integrität des Organismus spiegelt sich in der umfassenden Reaktivität von Antiseren gegen das humane Peptid und molekularbiologischen Sonden (OTTAVIANI *et al.*, 1995; OTTAVIANI *et al.*, 1997; OTTAVIANI & Francheschi, 1997) wider und ebenso darin, daß Corticotropin-analoge Produkte stammesgeschichtlich älterer Arten über weite phylogenetische Distanzen hinweg wirken. So sezerniert der Erreger der Bilharziose, der Trematode *Schistosoma mansoni*, ein ACTH-ähnliches Peptid, wodurch er sich den Abwehrreaktionen sowohl seines Zwischenwirtes, der Süßwasserschnecke *Biomphalaria glabrata*, als auch seines humanen Endwirtes bzw. des entsprechenden Tiermodells, *Mesocricetus auratus* (Goldhamster), entzieht (Duvaux-Miret *et al.*, 1992).

Entwicklungsbiologische Studien sind deshalb grundsätzlich ein weiterer möglicher Anwendungsbereich für die durchflußzytometrische ACTH-Detektion. Die geringe Affinität des evaluierten N-terminal bindenden  $\alpha$ ACTH-mAb relativierte jedoch diese Aussichten. Von einem weiteren Hersteller (Serotec) wird aber ein mAb mit Spezifität gegen den ACTH-N-Terminus angeboten, der hier nicht eingesetzt wurde und über dessen durchflußzytometrische Eignung daher keine Aussagen getroffen werden können. Der C-terminale Bereich vom ACTH der dem Menschen stammesgeschichtlich nahestehenden Organismen, insbesondere der Säugetiere, stimmt möglicherweise gut genug mit humanem ACTH überein, um von dem entsprechenden hochaffinen mAb erkannt zu werden. Erste Ergebnisse von caprinen Leukozyten deuten darauf hin (LINSCHIED & SEIDLER, unveröffentlicht).

Ungeachtet des Ausgangs zukünftiger Bemühungen, die darauf zielen, die ACTH-Basisexpression in der Nähe eines *in vivo* möglicherweise geringeren Wertes zu halten, rechtfertigen die Untersuchungsergebnisse proteinchemische Arbeiten mit dem Ziel eines fluorochromierten  $\alpha$ ACTH-mAb. Neben einer kürzeren und damit schonenderen Probenvorbereitung würde das methodische Spektrum wesentlich erweitert werden. So müßte bei der Kombination mit anderen fluoreszenzmarkierten mAb nicht mehr auf die Ig-Subklasse geachtet werden. Damit ließen sich eine umfangreichere Immunphänotypisierungen durchführen, die Coexpression von Cytokinen und anderen Mediatoren untersuchen und z.B. apoptotische Prozesse analysieren (KOESTER & BOLTON, 2001b). Darüber hinaus ermöglichen Fluorochrom-konjugierte Antikörper quantitative durchflußzytometrische Untersuchungen über den Vergleich der Fluoreszenzintensität von Standardpartikeln, die mit definierten Antigenmengen beschichtet und mit dem Antikörper markiert wurden, und die sich anhand ihrer Streulichteigenschaften von den untersuchten Zellen unterscheiden lassen.

Die Durchflußzytometrie ist bereits seit längerer Zeit ein Hauptwerkzeug der zellbiologischen Analytik, wenn es um die Klassifizierung von Populationen immunkompetenter Zellen nach ihrem Immunphänotyp geht. Mit der routinemäßigen Identifizierung intrazellulärer Antigene konnten die Subpopulationen weiter anhand der von ihnen selektiv synthetisierten Mediatoren untergliedert werden (JUNG *et al.*, 1993). Dadurch sind durchflußzytometrische

Differenzierungen im Sinne des  $T_{H1}/T_{H2}$ -Konzepts der Immunregulation (MOSMANN *et al.*, 1986; MOSMANN & SAD, 1996) möglich geworden. Ähnliche Entwicklungen könnten sich aus der durchflußzytometrischen Detektion leukozytärer Hormone ergeben.

## 5 Zusammenfassung

Zellkulturmodelle, in denen Mediatoren der zellulären Leistungsphysiologie synthetisiert werden, können zur Bewertung gesundheitsfördernder und gesundheitsbeeinträchtigender Wirkungen von Substanzen und physiologischen Konditionen herangezogen werden. Ernährungsimmunologisch sind Nährstoffe und Nährstoffmangel, nicht-nutritive bioaktive Lebensmittelinhaltsstoffe sowie -immuntoxikologisch - Rückstände und Kontaminanten in Lebensmitteln interessant.

Humane Leukozyten können problemlos gewonnen werden und entstammen als primäres Zellkulturmaterial einem physiologisch regulierten Umfeld. Sie sind Schlüsselemente des Abwehrsystems. Damit sind sie in die Regulation der Homöostase eingebunden und spiegeln gleichzeitig die aktuellen Rahmenbedingungen wider, unter denen sich das physiologische Gleichgewicht eingestellt hat. In diesem Zusammenhang sind Neuropeptide, die von Leukozyten produziert werden und an der Signalübermittlung zwischen den Zellen beteiligt sind, insbesondere das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH), charakteristische Kenngrößen der zellulären Leistungsphysiologie.

Leukozyten sind auch ein günstiger Untersuchungsgegenstand für die durchflußzytometrische Analytik. Für ihre phänotypische Klassifizierung und die Kennzeichnung ihrer immunologischen Prägung sowie ihre immunologische Aktivität und Leistungsfähigkeit stehen umfangreiche zytochemische und immunzytochemische Methoden zur Verfügung.

Vor diesem Hintergrund sollte ACTH in humanen Leukozyten, nach Dichtegradientenzentrifugation bzw. aus komplettem Blutspendematériau, durchflußzytometrisch detektiert und die Höhe seiner Expression abgeschätzt werden. Dazu wurden im Handel befindliche monoklonale Antikörper (mAb) mit Spezifität gegen ACTH und entsprechende fluorochromierte Antikörper(fragmente) für die sekundäre Immunfluoreszenz eingesetzt. Weitere, gegen immunphänotypische leukozytäre Membranantigene gerichtete, fluorochromierte mAb wurden für die nähere Charakterisierung von Leukozytenpopulationen benutzt.

Mit Hilfe dreier einschlägiger Stimulatoren der ACTH-Expression in Leukozyten - Corticoliberin (CRH), Lipopolysaccharid (LPS) und hyperosmolares

Zellkulturmedium - wurde die methodische Relevanz des Nachweissystems überprüft. Die Höhe der ACTH-Expression wurde abgeschätzt, indem die vom kalibrierten Durchflußzytometer dokumentierten Signalintensitäten hintergrundbereinigt in mittlere relative Fluoreszenzintensitäten umgerechnet wurden.

Das detektierte Antigen war durch CRH induzierbar, Dexamethason supprimierte die Expression (beide Wirkstoffe in einschlägigen Konzentrationen). Unspezifische mAb und Sekundärantikörper gleicher Isotypen verursachten keine nennenswerten Signale. Die Detektion war somit ACTH-spezifisch. Zwei von drei untersuchten mAb gegen ACTH (spezifisch gegen den C- bzw. N-Terminus), die alle für immunhistochemische Zwecke ausgewiesen und durchflußzytometrisch nicht erprobt waren, waren schwach affin, der dritte zeigte die für eine wirtschaftlich vertretbare durchflußzytometrische Analytik erforderlichen Bindungseigenschaften.

Vor dem Hintergrund einer deutlichen ACTH-Basisexpression reagierten die stimulierten Leukozyten aus Blutspendematernal spenderabhängig heterogen. Niedrige Basisexpression fiel mit schwacher Reaktivität zusammen, und besser stimulierbare Proben wiesen höhere Ausgangswerte auf. Trotz höherer durchschnittlicher relativer Fluoreszenzintensitäten der mit CRH und NaCl-hyperosmolarem Medium stimulierten Leukozyten waren die Effekte statistisch nicht signifikant.

Lipopolysaccharid-behandelte Lymphozyten zeigten keine gesteigerte ACTH-Synthese. Monozyten hatten unter der hohen eingesetzten Konzentration ihre charakteristischen Streulichteigenschaften verloren. Das monozytentypische Membranantigen CD14, ein LPS-Rezeptor, war nicht mehr nachweisbar. Wahrscheinlich ist, daß zelluläres und lösliches CD14 abgesättigt worden waren und die Monozyten apoptotisch wurden. Diese Befunde standen im Kontrast zu Vorversuchen, in denen der Zellstoffwechsel bezogen auf alle mononukleären Leukozyten unter den selben Kulturbedingungen gegenüber der Kontrolle erhöht war.

Insgesamt ergab sich, trotz fehlender statistischer Signifikanz, der Eindruck eines entwicklungsfähigen Testsystems für die zelluläre Leistungsphysiologie. Die Aussagefähigkeit wird von der noch vergleichsweise hohen ACTH-

Basisexpression eingeschränkt, die wahrscheinlich wesentlich von Art und Aufarbeitung des Zellmaterials sowie von unspezifischen Einflüssen aus der Zellkultur abhängt. Das naheliegendste Konzept ist frisches Vollblut, das über wenige Stunden ohne Inhibitoren des Golgi-Apparates in chemisch möglichst inerten Kulturgefäßen inkubiert wird.

Aktuelle Fragestellungen in der Anwendung, die sich zum Teil aus der Methodenentwicklung ergeben haben, sind z.B.

- prooxidative Wirkungen von Antioxidantien in der Zellkultur und ihre möglichen Einflüsse auf die ACTH-Expression
- LPS-Effekte auf ACTH-Synthese und apoptotische Prozesse in Abhängigkeit von Bakterienart und LPS-Dosis, von Interesse auch vor dem Hintergrund der Pathogenese und funktionellen Diagnostik der Sepsis,
- geeignete tierexperimentelle Modelle,
- entwicklungsbiologische und vergleichend-immunologische Untersuchungen.

Hohen methodischen Stellenwert würde direkt-fluorochromierten Antikörpern mit Spezifität gegen ACTH zukommen, die bei kürzerer und schonenderer Probenvorbereitung umfassende Immunglobulin-Subklassen-unabhängige Kombinationsmöglichkeiten mit phänotyp-, aktivierungs-, prägnungs- und mediatorspezifischen Markern eröffnen würden. In Kombination mit Standardpartikeln würden quantitative Aussagen möglich.

Eine der intrazellulären Cytokindetektion gleichrangige Bedeutung ist vorstellbar.

## 6 Literaturverzeichnis

- AEBISCHER, I.; STÄMPFLI, M.R.; ZÜRCHER, A.; MIESCHER, S.; URWYLER, A.; FREY, B.; LUGER, T.; WHITE, R.R.; STADLER, B.M. (1994): **Neuropeptides are potent modulators of human in vitro immunoglobulin E synthesis.**  
*Eur J Immunol* 24 (8) 1908-13.
- AEBISCHER, I.; STAMPFLI, M.R.; MIESCHER, S.; HORN, M.; ZURCHER, A.W.; STADLER, B.M. (1996): **Neuropeptides accentuate interleukin-4 induced human immunoglobuline E synthesis in vitro.**  
*Exp Dermatol* 5 (1) 38-44.
- ALVAREZ-MON, M.; KEHRL, J.H.; FAUCI, A.S. (1985): **A potential role for adrenocorticotropin in regulating human B lymphocyte functions.**  
*J Immunol* 135 (6) 3823-6.
- ANTAL-SZALMAS, P.; POPPELIER, M.J.; BROEKHUIZEN, R.; VERHOEF, J.; VAN STRIJP, J.A.; VAN KESSEL, K.P. (2000): **Diverging pathways for lipopolysaccharide and CD14 in human monocytes.**  
*Cytometry* 41 (4) 279-88.
- ASSENMACHER, M.; SCHMITZ, J.; RADBRUCH, A. (1994): **Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expression of interleukin-10 in interferon-gamma and in interleukin-4-expressing cells.**  
*Eur J Immunol* 24 (5) 1097-101.
- BACHELET, M.; MARIETHOZ, E.; BANZET, N.; SOUIL, E.; PINOT, F.; POLLA, C.Z.; DURAND, P.; BOUCHAERT, I.; POLLA, B.S. (1998): **Flow cytometry is a rapid and reliable method for evaluating heat shock protein 70 expression in human monocytes.**  
*Cell Stress Chaperones* 3 (3) 168-76.
- BÄCK, N.; SOINILA, S.; TÖRNQUIST, K. (2000): **Monensin and hypo-osmolar medium cause calcium-independent beta-endorphin secretion from melanotropes.**  
*Neuroendocrinology* 71 (2) 99-106.
- BAIGENT, S.M. (2001): **Peripheral corticotropin-releasing hormone and urocortin in the control of the immune response.**  
*Peptides* 22 (5) 809-20.
- BARAN, J.; KOWALCZYK, D.; OZOG, M.; ZEMBALA, M. (2001): **Three-color flow cytometry detection of intracellular cytokines in peripheral blood mononuclear cells: comparative analysis of phorbol myristate acetate-ionomycin and phytohemagglutinin stimulation.**  
*Clin Diagn Lab Immunol* 8 (2) 303-13.
- BAZIL, V.; STROMINGER, J.L. (1991): **Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes.**  
*J Immunol* 147 (5) 1567-74.
- BOECK, G. (2001): **Current status of flow cytometry in cell and molecular biology.**  
*Int Rev Cytol* 204 239-98.
- BOHM, H.; BOEING, H.; HEMPEL, J.; RAAB, B.; KROKE, A. (1998): **[Flavonols, flavone and anthocyanins as natural antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases].**  
*Z Ernährungswiss* 37 (2) 147-63.

- BORBONI, P.; DI COLA, G.; SESTI, G.; MARINI, M.A.; DEL PORTO, P.; SAVERIA, M.; MONTANI, G.; LAURO, R.; DE PIRRO, R. (1989): **Beta-endorphin receptors on cultured and freshly isolated lymphocytes from normal subjects.**  
*Biochem Biophys Res Commun* 163 (1) 642-8.
- BOST, K.L.; CLARKE, B.L.; XU, J.C.; KIYONO, H.; MCGHEE, J.R.; PASCUAL, D. (1990): **Modulation of IgM secretion and H chain mRNA expression in CH12.LX.C4.5F5 B cells by adrenocorticotrophic hormone.**  
*J Immunol* 145 (12) 4326-31.
- BRINES, R.; HOFFMAN-GOETZ, L.; PEDERSEN, B.K. (1996): **Can you exercise to make your immune system fitter?**  
*Immunol Today* 17 (6) 252-4.
- BRUNIALTI, M.K.; KALLAS, E.G.; FREUDENBERG, M.; GALANOS, C.; SALOMAO, R. (2002): **Influence of EDTA and heparin on lipopolysaccharide binding and cell activation, evaluated at single-cell level in whole blood.**  
*Cytometry* 50 (1) 14-8.
- BUENO, C.; ALMEIDA, J.; ALGUERO, M.C.; SANCHEZ, M.L.; VAQUERO, J.M.; LASO, F.J.; SAN MIGUEL, J.F.; ESCRIBANO, L.; ORFAO, A. (2001): **Flow cytometric analysis of cytokine production by normal human peripheral blood dendritic cells and monocytes: comparative analysis of different stimuli, secretion-blocking agents and incubation periods.**  
*Cytometry* 46 (1) 33-40.
- BØYUM, 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.**  
*Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97 77-89.
- CHANG, A.C.; COCHET, M.; COHEN, S.N. (1980): **Structural organization of human genomic DNA encoding the pro-opiomelanocortin peptide.**  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 77 (8) 4890-4.
- CHANG, W.C.; CHUNG, D.; LI, C.H. (1980): **Isolation and characterization of beta-lipotropin and adrenocorticotropin from turkey pituitary glands.**  
*Int J Pept Protein Res* 15 (3) 261-70.
- CLARKE, B.L. (1995): **Calcium uptake by ACTH-stimulated lymphocytes: what is the physiological significance?**  
*Adv Neuroimmunol* 5 (3) 271-81.
- CLARKE, B.L. (1999): **Binding and processing of (125)I-ACTH by isolated rat splenic lymphocytes.**  
*Biochem Biophys Res Commun* 266 (2) 542-6.
- COFFEY, R.G.; HADDEN, J.W. (1985): **Neurotransmitters, hormones, and cyclic nucleotides in lymphocyte regulation.**  
*Fed Proc* 44 (1 Pt 1) 112-7.
- COMB, M.; SEEBURG, P.H.; ADELMAN, J.; EIDEN, L.; HERBERT, E. (1982): **Primary structure of the human Met- and Leu-enkephalin precursor and its mRNA.**  
*Nature* 295 (5851) 663-6.
- DADOUN, F.; VELUT, J.G.; GUILLAUME, V.; SAUZE, N.; ORSONI, J.C.; GAILLARD, R.C.; OLIVER, C.C. (1999): **Combined hypervolemia and hypoosmolality alter hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to endotoxin stimulation.**  
*Neuroendocrinology* 69 (5) 352-9.

- DHABHAR, F.S.; MILLER, A.H.; STEIN, M.; MCEWEN, B.S.; SPENCER, R.L. (1994): **Diurnal and acute stress-induced changes in distribution of peripheral blood leukocyte subpopulations.**  
*Brain Behav Immun* 8 (1) 66-79.
- DINTER, A.; BERGER, E.G. (1998): **Golgi-disturbing agents.**  
*Histochem Cell Biol* 109 (5-6) 571-90.
- DIXIT, V.D.; MARAHRENS, M.; PARVIZI, N. (2001): **Transport stress modulates adrenocorticotropin secretion from peripheral bovine lymphocytes.**  
*J Anim Sci* 79 (3) 729-34.
- DIXON, J.E.; HAUN, R.S.; MINTH, C.D.; NICHOLS, R. (1987): **Neuropeptide gene families.**  
In: TURNER, A.J. (Hrsg.): *Neuropeptides and Their Peptidases*. VCH, Weinheim, New York, S. 9-30
- DOMINGUEZ-GERPE, L.; LEFKOVITS, I. (1996): **Lymphocyte protein synthesis: evidence that murine T cells are more affected by stress than B cells.**  
*Immunol Lett* 52 (2-3) 109-23.
- DUGAS, T.R.; MOREL, D.W.; HARRISON, E.H. (2000): **Novel cell culture medium for use in oxidation experiments provides insights into mechanisms of endothelial cell-mediated oxidation of LDL.**  
*In Vitro Cell Dev Biol Anim* 36 (9) 571-7.
- DUVAUX-MIRET, O.; STEFANO, G.B.; SMITH, E.M.; DISSOUS, C.; CAPRON, A. (1992): **Immunosuppression in the definitive and intermediate hosts of the human parasite *Schistosoma mansoni* by release of immunoreactive neuropeptides.**  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (2) 778-81.
- FERRIS, D.K.; HAREL-BELLAN, A.; MORIMOTO, R.I.; WELCH, W.J.; FARRAR, W.L. (1988): **Mitogen and lymphokine stimulation of heat shock proteins in T lymphocytes.**  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (11) 3850-4.
- FURUTA, M.; YANO, H.; ZHOU, A.; ROUILLE, Y.; HOLST, J.J.; CARROLL, R.; RAVAZZOLA, M.; ORCI, L.; FURUTA, H.; STEINER, D.F. (1997): **Defective prohormone processing and altered pancreatic islet morphology in mice lacking active SPC2.**  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (13) 6646-51.
- GABRIEL, H.; SCHWARZ, L.; STEFFENS, G.; KINDERMANN, W. (1992): **Immunoregulatory hormones, circulating leucocyte and lymphocyte subpopulations before and after endurance exercise of different intensities.**  
*Int J Sports Med* 13 (5) 359-66.
- GENEDANI, S.; BERNARDI, M.; BERTOLINI, A. (1992): **Neuropeptides of the stress response and monocyte motility.**  
*Ann N Y Acad Sci* 663 494-6.
- GILLIES, G.E.; LINTON, E.A.; LOWRY, P.J. (1982): **Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin.**  
*Nature* 299 (5881) 355-7.
- GONSALKORALE, W.M.; DASCOMBE, M.J.; HUTCHINSON, I.V. (1995): **Adrenocorticotrophic hormone as a potential enhancer of T-lymphocyte function in the rat mixed lymphocyte reaction.**  
*Int J Immunopharmacol* 17 (3) 197-206.

- GRAF, L. (1972): **Re-examination of the sequence of the C-terminal tryptic fragment from porcine adrenocorticotrophic hormone.**  
*Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung* 7 (4) 293-7.
- GROßKLAUS, R. (2000): **Sekundäre Pflanzenstoffe - Was ist beim Menschen wissenschaftlich hinreichend gesichert?**  
*Aktuel Ernährungsmed* 25 227-37
- GUBLER, U.; SEEBURG, P.; HOFFMAN, B.J.; GAGE, L.P.; UDENFRIEND, S. (1982): **Molecular cloning establishes proenkephalin as precursor of enkephalin-containing peptides.**  
*Nature* 295 (5846) 206-8.
- HADLEY, M.E.; HASKELL-LUEVANO, C. (1999): **The proopiomelanocortin system.**  
*Ann N Y Acad Sci* 885 1-21.
- HARBOUR-MCMENAMIN, D.; SMITH, E.M.; BLALOCK, J.E. (1985): **Bacterial lipopolysaccharide induction of leukocyte-derived corticotropin and endorphins.**  
*Infect Immun* 48 (3) 813-7.
- HASHEMI, F.B.; HUGHES, T.K.; SMITH, E.M. (1998): **Human immunodeficiency virus induction of corticotropin in lymphoid cells.**  
*J Clin Endocrinol Metab* 83 (12) 4373-81.
- HAYASHI, H.; IMAI, K.; IMAI, K. (1991): **Characterization of chicken ACTH and alpha-MSH: the primary sequence of chicken ACTH is more similar to Xenopus ACTH than to other avian ACTH.**  
*Gen Comp Endocrinol* 82 (3) 434-43.
- HEIDENREICH, S.; SCHMIDT, M.; AUGUST, C.; CULLEN, P.; RADEMAEKERS, A.; PAUELS, H.G. (1997): **Regulation of human monocyte apoptosis by the CD14 molecule.**  
*J Immunol* 159 (7) 3178-88.
- HELMRICH, A.; BARNES, D. (1998): **Animal cell culture equipment and techniques.**  
*Methods Cell Biol* 57 3-17.
- HOFFMAN-GOETZ, L.; PEDERSEN, B.K. (1994): **Exercise and the immune system: a model of the stress response?**  
*Immunol Today* 15 (8) 382-7.
- HOLTZHAUER, M. (1997): **Biochemische Labormethoden.**  
: Springer Labormanuale. 3., korr. Aufl., *Springer*, Berlin, ...,
- HOUSBY, J.N.; CAHILL, C.M.; CHU, B.; PREVELIGE, R.; BICKFORD, K.; STEVENSON, M.A.; CALDERWOOD, S.K. (1999): **Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit the expression of cytokines and induce HSP70 in human monocytes.**  
*Cytokine* 11 (5) 347-58.
- HUGHES, T.K.; CADET, P.; RADY, P.L.; TYRING, S.K.; CHIN, R.; SMITH, E.M. (1994): **Evidence for the production and action of interleukin-10 in pituitary cells.**  
*Cell Mol Neurobiol* 14 (1) 59-69.
- ICHINOSE, M.; SAWADA, M.; MAENO, T. (1994): **Suppression of phagocytosis by adrenocorticotrophic hormone in murine peritoneal macrophages.**  
*Immunol Lett* 42 (3) 161-5.
- ISHIKAWA, T.; TAKANO, K.; YASUFUKU-TAKANO, J.; FUJITA, T.; IGARASHI, T.; MIURA, M.; HATA, K. (2001): **Estrogenic impurities in labware.**  
*Nat Biotechnol* 19 (9) 812.

- JACKSON, C.L. (2000): **Brefeldin A. Revealing the fundamental principles governing membrane dynamics and protein transport.**  
*Subcell Biochem* 34 233-72.
- JACOB, M.C.; FAVRE, M.; BENZA, J.C. (1991): **Membrane cell permeabilization with saponin and multiparametric analysis by flow cytometry.**  
*Cytometry* 12 (6) 550-8.
- JACQUIER-SARLIN, M.R.; JORNOT, L.; POLLA, B.S. (1995): **Differential expression and regulation of hsp70 and hsp90 by phorbol esters and heat shock.**  
*J Biol Chem* 270 (23) 14094-9.
- JESSOP, D.S. (1999): **Central non-glucocorticoid inhibitors of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis.**  
*J Endocrinol* 160 (2) 169-80.
- JOHNSON, E.W.; KLIMPEL G.R.; SMITH, E.M. (1987): **Adrenocorticotropin (ACTH) receptors on murine leukocytes: expression and association with cell-mediated cytotoxicity.**  
*Fed Proc* 46 (4) 1221
- JOHNSON, E.W.; BLALOCK, J.E.; SMITH, E.M. (1988): **ACTH receptor-mediated induction of leukocyte cyclic AMP.**  
*Biochem Biophys Res Commun* 157 (3) 1205-11.
- JOHNSON, H.M.; SMITH, E.M.; TORRES, B.A.; BLALOCK, J.E. (1982): **Regulation of the in vitro antibody response by neuroendocrine hormones.**  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (13) 4171-4.
- JOHNSON, H.M.; TORRES, B.A.; SMITH, E.M.; DION, L.D.; BLALOCK, J.E. (1984): **Regulation of lymphokine (gamma-interferon) production by corticotropin.**  
*J Immunol* 132 (1) 246-50.
- JOSHI, M.S.; FERGUSON JR., T.B.; HAN, T.H.; HYDUKE, D.R.; LIAO, J.C.; RASSAF, T.; BRYAN, N.; FEELISCH, M.; LANCASTER JR., J.R. (2002): **Nitric oxide is consumed, rather than conserved, by reaction with oxyhemoglobin under physiological conditions.**  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (16) 10341-6.
- JOSLIN, G.; HAFEEZ, W.; PERLMUTTER, D.H. (1991): **Expression of stress proteins in human mononuclear phagocytes.**  
*J Immunol* 147 (5) 1614-20.
- JUNG, T.; SCHAUER, U.; HEUSSER, C.; NEUMANN, C.; RIEGER, C. (1993): **Detection of intracellular cytokines by flow cytometry.**  
*J Immunol Methods* 159 (1-2) 197-207.
- KAKIDANI, H.; FURUTANI, Y.; TAKAHASHI, H.; NODA, M.; MORIMOTO, Y.; HIROSE, T.; ASAI, M.; INAYAMA, S.; NAKANISHI, S.; NUMA, S. (1982): **Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neo-endorphin/dynorphin precursor.**  
*Nature* 298 (5871) 245-9.
- KARANTH, S.; MCCANN, S.M. (1991): **Anterior pituitary hormone control by interleukin 2.**  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (7) 2961-5.
- KARKMANN, U.; RADBRUCH, A.; HOLZEL, V.; SCHEFFOLD, A. (1999): **Enzymatic signal amplification for sensitive detection of intracellular antigens by flow cytometry.**  
*J Immunol Methods* 230 (1-2) 113-20.

- KOESTER, S.K.; BOLTON, W.E. (2001): **Strategies for cell permeabilization and fixation in detecting surface and intracellular antigens.**  
*Methods Cell Biol* 63 253-68.
- KOESTER, S.K.; BOLTON, W.E. (2001): **Cytometry of caspases.**  
*Methods Cell Biol* 63 487-504.
- KOFF, W.C.; DUNEGAN, M.A. (1985): **Modulation of macrophage-mediated tumoricidal activity by neuropeptides and neurohormones.**  
*J Immunol* 135 (1) 350-4.
- KOGA, T.; MEYDANI, M. (2001): **Effect of plasma metabolites of (+)-catechin and quercetin on monocyte adhesion to human aortic endothelial cells.**  
*Am J Clin Nutr* 73 (5) 941-8.
- KRAVCHENCO, I.V.; FURALEV, V.A. (1994): **Secretion of immunoreactive corticotropin releasing factor and adrenocorticotrophic hormone by T- and B-lymphocytes in response to cellular stress factors.**  
*Biochem Biophys Res Commun* 204 (2) 828-34.
- KURITA-OCHIAI, T.; FUKUSHIMA, K.; OCHIAI, K. (1999): **Lipopolysaccharide stimulates butyric acid-induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells.**  
*Infect Immun* 67 (1) 22-9.
- LACAZE-MASMONTEIL, T.; DE KEYZER, Y.; LUTON, J.P.; KAHN, A.; BERTAGNA, X. (1987): **Characterization of proopiomelanocortin transcripts in human nonpituitary tissues.**  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (20) 7261-5.
- LANDMANN, R.; KNOPE, H.P.; LINK, S.; SANSANO, S.; SCHUMANN, R.; ZIMMERLI, W. (1996): **Human monocyte CD14 is upregulated by lipopolysaccharide.**  
*Infect Immun* 64 (5) 1762-9.
- LI, C.H.; GESCHWIND, I.I.; COLE, R.D.; RAACKE, I.D.; HARRIS, J.I.; DIXON, J.S. (1955): **Amino acid sequence of alpha-corticotropin.**  
*Nature* 176 687-9
- LI, C.H.; CHUNG, D.; OELOFSEN, W.; NAUDE, R.J. (1978): **Adrenocorticotropin 53. The amino acid sequence of the hormone from the ostrich pituitary gland.**  
*Biochem Biophys Res Commun* 81 (3) 900-6.
- LINCOLN, C.K.; GABRIDGE, M.G. (1998): **Cell culture contamination: sources, consequences, prevention, and elimination.**  
*Methods Cell Biol* 57 49-65.
- LINDL, T.; BAUER, J. (1994): **Zell- und Gewebekultur.**  
3. Aufl., *Gustav Fischer*, Stuttgart, Jena, New York,
- LOH, Y.P.; PARISH, D.C. (1987): **Processing of neuropeptide precursors.**  
In: TURNER, A.J. (Hrsg.): *Neuropeptides and Their Peptidases*. VCH, Weinheim, New York, S. 65-84
- LONG, L.H.; CLEMENT, M.V.; HALLIWELL, B. (2000): **Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media.**  
*Biochem Biophys Res Commun* 273 (1) 50-3.

- LYONS, P.D.; BLALOCK, J.E. (1995): **The kinetics of ACTH expression in rat leukocyte subpopulations.**  
*J Neuroimmunol* 63 (2) 103-12.
- MAINS, R.E.; EIPPER, B.A.; LING, N. (1977): **Common precursor to corticotropins and endorphins.**  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (7) 3014-8.
- MALISZEWSKI, C.R. (1991): **CD14 and immune response to lipopolysaccharide.**  
*Science* 252 (5010) 1321-2.
- MARCHANT, A.; DUCHOW, J.; DELVILLE, J.P.; GOLDMAN, M. (1992): **Lipopolysaccharide induces up-regulation of CD14 molecule on monocytes in human whole blood.**  
*Eur J Immunol* 22 (6) 1663-5.
- MCCANN, S.M.; KIMURA, M.; KARANTH, S.; YU, W.H.; MASTRONARDI, C.A.; RETTORI, V. (2000): **The mechanism of action of cytokines to control the release of hypothalamic and pituitary hormones in infection.**  
*Ann N Y Acad Sci* 917 4-18.
- MCCOY JR., J.P. (2001): **Preparation of cells from blood.**  
*Methods Cell Biol* 63 207-16.
- MENDES, R.; BROMELow, K.V.; WESTBY, M.; GALEA-LAURI, J.; SMITH, I.E.; O'BRIEN, M.E.; SOUBERBIELLE, B.E. (2000): **Flow cytometric visualisation of cytokine production by CD3-CD56+ NK cells and CD3+CD56+ NK-T cells in whole blood.**  
*Cytometry* 39 (1) 72-8.
- MERALI, Z.; KENT, P.; ANISMAN, H. (2002): **Role of bombesin-related peptides in the mediation or integration of the stress response.**  
*Cell Mol Life Sci* 59 (2) 272-87.
- MILLARD, I.; DEGRAVE, E.; PHILIPPE, M.; GALA, J.L. (1998): **Detection of intracellular antigens by flow cytometry: comparison of two chemical methods and microwave heating.**  
*Clin Chem* 44 (11) 2320-30.
- MISUMI, Y.; MISUMI, Y.; MIKI, K.; TAKATSUKI, A.; TAMURA, G.; IKEHARA, Y. (1986): **Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes.**  
*J Biol Chem* 261 (24) 11398-403.
- MISUMI, Y.; MISUMI, Y.; MIKI, K.; TAKATSUKI, A.; TAMURA, G.; IKEHARA, Y. (1986): **Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes.**  
*J Biol Chem* 261 (24) 11398-403.
- MOL, J.A.; VAN MANSFELD, A.D.; KWANT, M.M.; VAN WOLFEREN, M.; ROTHUIZEN, J. (1991): **The gene encoding proopiomelanocortin in the dog.**  
*Acta Endocrinol (Copenh)* 125 Suppl 1 77-83.
- MOSMANN, T. (1983): **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.**  
*J Immunol Methods* 65 (1-2) 55-63.
- MOSMANN, T.R.; SAD, S. (1996): **The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more.**  
*Immunol Today* 17 (3) 138-46.

- MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. (1986): **Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.**  
*J Immunol* 136 (7) 2348-57.
- MULAY, S.; BENNETT, H.P.; ROUTHIER, R.; SOLOMON, S. (1986): **Isolation, characterization, and corticotropic activity of rabbit adrenocorticotropin.**  
*Endocrinology* 119 (1) 70-6.
- MUNN, N.A.; LUM, L.G. (1989): **Immunoregulatory effects of alpha-endorphin, beta-endorphin, methionine-enkephalin, and adrenocorticotropin hormone on anti-tetanus toxoid antibody synthesis by human lymphocytes.**  
*Clin Immunol Immunopathol* 52 (3) 376-85.
- NAKANISHI, S.; INOUE, A.; KITA, T.; NUMA, S.; CHANG, A.C.; COHEN, S.N.; NUNBERG, J.; SCHIMKE, R.T. (1978): **Construction of bacterial plasmids that contain the nucleotide sequence for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor.**  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 75 (12) 6021-5.
- NAKANISHI, S.; INOUE, A.; KITA, T.; NAKAMURA, M.; CHANG, A.C.; COHEN, S.N.; NUMA, S. (1979): **Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor.**  
*Nature* 278 (5703) 423-7.
- NAKANISHI, S.; TERANISHI, Y.; WATANABE, Y.; NOTAKE, M.; NODA, M.; KAKIDANI, H.; JINGAMI, H.; NUMA, S. (1981): **Isolation and characterization of the bovine corticotropin/beta-lipotropin precursor gene.**  
*Eur J Biochem* 115 (3) 429-38.
- NAVOLOTSKAYA, E.V.; ZARGAROVA, T.A.; LEPIKHOVA, T.N.; NURIEVA, R.I.; LIPKIN, V.M.; ZAV'YALOV, V.P. (2000): **Influence of synthetic peptide corresponding to the ACTH-like sequence of human immunoglobulin G1 on activity of murine thymocytes and peritoneal macrophages.**  
*Immunol Lett* 72 (2) 93-9.
- NOCKHER, W.A.; SCHERBERICH, J.E. (1997): **Expression and release of the monocyte lipopolysaccharide receptor antigen CD14 are suppressed by glucocorticoids in vivo and in vitro.**  
*J Immunol* 158 (3) 1345-52.
- NODA, M.; FURUTANI, Y.; TAKAHASHI, H.; TOYOSATO, M.; HIROSE, T.; INAYAMA, S.; NAKANISHI, S.; NUMA, S. (1982): **Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin.**  
*Nature* 295 (5846) 202-6.
- NODA, M.; TERANISHI, Y.; TAKAHASHI, H.; TOYOSATO, M.; NOTAKE, M.; NAKANISHI, S.; NUMA, S. (1982): **Isolation and structural organization of the human preproenkephalin gene.**  
*Nature* 297 (5865) 431-4.
- NUMA, S.; NAKANISHI, S. (1981): **Corticotropin-beta-lipotropin precursor - a multi-hormone precursor - and its gene.**  
*Trends Biochem Sci* 274
- OATES, E.L.; ALLAWAY, G.P.; ARMSTRONG, G.R.; BOYAJIAN, R.A.; KEHRL, J.H.; PRABHAKAR, B.S. (1988): **Human lymphocytes produce pro-opiomelanocortin gene-related transcripts. Effects of lymphotropic viruses.**  
*J Biol Chem* 263 (21) 10041-4.

- OATES, E.L.; ALLAWAY, G.P.; PRABHAKAR, B.S. (1990): **A potential for mutual regulation of proopiomelanocortin gene and Epstein-Barr virus expression in human lymphocytes.**  
*Ann N Y Acad Sci* 594 60-5.
- OTTAVIANI, E.; FRANCESCHI, C. (1997): **The invertebrate phagocytic immunocyte: clues to a common evolution of immune and neuroendocrine systems.**  
*Immunol Today* 18 (4) 169-74.
- OTTAVIANI, E.; PETRAGLIA, F.; MONTAGNANI, G.; COSSARIZZA, A.; MONTI, D.; FRANCESCHI, C. (1990): **Presence of ACTH and beta-endorphin immunoreactive molecules in the freshwater snail *Planorbarius corneus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata) and their possible role in phagocytosis.**  
*Regul Pept* 27 (1) 1-9.
- OTTAVIANI, E.; COSSARIZZA, A.; ORTOLANI, C.; MONTI, D.; FRANCESCHI, C. (1991): **ACTH-like molecules in gastropod molluscs: a possible role in ancestral immune response and stress.**  
*Proc R Soc Lond B Biol Sci* 245 (1314) 215-8.
- OTTAVIANI, E.; FRANCHINI, A.; COSSARIZZA, A.; FRANCESCHI, C. (1992): **ACTH-like molecules in lymphocytes. A study in different vertebrate classes.**  
*Neuropeptides* 23 (4) 215-9.
- OTTAVIANI, E.; TREVISAN, P.; PEDERZOLI, A. (1992): **Immunocytochemical evidence for ACTH- and beta-endorphin-like molecules in phagocytic blood cells of urodelan amphibians.**  
*Peptides* 13 (2) 227-31.
- OTTAVIANI, E.; CAPRIGLIONE, T.; FRANCESCHI, C. (1995): **Invertebrate and vertebrate immune cells express pro-opiomelanocortin (POMC) mRNA.**  
*Brain Behav Immun* 9 (1) 1-8.
- OTTAVIANI, E.; FRANCHINI, A.; FRANCESCHI, C. (1997): **Pro-opiomelanocortin-derived peptides, cytokines, and nitric oxide in immune responses and stress: an evolutionary approach.**  
*Int Rev Cytol* 170 79-141.
- OTTAVIANI, E.; FRANCHINI, A.; HANUKOGLU, I. (1998): **In situ localization of ACTH receptor-like mRNA in molluscan and human immunocytes.**  
*Cell Mol Life Sci* 54 (2) 139-42.
- OTTAWAY, C.A.; HUSBAND, A.J. (1994): **The influence of neuroendocrine pathways on lymphocyte migration.**  
*Immunol Today* 15 (11) 511-7.
- PACAK, K.; PALKOVITS, M.; YADID, G.; KVETNANSKY, R.; KOPIN, I.J.; GOLDSTEIN, D.S. (1998): **Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity.**  
*Am J Physiol* 275 (4 Pt 2) R1247-55.
- PANKOV, I.U.A.; PIKOLAEVA, O.P.; ELIZAROVA, G.P. (1977): **[Amino acid sequence of corticotropins from seiwhale (*Balaenoptera borealis*) and pinwhale (*Balaenoptera physalus*)].**  
*Biokhimiia* 42 (11) 2044-50.
- PANKOV, Y.A.; NIKOLAEVA, O.P.; ELIZAROVA, G.P. (1976): **Primary structure of fin whale's (*Balaenoptera physalus*) corticotropin.**  
*Bioorg Khim* 2 (6) 855-6

- PECK, R. (1987): **Neuropeptides modulating macrophage function.**  
*Ann N Y Acad Sci* 496 264-70.
- PEDERSEN, B.K.; NIEMAN, D.C. (1998): **Exercise immunology: integration and regulation.**  
*Immunol Today* 19 (5) 204-6.
- PENG, J.; JONES, G.L.; WATSON, K. (2000): **Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements.**  
*Free Radic Biol Med* 28 (11) 1598-606.
- PETERSON, P.K.; SHARP, B.; GEKKER, G.; BRUMMITT, C.; KEANE, W.F. (1987): **Opioid-mediated suppression of interferon-gamma production by cultured peripheral blood mononuclear cells.**  
*J Clin Invest* 80 (3) 824-31.
- PLOTNIKOFF, N.P.; MURGO, A.J.; MILLER, G.C.; CORDER, C.N.; FAITH, R.E. (1985): **Enkephalins: immunomodulators.**  
*Fed Proc* 44 (1 Pt 1) 118-22.
- RAMACHANDRAN, J.; TSUBOKAWA, M.; GOHIL, K. (1987): **Corticotropin receptors.**  
*Ann N Y Acad Sci* 512 415-25.
- RASSAF, T.; PREIK, M.; KLEINBONGARD, P.; LAUER, T.; HEISS, C.; STRAUER, B.E.; FEELISCH, M.; KELM, M. (2002): **Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma.**  
*J Clin Invest* 109 (9) 1241-8.
- REDER, A.T. (1992): **Regulation of production of adrenocorticotropin-like proteins in human mononuclear cells.**  
*Immunology* 77 (3) 436-42.
- REDER, A.T.; PINAMANENI, S.; SMYKA, W.; NUTTER, D. (1988): **ACTH production by human mononuclear cells.**  
*Ann N Y Acad Sci* 540 589-91.
- RINIKER, B.; SIEBER, P.; RITTEL, W.; ZUBER, H. (1972): **Revised amino-acid sequences for porcine and human adrenocorticotrophic hormone.**  
*Nat New Biol* 235 (56) 114-5.
- ROBERTS, J.L.; HERBERT, E. (1977): **Characterization of a common precursor to corticotropin and beta-lipotropin: identification of beta-lipotropin peptides and their arrangement relative to corticotropin in the precursor synthesized in a cell-free system.**  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (12) 5300-4.
- ROSTAING, L.; TKACZUK, J.; DURAND, M.; PERES, C.; DURAND, D.; DE PREVAL, C.; OHAYON, E.; ABBAL, M. (1999): **Kinetics of intracytoplasmic Th1 and Th2 cytokine production assessed by flow cytometry following in vitro activation of peripheral blood mononuclear cells.**  
*Cytometry* 35 (4) 318-28.
- SANDI, C.; CAMBRONERO, J.C.; BORRELL, J.; GUAZA, C. (1990): **Modulation of lymphocyte proliferation reactivity by hypothalamic-pituitary-adrenocortical hormones.**  
*Neuroendocrinology* 52 (1) 63
- SCHAUER, U.; JUNG, T.; KRUG, N.; FREW, A. (1996): **Measurement of intracellular cytokines.**  
*Immunol Today* 17 (7) 305-6.

- SCHROEDER, S.; WICHERS, M.; KLINGMULLER, D.; HOFER, M.; LEHMANN, L.E.; VON SPIEGEL, T.; HERING, R.; PUTENSEN, C.; HOEFT, A.; STUBER, F. (2001): **The hypothalamic-pituitary-adrenal axis of patients with severe sepsis: altered response to corticotropin-releasing hormone.**  
*Crit Care Med* 29 (2) 310-6.
- SCHUERWEGH, A.J.; STEVENS, W.J.; BRIDTS, C.H.; DE CLERCK, L.S. (2001): **Evaluation of monensin and brefeldin A for flow cytometric determination of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in monocytes.**  
*Cytometry* 46 (3) 172-6.
- SEAMER, L.; SKLAR, L.A. (2001): **Time as a flow cytometric parameter.**  
*Methods Cell Biol* 63 169-83.
- SEAMER, L.C.; BAGWELL, C.B.; BARDEN, L.; REDELMAN, D.; SALZMAN, G.C.; WOOD, J.C.; MURPHY, R.F. (1997): **Proposed new data file standard for flow cytometry, version FCS 3.0.**  
*Cytometry* 28 (2) 118-22.
- SHAPIRO, H.M. (2001): **Principles of data acquisition and display.**  
*Methods Cell Biol* 63 149-67.
- SHAPIRO, L.; DINARELLO, C.A. (1995): **Osmotic regulation of cytokine synthesis in vitro.**  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (26) 12230-4.
- SHAPIRO, L.; DINARELLO, C.A. (1997): **Hyperosmotic stress as a stimulant for proinflammatory cytokine production.**  
*Exp Cell Res* 231 (2) 354-62.
- SHEPHERD, R.G.; WILLSON, S.D.; HOWARD, K.S.; BELL, P.H.; DAVIES, D.S.; DAVIS, S.B.; EIGNER, E.A.; SHAKESPEARE, N.E. (1956): **Studies with corticotropin. III. Determination of the structure of beta-corticotropin and its active degradation products.**  
*J Am Chem Soc* 78 5067-76
- SMITH, E.M.; BLALOCK, J.E. (1981): **Human lymphocyte production of corticotropin and endorphin-like substances: association with leukocyte interferon.**  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 78 (12) 7530-4.
- SMITH, E.M.; MORRILL, A.C.; MEYER WJ, 3.r.d.; BLALOCK, J.E. (1986): **Corticotropin releasing factor induction of leukocyte-derived immunoreactive ACTH and endorphins.**  
*Nature* 321 (6073) 881-2.
- SMITH, E.M.; BROSNAN, P.; MEYER, W.J.; BLALOCK, J.E. (1987): **An ACTH receptor on human mononuclear leukocytes. Relation to adrenal ACTH-receptor activity.**  
*N Engl J Med* 317 (20) 1266-9.
- SMITH, E.M.; GALIN, F.S.; LEBOEUF, R.D.; COPPENHAVER, D.H.; HARBOUR, D.V.; BLALOCK, J.E. (1990): **Nucleotide and amino acid sequence of lymphocyte-derived corticotropin: endotoxin induction of a truncated peptide.**  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (3) 1057-60.
- STADLER, B.M.; AEBISCHER, I.; STÄMPFLI, M.R.; MIESCHER, S.; VOGEL, M. (1994): **Neuroendocrine and autoimmune regulation of the allergic response.**  
*Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M* (87) 293-9.

- SULLIVAN, K.E.; CUTILLI, J.; PILIERO, L.M.; GHAVIMI-ALAGHA, D.; STARR, S.E.; CAMPBELL, D.E.; DOUGLAS, S.D. (2000): **Measurement of cytokine secretion, intracellular protein expression, and mRNA in resting and stimulated peripheral blood mononuclear cells.**  
*Clin Diagn Lab Immunol* 7 (6) 920-4.
- VITALE, M.; CARUSO, A.; LICENZIATI, S.; RODELLA, L.; FIORENTINI, S.; ZAULI, G.; CASTELLI, F.; MANZOLI, F.A.; TURANO, A. (2000): **Differential production of IFN-gamma, analyzed at the single-cell level, by specific subsets of human NK and T cells from healthy and HIV(+) subjects.**  
*Cytometry* 39 (3) 189-94.
- WERNER, J. (1984): **Medizinische Statistik.**  
*Urban & Schwarzenberg*, München, Wien, Baltimore, S. 172-6
- WESTLY, H.J.; KLEISS, A.J.; KELLEY, K.W.; WONG, P.K.; YUEN, P.H. (1986): **Newcastle disease virus-infected splenocytes express the proopiomelanocortin gene.**  
*J Exp Med* 163 (6) 1589-94.
- WOLOSKI, B.M.; SMITH, E.M.; MEYER WJ, 3.r.d.; FULLER, G.M.; BLALOCK, J.E. (1985): **Corticotropin-releasing activity of monokines.**  
*Science* 230 (4729) 1035-7.
- ZHU, X.; ZHOU, A.; DEY, A.; NORRBOM, C.; CARROLL, R.; ZHANG, C.; LAURENT, V.; LINDBERG, I.; UGLEHOLDT, R.; HOLST, J.J.; STEINER, D.F. (2002): **Disruption of PC1/3 expression in mice causes dwarfism and multiple neuroendocrine peptide processing defects.**  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (16) 10293-8.

### **Mein Dank gilt ...**

- ... Herrn Priv.-Doz. Dr. Roland Goerlich und Herrn Prof. Dr. Heinrich Enbergs für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung meiner Arbeit und den Zugang zu der Erkenntnis, wie wissenschaftliche Spezialisierung und die Erweiterung des fachlichen und persönlichen Horizonts vereinbar sind und sich gegenseitig fördern können;
- ... der Firma Biologische Heilmittel Heel GmbH, Baden-Baden, vertreten durch Herrn Dr. Erich Reinhart, für die großzügige finanzielle Unterstützung;
- ... dem Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin der Universität Bonn für die Bereitstellung der Buffy Coats;
- ... Frau Prof. Dr. Dr. Helga Sauerwein und Frau Prof. Dr. Brigitte Schmitz, Institut für Anatomie, Physiologie und Hygiene der Haustiere, jetzt Institut für Physiologie, Biochemie und Hygiene der Tiere (IAPH), Frau Prof. Dr. Heide Schnabl, Institut für Landwirtschaftliche Botanik (ILB), jetzt Institut für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen (IMBIO), sowie Herrn Prof. Dr. Hans Büning-Pfaue, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Lebensmittelchemie, alle Universität Bonn, für die freundliche Bereitstellung von Räumen und Geräten und ihren guten Zuspruch;
- ... den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilungen Anatomie und Physiologie sowie Biochemie des IAPH, und der Abteilung Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen des ILB, insbesondere Herrn Bernd Gehrig, Frau Claudia Müller, Frau Kathrin Peter und Frau Birgit Stimper für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Labor;
- ... Herrn Dr. Stefan Jahnecke aus der Abteilung von Herrn Prof. Enbergs sowie Herrn Dr. Torsten Klockenbring und Herrn Klaus Piepenbreier aus der Gruppe von Herrn Priv.-Doz. Goerlich für viele kritische und aufmunternde wissenschaftliche Diskussionen und persönliche Gespräche.

Mehr als an dieser Stelle eigentlich möglich danke ich meiner Familie, meiner Frau Andrea und meinen Kindern für alle Geduld und Unterstützung.