

Aus der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Kardiologie

Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. med. Bernhard Maisch

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

und des Universitätsklinikums Giessen und Marburg, Standort Marburg

Koffein inhibiert die lymphozytäre Zytokinsynthese

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Katja Hohenberger aus Berlin

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg am
15.09.2005

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. Bernhard Maisch

Referent: Prof. Dr. med. Bernhard Maisch

Korreferent: PD Dr. Bacher

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Koffein mindert die Zytotoxizität aktivierter Lymphozyten	6
1.2	T-Zell-Aktivierung und intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel	7
1.3	Pharmakologische RyR-Modulatoren.....	9
1.4	Zytokine	9
1.4.1	IL-2	10
1.4.2	IFN- γ	10
1.4.3	TNF- α	11
1.4.4	Kardiotoxische Effekte von Zytokinen.....	11
2	Material & Methoden	12
2.1	Versuchstier	12
2.2	Präparation der Milz.....	12
2.3	Bestimmung des Anteils lebender Zellen.....	13
2.4	Zellkultur	13
2.5	Messmethoden	14
2.5.1	ELISA	14
2.5.2	Durchflusszytometrie.....	17
3	Ergebnisse.....	22
3.1	Vorbereitende Versuche	22
3.2	Koffein.....	24
3.3	Ryanodin.....	26
3.4	Ryanodin und Koffein.....	27
3.5	Ausschluss der Zytotoxizität eingesetzter Substanzen	28
4	Diskussion	30
4.1	Koffein beeinflusst die Ca^{2+} -Homöostase der Lymphozyten	30
4.2	Koffein interagiert mit Ryanodinrezeptoren.....	31
4.3	Koffein interagiert mit IP3-Rezeptoren	33
5	Zusammenfassung	34
6	Referenzen	35

7	Abkürzungen	42
8	Verzeichnis der akademischen Lehrer	44
9	Danksagung	45
10	Ehrenwörtliche Erklärung.....	46
11	Curriculum Vitae von Katja Hohenberger	47

1 Einleitung

1.1 Koffein mindert die Zytotoxizität aktivierter Lymphozyten

In-vitro werden Kardiomyozyten der Maus im Sinne einer Transplantat-Abstoßung von allogenen Lymphozyten als fremd erkannt und lysiert. Ritter et al. [50] zeigten in-vitro, dass allosensitive Lymphozyten innerhalb von 14-16 Stunden 80% der Kardiomyozyten lysieren. Zugabe von Koffein 3,75mM reduziert den lysierten Anteil der Myozyten von 80% auf 50%. In einem vergleichbaren Experiment zeigten Felzen et al. [17] ebenfalls, dass Koffein allogene Kardiomyozyten vor der Lyse durch aktivierte peritoneale Lymphozyten schützt.

Weiterhin konnten Ritter et al. Koffein-sensible Ryanodinrezeptoren (RyR) in naiven Lymphozyten der Maus nachweisen, die auf Koffein mit einem intrazellulären Kalziumanstieg reagierten [50]. Die Vorbehandlung mit Ryanodin (1µM) verhinderte den Effekt des Koffeins.

Ferner demonstrierten Guse AH et al. [22] die Beteiligung von RyR-gesteuerten Ca^{2+} -Speichern im Aktivierungsprozess von Jurkat-T-Lymphozyten.

Die Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern ist ein zentrales Element der Signaltransduktion von extrazellulären Reizen in das Zellinnere [18]. Es wurde mehrmals beschrieben, dass die Aktivierung des T-Lymphozyten eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels nach sich zieht. Dabei handelt es sich nicht um einen einfachen Konzentrationsanstieg des Ca^{2+} , sondern vielmehr um zum Teil oszillierende Ca^{2+} -Signale, deren Amplitude, Dauer und Frequenz ausschlaggebend ist für die folgenden intrazellulären Reaktionen [18]. Beispielsweise führten intrazelluläre Ca^{2+} -Signale zur Aktivierung unterschiedlicher proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit von Dauer und Amplitude des Signals [14]. Die Beschaffenheit des intrazellulären Ca^{2+} -Signals stellt demzufolge einen wichtigen Trigger für die Reaktion der Zelle auf extrazelluläre Stimuli dar.

Es ist bekannt, dass Koffein intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher entleert. Da es in Vorversuchen die Zytotoxizität allogener Lymphozyten gegen Kardiomyozyten reduzierte, stellt sich die Frage, ob dieser Effekt auf den Einfluss von Koffein auf intrazelluläre RyR-gesteuerte Ca^{2+} -Speicher zurückzuführen ist.

Diese Arbeit konzentriert sich auf den Einfluss von Koffein auf indirekte toxische Effekte von Immunzellen, welche über second messenger wie Zytokine vermittelt werden. Insbesondere waren dabei die Auswirkungen von Koffein auf die Synthese von $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$ von Interesse, da diese Zytokine als kardiotoxisch bekannt sind (siehe 1.4.4). Zur Beurteilung des Effektes von Koffein auf die Aktivierung von T-Lymphozyten wurde IL- 2 als Indikator für aktivierte T-Zellen [5] bestimmt.

1.2 T-Zell-Aktivierung und intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel

Neben der spezifischen Aktivierung eines bestimmten T-Zell-Klons durch Bindung von TCR/CD3-Komplex an das entsprechende Ag lassen sich T-Lymphozyten mit Hilfe von Mitogenen auch unspezifisch aktivieren. Das in dieser Arbeit verwendete Mitogen Concanavalin A aktiviert T-Lymphozyten durch unspezifische Bindung an Glykoproteine der Zellmembran einschließlich des TCR-CD3-Komplexes [28].

Nach Bindung des Liganden an den TCR/CD3-Komplex auf der Zelloberfläche werden rezeptorassoziierte Tyrosinkinase auf zytoplasmatischer Seite aktiviert. Diese aktivierten Enzyme phosphorylieren Tyrosinresiduen der zytoplasmatischen Arme des TCRs, welche dann wiederum als Bindungsstelle für weitere Kinasen und andere Signalmoleküle dienen. Eine der Kinasen, die durch Bindung an phosphorylierte Arme des TCRs aktiviert wird, ist PKC- γ . PKC- γ setzt nach Aktivierung aus plasmalemalem PIP_2 die second messenger DAG und IP_3 frei, wobei DAG einen neuen Signalweg über PKC initiiert, den ich hier nicht weiter beschreiben möchte. Vielmehr werde ich in

folgendem Abschnitt auf die Funktion von IP3 eingehen, welches zu einem intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg führt.

Ein frühes Ereignis während der Aktivierung innerhalb der T-Zelle ist ein intrazelluläres Ca^{2+} -Signal, welches zunächst aus einem schnellen Ca^{2+} -Anstieg oder Ca^{2+} -Peak besteht und nach seinem Abfall von einem erneuten, plateauförmigen Ca^{2+} -Anstieg abgelöst wird. Der plateauförmig erhöhte Ca^{2+} -Spiegel ist dabei nicht konstant, sondern unterliegt Oszillationen, die sich durch Amplitude und Frequenz beschreiben lassen. Änderungen des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels haben Einfluss auf die Aktivierung von intrazellulären Transkriptionsfaktoren und damit auf die Genexpression [14][34][54].

Das Ca^{2+} -Signal beginnt zunächst durch die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern, was daraufhin den Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} hervorruft und so die Plateauphase des Ca^{2+} -Signals aufrecht erhält. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung fungiert als Trigger [34].

Bisher sind zwei Rezeptoren bekannt, die an der intrazellulären Freisetzung von Ca^{2+} während der T-Zellaktivierung beteiligt sind: RyR und IP3R.

Ryanodinrezeptoren sind vor allem für die Aufrechterhaltung des Ca^{2+} -Plateaus verantwortlich, das dem initialen Ca^{2+} -Peak folgt [12]. Bei der T-Zellaktivierung entsteht neben IP3 auch cADPR, der physiologische Agonist des Ryanodinrezeptors [22]. cADPR sensitiviert den RyR für Ca^{2+} und ruft so einen Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Ausstrom CICR (Ca^{2+} induced Ca^{2+} release) aus RyR-gesteuerten Ca^{2+} -Speichern hervor [36][30]. Das dem initialen Ca^{2+} -Peak folgende Ca^{2+} -Plateau wird durch den CICR via RyR und den transmembranalen Ca^{2+} -Einstrom aufrechterhalten [34]. Weitere RyR-Agonisten sind Pi, Palmitoyl-CoA, PKA, PKG und CaM-Kinase [12], wobei ihre Rolle für den Ca^{2+} -Haushalt in T-Zellen bisher nicht klar ist.

IP3-abhängige Rezeptoren sind für die Entstehung des initialen Ca^{2+} -Peaks wesentlich, der als Trigger für transmembranalen Ca^{2+} -Einstrom dient [2][3][34]. Ihr physiologischer Agonist IP3 entsteht zu einem frühen Zeitpunkt während der T-Zell-Aktivierung durch -wie bereits beschrieben -Phospholipase C γ .

1.3 Pharmakologische RyR-Modulatoren

Heute kennt man drei RyR-Typen: RyR-Typ1 des Skelettmuskels; RyR-Typ2 des Herzmuskels und RyR-Typ3 des ZNS und der T-Lymphozyten [58]. Koffein induziert an allen drei RyR-Subtypen eine Calciumkanalöffnung [58] und damit einen Calciumausstrom, indem es die Affinität von Calcium zum Ryanodinrezeptor steigert und so einen CICR hervorruft [13][31][38][45]. Der Effekt von Koffein ist durch das Waschen der Zellen reversibel. Ryanodin ist ein weiterer pharmakologischer Modulator des RyR-gesteuerten Ca^{2+} -Ausstroms mit dosisabhängiger Wirkung: nur in nanomolaren bis geringen mikromolaren Konzentrationen entleert es das Calcium in den Intrazellularraum [16]. Bei höheren mikromolaren Konzentrationen ab 100mM blockiert es den Ryanodinrezeptor [37][43].

1.4 Zytokine

Der Begriff Zytokine umfasst eine heterogene Gruppe kleiner Proteine (ca.15-30 kDa), die bei Aktivierung von Leukozyten und anderen verschiedenen Zellen freigesetzt werden. Im Rahmen der Immunantwort dienen Zytokine ihrer Modulation, indem sie autokrin das Verhalten der exprimierenden Zelle selbst beeinflussen, parakrin auf die Zellen der Umgebung wirken und endokrin auf entfernte Zellen, wenn Zytokine in den Blutkreislauf gelangen und ihre Halbwertszeit das zulässt.

Zytokine üben ihre Wirkung über spezifische Rezeptoren aus und beeinflussen die Aktivierung und Proliferation von Immunzellen, ihre Invasion an einen bestimmten Ort und die Bildung von Antikörpern oder weiterer Zytokine.

Wir konzentrierten uns auf die Bestimmung von IL-2, TNF- α und IFN- γ , um den Einfluss von Koffein auf die Zytokinexpression zu testen, da die kardiotoxischen Eigenschaften dieser Zytokine bekannt sind. Sie beeinträchtigen nicht nur die Funktion von Kardiomyozyten, indem sie negativ inotrop wirken [55], sondern können zu Apoptose oder Nekrose von Kardiomyozyten und Endothelzellen

führen [25][46][51]. Des Weiteren zogen wir IL-2 in unsere Messungen mit ein, da es wesentlich an der Aktivierung und Proliferation der T-Lymphozyten beteiligt ist. T-Lymphozyten nehmen in der Abstoßung allogener Transplantate eine zentrale Stellung ein, da sie die Zellen des Spenderorgans als fremd erkennen und gezielt angreifen [64].

1.4.1 IL-2

IL-2 ist ein für aktivierte T-Lymphozyten spezifisches Zytokin [64]. Es wird bei TCR-vermittelter Aktivierung der T-Lymphozyten simultan mit der fehlenden α -Kette des IL-2R (CD25) exprimiert. Dabei sind weitere akzessorische Mediatoren, wie die Anwesenheit von IL-1 und IL-6 und die Interaktion von B7-Molekülen (CD80 oder CD88) mit CD28 wichtig.

IL-2 entstammt damit aktivierten T-Zellen, die den vollständigen, hochaffinen IL-2R CD25 exprimieren.

Sezerniertes IL-2 bindet an den zelleigenen IL-2R und induziert die Proliferation und klonale Expansion der aktivierten, CD25⁺ T-Zelle. Auf diese Weise vermehren sich nur die T-Zellen, deren TCR mit dem spezifischen Ag aktiviert worden ist. Weiterhin vermittelt IL-2 die Aktivierung von B-Lymphozyten, NK, Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen [5].

1.4.2 IFN- γ

IFN- γ wird in erster Linie von aktivierten T-Helfer₁-Zellen sezerniert, aber auch von T-Effektorzellen und NK (Natürliche Killerzellen). IFN- γ vermittelt die gesteigerte Expression von MHC-I und MHC-II [42]. Weiterhin steigert IFN- γ die Antigen-Präsentation und Zytokinsynthese durch Monozyten/Makrophagen und aktiviert sie zur Adhärenz, Phagozytose, Sekretion und NO-Synthese. Auch NK und Neutrophile werden durch IFN- γ aktiviert. IFN- γ unterstützt die Leukozytenadhärenz an Endothelzellen über die Induktion von ICAM-1. Hier wirkt IFN- γ synergistisch mit TNF- α und IL-1[5].

1.4.3 TNF- α

TNF- α wird neben aktivierten Lymphozyten, Neutrophilen, Granulozyten, NK-Zellen, Endothelzellen und Mastzellen hauptsächlich von aktivierten Makrophagen synthetisiert [5].

Die Aktivierung von Makrophagen mit resultierender Synthese von TNF- α ist abhängig von IFN- γ . Aktivierte CD4-positive T-H1-Zellen sowie CD8-positive T-Killer-Zellen synthetisieren IFN- γ und sind maßgeblich an der Aktivierung von Makrophagen beteiligt. Neben IFN- γ benötigen Makrophagen noch einen weiteren unspezifischen Reiz u.a. durch den CD40-Liganden aktivierter T-Lymphozyten, der mit CD40 der Makrophagen interagiert, oder durch LPS aus der Außenmembran gram-negativer Bakterien, das an TLR (toll-like-receptor)-2 und TLR-4 der Makrophagen bindet [5].

TNF- α vermittelt seine Auswirkungen durch Bindung an zwei Rezeptoren TNFR-I und TNFR-II. Dadurch vermittelt TNF- α seine Wirkung wie zytotoxische Effekte auf maligne-entartete Zellen. Weiterhin aktiviert es Neutrophile Granulozyten, fördert ihre Chemotaxis, Adhärenz und Degranulation.

1.4.4 Kardiotoxische Effekte von Zytokinen

Neben Ischämie oder mechanischen kardialen Störungen werden neurohormonelle und immunologische Prozesse für die Entstehung der chronische Herzinsuffizienz (CHI) verantwortlich gemacht.

In der Literatur finden sich viele Beispiele für erhöhte Serumlevel von TNF- α [1][32][41][61][63] bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz. Tierexperimente ergaben, dass TNF- α und IFN- γ Apoptose in Herzmuskelzellen auslösen [29][48][26]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass TNF- α und IFN- γ durch Herabsetzen der kardiomyozytären Kontraktilität negativ-inotrop wirken [21][57][62][68].

Auch für IL-2 konnten direkte negativ-inotrope Effekte [20] und indirekte, durch aktivierte Lymphozyten vermittelte kardiotoxische Wirkungen nachgewiesen werden [69][15].

2 Material & Methoden

2.1 Versuchstier

Es wurden wie in den voraus gegangenen Versuchen von Ritter M et al. [50] männliche BALB/c- Mäuse verwendet, die im Alter von 6 Wochen von der Firma Harlan und Winkelmann in Borsten geliefert wurden. In diesen Versuchen wurden insgesamt 45 Tiere verwendet. Die Firma garantiert infektionsfreie und gesunde Tiere bei Lieferung, da sie während der Zucht regelmäßig auf Infektionen getestet werden. Die Tiere wurden mit 5 Mäusen pro Käfig (40x 30x 30cm) im laboreigenen Tierstall bei konstanter Temperatur von 22°C, 55-60% Luftfeuchte und einem 12h/ 12h Tag-/ Nachtrhythmus gehalten. Die Versorgung erfolgte mit Futter ad libitum.

Die Bedingungen der Tierhaltung entsprachen den Bestimmungen für den Tierversuchsantrag zuständigen Genehmigungsbehörde (RP, Giessen). Alle Versuche erfolgten mit Genehmigung des Regierungspräsidiums Giessen.

2.2 Präparation der Milz

Nach Töten durch Genickbruch wurde den 6-8 Wochen alten Versuchstieren die Milz unter sterilen Kautelen der Sterilbank entnommen und in eisgekühltes Zellmedium (RPMI 1640 [GibcoBRL], 1% Nonessential Amino acids 100x [Sigma], 1% Natrium-Pyruvat MEM 100MM [GibcoBRL], 10U/ml Penicillin G, 100µg/ml Streptomycin, 10% fetal calf serum) aufgenommen.

Zum Herstellen einer Zellsuspension wurde die entnommene Milz zusammen mit 10ml Zellmedium mit Hilfe eines sterilen Spritzenstumpfs durch ein Nylonsieb gepresst, das einem Falcontube [BD] aufsaß. Anschließend wurde über das Netz noch einmal Medium in den Falcontube pipettiert, um restliche Zellen zu lösen.

Zum anschließenden Waschen wurde die Zellsuspension bei 700U/min zentrifugiert. Das überstehende Medium wurde unter der Sterilbank abgesaugt und das Pellet erneut in Zellmedium gelöst. Dieser Waschgang erfolgte dreimal, bevor die Zellen ausgezählt und kultiviert wurden.

2.3 Bestimmung des Anteils lebender Zellen

Die Zelldichte der gewaschenen Zellsuspension wurde mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. Dazu wurde eine entnommene Probe auf eine geeignete Zelldichte verdünnt, mit Trypanblau 0,4% [Sigma] gefärbt und auf die Zählkammer aufgetragen (entstehender Verdünnungsfaktor = F).

Trypanblau kann die Zellmembran abgestorbener Zellen leichter durchdringen als die vitaler Zellen. Zusätzlich verfügen vitale Zellen im Gegensatz zu abgestorbenen Zellen über Transportmechanismen, die den aufgenommenen Farbstoff aus der Zelle eliminieren. Deshalb färben sich abgestorbene Zellen blau an und lassen sich gut von vitalen, nicht-gefärbten Zellen unterscheiden.

Durch Mittelung der Anzahl ausgezählter Zellen in 4 Eckquadraten konnte die durchschnittliche Zellzahl/ml der Suspension nach folgender Formel bestimmt werden: $X/\text{ml} = (\text{mittlere Zellzahl pro Quadrat}) \times 10.000 / F \text{ ml}$

2.4 Zellkultur

Aus der gewaschenen Zellsuspension wurden Zellkulturen der Zelldichte von 10^7 Zellen/ml auf 4x6 Well-Kulturplatten [BD] mit Zellmedium und im folgenden genannten Ingredienzien angelegt.

Neben unbehandelten Kontrollen nur mit Medium und ConA-stimulierten ($5\mu\text{g/ml}$ [Sigma]) Kontrollen wurden Zellkulturen mit den wie folgt beschriebenen steril gefilterten Ingredienzien (Filter $0,4\mu\text{m}$ [Millipore]) angesetzt. Dabei wurde eine Mindestversuchszahl n von 7 vorausgesetzt.

Koffein-behandelte Zellkulturen inkubierten während der Stimulation mit ConA ($5\mu\text{g/ml}$) mit Koffein ($3,75\text{mM}$ und 10mM [Sigma]).

Weitere Zellkulturen wurden zunächst 30 Minuten mit Ryanodin (Sigma) in den Endkonzentrationen von 100pM , 1nM , 10nM , 100nM , $1\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$ vorbehandelt, bevor sie anschließend entweder nur mit ConA ($5\mu\text{g/ml}$) oder gemeinsam mit ConA ($5\mu\text{g/ml}$) und Koffein ($3,75\text{mM}$ und 10mM) über 24h inkubierten.

Außerdem inkubierten Zellkulturen während der Stimulation mit ConA ($5\mu\text{g/ml}$) mit Cyclosporin A (100nM , 1000nM [Sigma]) oder mit Amiodaron ($0,1\mu\text{g/ml}$, $1\mu\text{g/ml}$ und $10\mu\text{g/ml}$ [Sigma]).

Nach Inkubation bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre über 24h wurde der Zellüberstand durch Zentrifugieren (900rpm) vom Pellet getrennt, aliquotiert (300µl) und bei –80°C eingefroren.

2.5 Messmethoden

2.5.1 ELISA

Standardprotokoll für jedes getestete Zytokin

Die Konzentration von TNF- α , IL-2 und IFN- γ im Zellüberstand wurde mit ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) bestimmt (DuoSet ELISA; R&D systems). ELISAs wurden entsprechend des Protokolls des Herstellers durchgeführt.

Pro Platte anzusetzen:

Waschpuffer, 600ml	0,05% Tween in PBS (GibcoBRL); pH 7,2- 7,4
Blockpuffer, 30ml	5% Saccharose (Carl Roth GmbH& Co.) 1% BSA (Dade-Behring Marburg GmbH) in PBS; 0,2 µm gefiltert
Reagent-Lsg., 50ml	1% BSA in PBS; pH 7,2- 7,4; 0,2 µm gefiltert
Substrat-Lsg., 10ml	50% Color-Reagent A (H ₂ O ₂) 50% Color-Reagent B (Tetramethylbenzidin)
Stopp-Lösung, 5ml	2NH ₂ SO ₄ (Merck)
Capture-Ak, 10ml	Ziege anti-Maus TNF- α in PBS 0,8µg/ml Ratte anti-Maus IFN- γ ; in PBS 4µg/ml Ratte anti-Maus IL-2; in PBS 1µg/ml
Detection-Ak, 10ml	Biotin-gekoppelter Ziege anti-Maus-TNF- α Ak (300ng/ml) Biotin-gekoppelter Ziege anti-Maus-IFN- γ Ak (400ng/ml) Biotin-gekoppelter Ziege anti-Maus-IL-2 Ak (400ng/ml)

Capture-Ak

Zunächst wird die Microtest-Platte (96 wells, flat bottom [BD]) mit dem für das zu testende Zytokin spezifischen Capture-Antikörper unter sterilen Bedingungen

gecoatet, indem in jedes Well 100µl des in PBS gelösten Capture-Antikörpers pipettiert werden und anschließend über Nacht bzw. 12 Stunden inkubiert.

Proben und Standards

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden restliche, ungebundene Substanzen durch drei Waschzyklen entfernt. Dazu pipettiert (8-Kanal-Pipette; Eppendorf) man in jedes Well 400µl des Waschpuffers und entfernt den Puffer anschließend durch Ausklopfen der Platte auf sauberem Saugpapier. Die Platte inkubiert danach für mindestens eine Stunde mit 100µl/ Well Blockpuffer. In dieser Zeit wird die Standardverdünnungsreihe mit rekombinantem Zytokin der Maus (IL-2, IFN- γ oder TNF- α) mit den Zytokinkonzentrationen (2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 pg/ml) angelegt. Ebenfalls wird eine Leerprobe (Kulturmedium) vorbereitet, um später die durch unspezifische Bindungen der Marker entstehende Extinktion bestimmen zu können. Die Extinktion der Leerprobe wird bei der Auswertung von den Extinktionen der Testseren und Standards subtrahiert.

Nach Entfernen des Blockpuffers und Waschen der Platte trägt man nun die Standards, die Leerprobe und die Testseren auf die Platte auf, indem jeweils immer in zwei Wells 100µl derselben Probe bzw. desselben Standards pipettiert werden. Die Platte inkubiert dann für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Jedes freie Zytokin des zu testenden Typs kann nun an den spezifischen Capture-Antikörper binden und wird so am Well fixiert.

Detection-Ak und Marker

Erneutes Waschen nach Ablauf der Inkubation entfernt restliche ungebundene Substanzen. Nun wird der in Reagent-Diluent gelöste Detection-Ak mit 100µl pro Well aufgetragen und inkubiert für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Der Detection-Ak bindet an das fixierte Zytokin. Restliche nicht-gebundene Antikörper werden nach der Inkubation durch drei Waschzyklen entfernt. Anschließend inkubiert die Platte über 20 Minuten mit 100µl/Well Streptavidin-HRP-Lösung (in Reagent-Lsg. 1:200 verdünnte Streptavidin-HRP des ELISA-Sets). Die an Streptavidin gekoppelte Horse-Radish-Peroxydase bindet selektiv

an die im Well fixierten, Biotin-haltigen Immunkomplexe aus Capture-Ak-Zytokin-Detection-Ak (via STREPT-Biotin-Brücke). Überschüssige Streptavidin-HRP wird in weiteren drei Waschzyklen entfernt. Nun pipettiert man in jedes Well 100µl der Substrat Lösung und inkubiert die Platte für 20 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur.

Farbreaktion

Die an den Immunkomplex gebundene Horse-Radish-Peroxydase oxydiert unter Verwendung von H_2O_2 das farblose Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) zu einem blau-farbigem Derivat, das photometrisch nach Stoppen der Reaktion quantifiziert wird. Die Intensität der Farbentwicklung ist proportional zur Menge des gebundenen Enzyms und damit zur Menge der Zytokin-Immunkomplexe. Zugabe der Stopplösung $2NH_2SO_4$ inaktiviert das Enzym und verursacht durch pH-Änderung einen Farbumschlag nach Gelb. Innerhalb der nächsten 20 Minuten wird der ELISA photometrisch ausgewertet.

Auswertung des ELISAs

Da die Konzentrationen der Standards bekannt sind, lässt sich durch Zuordnen der gemessenen optischen Dichte zur jeweiligen Standardkonzentration die Standardkurve ermitteln. Dabei verhalten sich optische Dichte und Zytokinkonzentration (pg/ml) nach folgender Formel zueinander:

$$\lg(OD) = a + b \cdot \lg(x); \quad \begin{array}{l} x = \text{Zytokinkonzentration (pg/ml)} \\ a = \lg(\text{der optischen Dichte [Zytokin]} = 1 \text{pg/ml}) \\ b = \text{Steigung der Standardkurve} \\ OD = \text{Mittelwert optische Dichte} \end{array}$$

$$\Leftrightarrow x = 10^{[\lg(OD)+a]/b}$$

Anhand dieser Funktion kann jetzt jeder gemessenen optischen Dichte die entsprechende Zytokinkonzentration zugeordnet werden. Auf diese Weise werden die unbekannt Konzentrationen der getesteten Proben bestimmt.

Die dort verwendete Software Revelation übernimmt die Auswertung der Messwerte, indem sie Standardkurve und Regressionskoeffizient direkt bestimmt und anhand dessen anschließend die Zytokinkonzentration der Testseren berechnet.

2.5.2 Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie wurde uns freundlicherweise ein Gerät der Abteilung für Klinische Chemie der Universitätsklinik Marburg zur Verfügung gestellt. Folgende Antikörper wurden verwendet:

Antigen	Exprimierende Zellen	Ak(I)-Klon	Ak(II)-Isotyp	Farbstoff	Konzentration
Maus BALB/c					
CD45	Hämatopoet. Zellen	30-F11	Ratte IgG2b	PerCP PE	1µg/ 1Mio Zellen
CD3, ε-Kette	T-Lymphozyten	145-2C11	Hamster IgG1	FITC	1µg/ 1Mio Zellen
CD4	T-Helfer	H129.19	Ratte IgG2a	FITC PE	1µg/ 1Mio Zellen
CD8, α-Kette	T-Effektor	53-6.7	Ratte IgG2a	FITC	1µg/ 1Mio Zellen
CD45/B220	B-Lymphozyten	RA3-6B2	Ratte IgG2a	PerCP	1µg/ 1Mio Zellen
NK	NK	DX5	Ratte IgM	FITC	1µg/ 1Mio Zellen
Mac-3	Makrophagen	M3/84	Ratte IgG1	PE	1µg/ 1Mio Zellen
Ly-6G/C	Granulozyten	RB6-8C5	Ratte IgG2b	FITC	1µg/ 1Mio Zellen

Versuchsaufbau

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse FACS ermöglicht die quantitative Erfassung von markierten Antigenen der Zelloberfläche und des Zytoplasmas.

Die Einzelzellsuspension mit 1×10^6 Zellen/ml inkubiert zunächst mit dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper. Durch spezifische Bindung der Antikörper werden die Antigene des zu testenden Typs mit dem Fluoreszenzfarbstoff markiert.

Farbstoff-Fluoreszenz

Es ist möglich, verschiedene Antigene bei einer Messung zu quantifizieren, da Farbstoffe mit unterschiedlichen, für sie charakteristischen Emissionsspektren existieren, die aber alle bei derselben Wellenlänge des LASERs zur Fluoreszenz angeregt werden können.

FSC und SSC

Senkrecht zum Durchfluss trifft ein gebündelter LASER-Strahl geeigneter Wellenlänge (hier 418nm) auf die Zellen und regt den Farbstoff der Marker zur Fluoreszenz an. Ausserdem wird der LASER durch die Zelle selbst gestreut, was man sich zur Analyse der Zellgrösse und Granularität zu nutze macht: Nicht abgelenktes Licht wird vom FSC (forward sorting scatter) registriert. Je kleiner die Zellen sind, desto weniger Licht wird durch die Zelle gestreut und desto höher ist die Intensität des im FSC einfallenden Lichts. Vom einfallenden LASER im rechten Winkel abgelenktes Licht trifft auf den SSC (sideward sorting scatter). Die hier registrierte Intensität steigt mit der Granularität der Zellen. Die Detektoren des FSC und SSC wandeln das einfallenden Lichts in elektrische Impulse um (photoelektrischer Impuls). Da das ebenfalls streuende Licht der fuoreszierenden Farbstoffe nicht im FSC und SSC registriert werden soll, sind den Detektoren Fliter vorgeschaltet, die nur für Licht der Wellenlänge des LASERs durchlässig sind.

Auswertung der FACS-Daten

Histogramm

Das Histogramm stellt die Anzahl der Ereignisse eines Detektors in Abhängigkeit von der Signalintensität dar. Zellen, die zwar Antigen-(+) sind, es aber nicht in so großen Mengen besitzen, wie andere Zellen der gemessenen Population, erzeugen am Detektor ein weniger intensives Signal. Weiterhin dient diese Darstellung dem Ausschluss von Hintergrundstrahlung durch unspezifische Bindung der Marker (siehe folgender Abschnitt: Isotypenkontrollen).

Isotypenkontrollen

Um sicher zu sein, dass der durch den markierten Antikörper erzeugte Peak aufgrund seiner spezifischen Bindung an sein Antigen entstanden ist und nicht aufgrund unspezifischer Bindung auch an Antigen-freie Zellen, werden Isotypenkontrollen bei jeder Messung mitgeführt. Man verwendet einen mit demselben Farbstoff verkoppelten unspezifischen Antikörper. Das durch ihn erzeugte Signal (in Abb.1 Rot) wird mit dem des spezifischen Antikörpers im Histogramm-Overlay (in Abb.1 Blau) verglichen. Der zusätzlich erzeugte Peak entspricht dem Signal des spezifischen Antikörpers, die überlappenden Peaks entsprechen den Signalen durch die Hintergrundstrahlung.

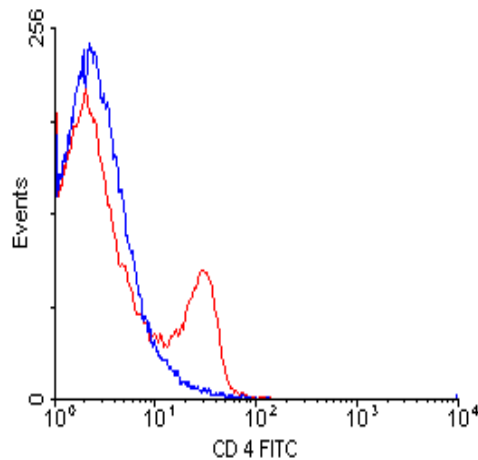


Abb.1

Overlay-Histogramm von Splenozyten mit unspezifischem Ak **Ratte-IgG2a** (blaue Linie) und spezifischem Ak **Ratte-IgG2a-anti-Maus CD4** (rote Linie).

Man erkennt den Peak des spezifischen Antikörpers, der den Ereignissen der Bindungen von anti-CD4 an CD4 der Zellen entspricht.

Überlagerte Peaks entsprechen der Hintergrundstrahlung durch Eigenfluoreszenz der Zellen.

Dot plot

Im Dot Plot werden die Signale zweier Detektoren gegeneinander aufgetragen. Durch Dot Plot Darstellung von FSC und SSC können Zellpopulationen bestimmter Größe und Granulärität eingegrenzt werden. Durch Setzen eines Gates um diese Zellgruppe schließt man alle anderen Zellen von der Auswertung aus. So ist es möglich, nur Lymphozyten zu beurteilen und die Anteile ihrer Subpopulationen zu bestimmen.

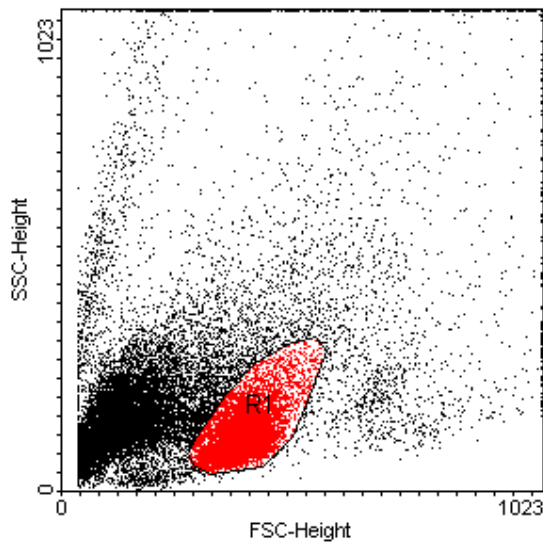
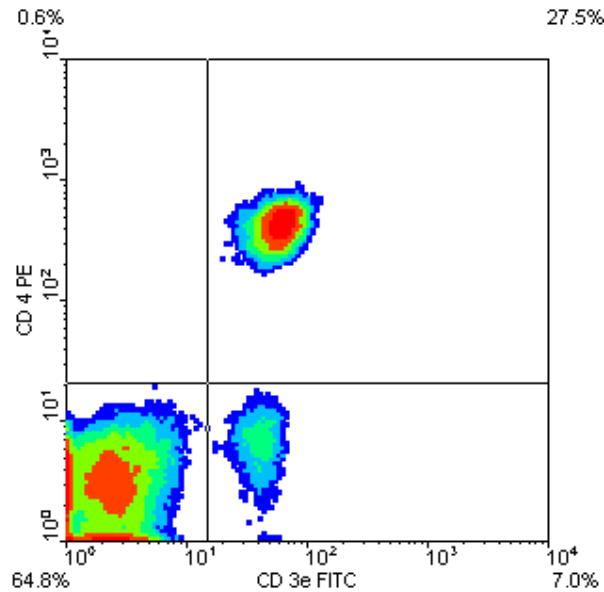


Abb.2

Dot Plot einer Zellsuspension von Splenozyten mit Auftragung des SSC-Signals gegen das FSC-Signal.

Die markierte Region (rot) entspricht der Population Mononukleärer Zellen mit Lymphozyten und Monozyten.

Trägt man die Signale zweier Detektoren für die Fluoreszenzsignale gegeneinander auf, können zweifarbig-fluoreszierende Zellen von einfarbig-fluoreszierenden unterschieden werden, was doppelt-positiven und einfach-positiven Zellen entspricht. Die Anteile der einzelnen Populationen lassen sich mit Hilfe der Software auswerten.

**Abb.3**

Density plot einer doppelt gefärbten Probe mononukleärer Zelle; CD4+ Ereignisse sind gegen CD3+ Ereignisse aufgetragen. CD4+ Helfer T-Zellen gehören zu den T-Zellen mit TCR/CD3+ Komplex und sind damit doppelt CD4+/CD3+. Sie bilden sich im Quadranten oben, rechts ab und beteiligen sich mit 27,5% an der Gesamtpopulation mononukleärer Zellen. Der Anteil der gesamten CD3+ T-Zellen entspricht 35,5% und berechnet sich durch Addition der Populationsanteile der beiden rechten Quadranten.

Die ausgewerteten Daten der FACS-Analyse des Versuchsteils sind im Ergebnisteil in tabellarischer Form dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Vorbereitende Versuche

Bestimmung der Subpopulation der Lymphozyten im Splenozyten-Zellpool

Die Verteilung der Zelltypen einschließlich der CD4+ und CD8+ Subpopulationen der T-Lymphozyten im Splenozytenpool wurde vor Inkubation mit Concanavalin A mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht (n=6). (Tab.1)

Zelltyp	Antigen	Zelltyp% \pm S.D.
T-Lymphozyten	CD 3	40 \pm 2
T-Helfer	CD 4	23 \pm 2
T-Effektor	CD 8	17 \pm 1
B-Lymphozyten	B 220	37 \pm 9
Nat. Killerzellen	NK	3 \pm 2
Makrophagen	Mac3	16 \pm 5
Granulozyten	Ly-6G	4 \pm 2

Immunstimulation in-vitro

Splenozyten wurden durch Concanavalin A stimuliert, das eine etablierte Methode darstellt um gezielt Lymphozyten zu aktivieren [64].

Zur Bestimmung einer geeigneten Inkubationsdauer mit ConA inkubierten Splenozyten derselben Dichte von 10^7 Zellen/ ml über verschieden lange Zeiträume von 6, 12, 18 und 24 Stunden mit ConA (5 μ g/ml). Eine Kontrolle ohne ConA wurde mitgeführt.

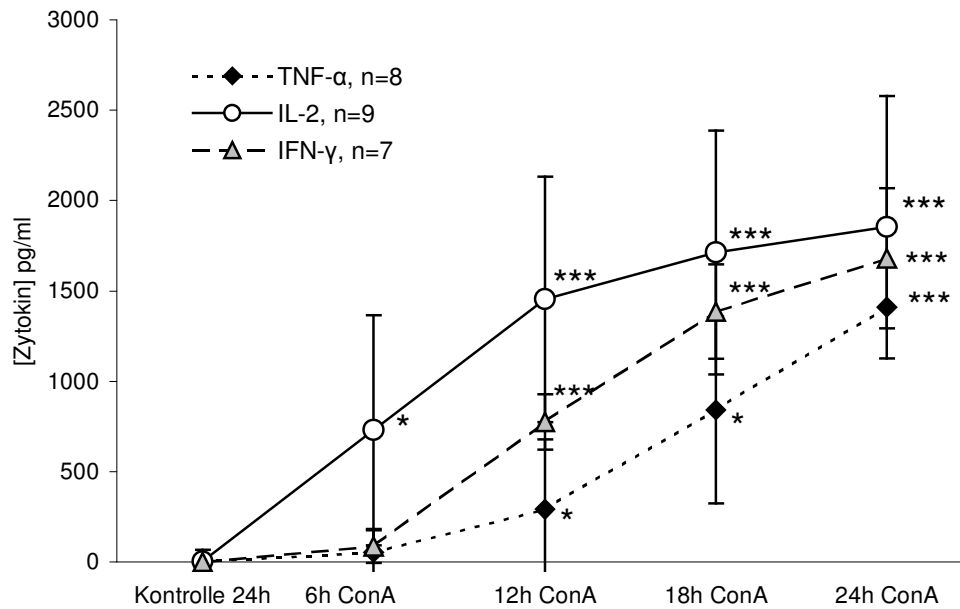


Abb.4

Splenozyten $10^7/\text{ml}$ wurden über 6, 12, 18 und 24h mit ConA ($5\mu\text{g}/\text{ml}$) stimuliert. Die Konzentration von TNF- α , IL-2 und IFN- γ im Zellüberstand der Testseren und Kontrollen wurden mit ELISA bestimmt. Darstellung von Mittelwert \pm S.D. und Signifikanz zur unbehandelten Kontrolle: $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$.

Abb.6 zeigt den zeitabhängigen Anstieg von TNF- α , IL-2 und IFN- γ nach Inkubation mit ConA ($5\mu\text{g}/\text{ml}$). Bereits nach 12h lagen alle Zytokinlevel signifikant über den jeweiligen Kontrollen und stiegen bis 24h weiter an. Sämtliche Kontrollen hatten Zytokinlevel $< 1,5\text{ pg}/\text{ml}$ zu allen Messzeitpunkten.

Zur Bestimmung einer geeigneten Zelldichte inkubierten Splenozyten (1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 Zellen/ml) über 24h mit ConA ($5\mu\text{g}/\text{ml}$). Eine Zellkultur ohne ConA diente als Kontrolle.

Abb. 7 zeigt, dass die Expression von TNF- α , IFN- γ und IL-2 mit Erhöhung der Zellzahl zunimmt und ab Zelldichten von 10^7 Zellen/ml signifikant wird im Vergleich zur Kontrolle.

Aus den Ergebnissen der Vorversuche folgernd wurden eine Zelldichte von 10^7 Zellen/ml und eine Inkubationsdauer von 24 Stunden in allen weiteren Versuchen gewählt.

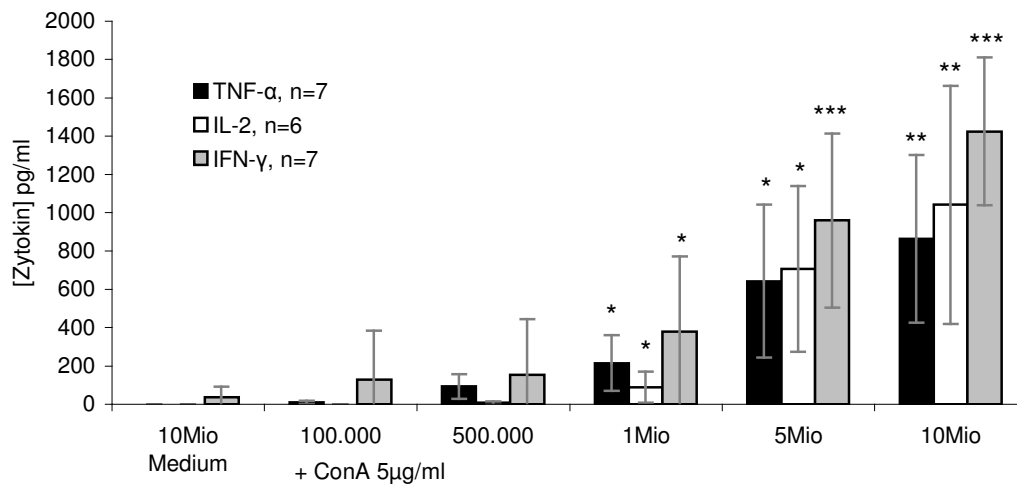


Abb.5

Splenozyten der Zell-dichten 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 und 10^7 Zellen/ ml wurden mit ConA ($5 \mu\text{g/ml}$) über 24h stimuliert. Die Konzentration von TNF- α , IL-2 und IFN- γ im Zellüberstand wurden mit ELISA bestimmt. Darstellung von Mittelwert +/- SD und Signifikanz zur unbehandelten Kontrolle: $p < 0,01$ **;
 $p < 0,001$ ***.

3.2 Koffein

Zur Ermittlung des Einflusses von Koffein auf die Zytokinexpression wurden Splenozyten mit ConA und Koffein (3,75mM oder 10mM) über 24 Stunden inkubiert. Durch Zugabe von Koffein wurde die Expression von IFN- γ , TNF- α und IL-2, verglichen mit der ConA-stimulierten Kontrolle ohne Koffeinzusatz signifikant unterdrückt (Abb. 8).

Die IFN- γ -Expression zeigte weder bei Koffein 3,75mM ($\text{SD} \pm 0,11\%$) noch bei Koffein 10mM ($\text{SD} \pm 0\%$) einen signifikanten Unterschied zur Kultur in Medium ohne ConA. Die Synthese der ConA-stimulierten Splenozyten von TNF- α ließ sich durch Koffein 10mM soweit unterdrücken, dass sie sich nicht mehr von der unstimulierten Kontrolle unterschied. IL-2 verringerte sich durch Koffein 3,75mM auf 9,4 % der mit ConA stimulierten Vergleichsgruppe. Auch Koffein in der höheren Dosierung von 10mM war nicht in der Lage, die IL-2-Expression der mit ConA behandelten Zellen auf das Level der unbehandelten Kontrolle zu senken.

Um die Effektivität von Koffein mit der eines bekannten Immunsuppressivums vergleichen zu können, wurde die Zytokinfreisetzung stimulierter Splenozyten unter Behandlung mit Cyclosporin A (CsA) gemessen. Dazu wurden Splenozyten ($10^7/\text{ml}$) mit Cyclosporin A (100;1000nM) während der Stimulation durch ConA ($5\mu\text{g}/\text{ml}$) über 24h inkubiert. Beide Substanzen, Koffein und Cyclosporin A, hatten vergleichbare zytokinsuppressive Effekte.

CsA 100nM und Koffein 10mM unterschieden sich nicht in ihrem Effekt auf die IL-2-Synthese. CsA (1000nM) unterdrückte die Expression von IL-2 signifikant stärker als Koffein 10mM, genauso wie CsA (100;1000nM) die IL-2-Suppression von Koffein 3,75mM hoch signifikant übertraf. Umgekehrt verhielt es sich bei der Synthese von TNF- α , denn hier wirkte Koffein stärker supprimierend als CsA. Erst die Inkubation mit CsA der höchsten Konzentration von 1000nM reduzierte TNF- α so stark, dass keine signifikanten Unterschiede zu Koffein-behandelten Proben feststellbar waren. Die Freisetzung von IFN- γ wurde durch CsA und Koffein gleichermaßen verhindert (Abb.8).

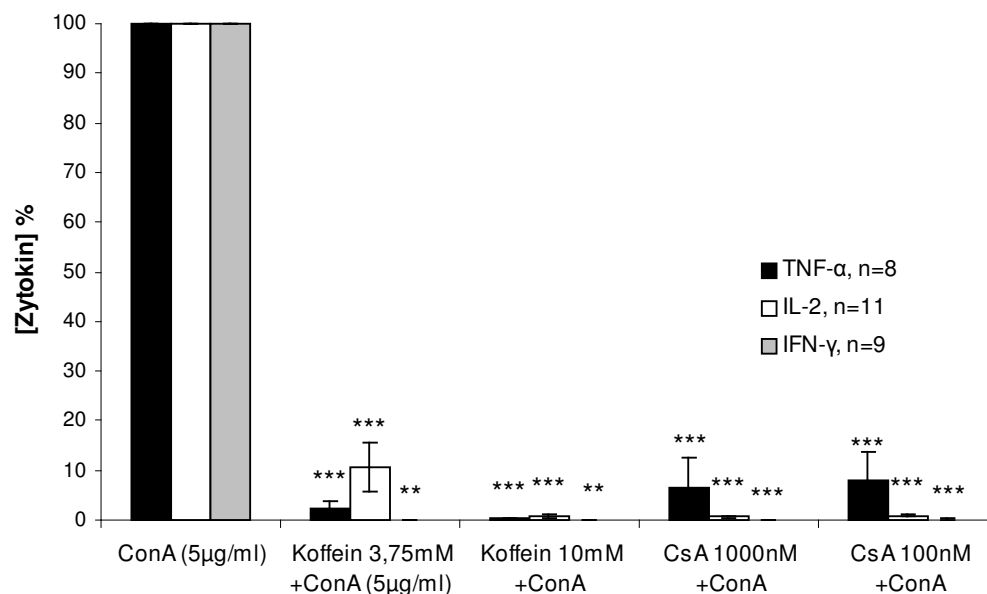


Abb.6

Splenozyten $10^7/\text{ml}$ inkubierten während der Stimulation mit ConA ($5\mu\text{g}/\text{ml}$) entweder mit Koffein (3,75mM;10mM) oder mit CsA (100nM; 1000nM) über 24h. Bestimmung der Konzentration von TNF- α , IL-2, IFN- γ im Zellüberstand. Normierte Darstellung von Mittelwert \pm SD und Signifikanz zur Kontrolle mit ConA: $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***.

3.3 Ryanodin

In vorausgegangenen Experimenten konnten Ritter et al. [50] zeigen, dass Koffein intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher entleert und so zu einem stetig ansteigenden Ca^{2+} -Spiegel führt. Die Vorbehandlung mit Ryanodin ($1\mu\text{M}$) verhinderte die Freisetzung von Ca^{2+} durch Koffein. Ryanodin bindet spezifisch und mit hoher Affinität an Ryanodinrezeptoren [11]. Welche Auswirkungen die spezifische Beeinflussung RyR-gesteuerter Ca^{2+} -Speicher als ein Teilaspekt des Wirkungsspektrums von Koffein auf die Zytokinsynthese hat, sollte in dieser Messreihe gezeigt werden. Ryanodin wurde in aufsteigenden Konzentrationen von 100pM bis $10\mu\text{M}$ getestet, um ein breites Spektrum abzudecken. Als Anhalt diente die Konzentration $1\mu\text{M}$ aus den Vorversuchen von Ritter et al. [50].

Die Zytokinfreisetzung der Ryanodin-behandelten Zellen wurde im Gegensatz zu Koffein-behandelten Zellen kaum beeinflusst. Allerdings zeigte sich, dass Ryanodin-behandelte Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit ConA weniger $\text{TNF-}\alpha$ exprimierten als es unvorbehandelte Zellen unter ConA taten. Dieser Effekt trat bei allen verwendeten Ryanodin-Konzentrationen auf.

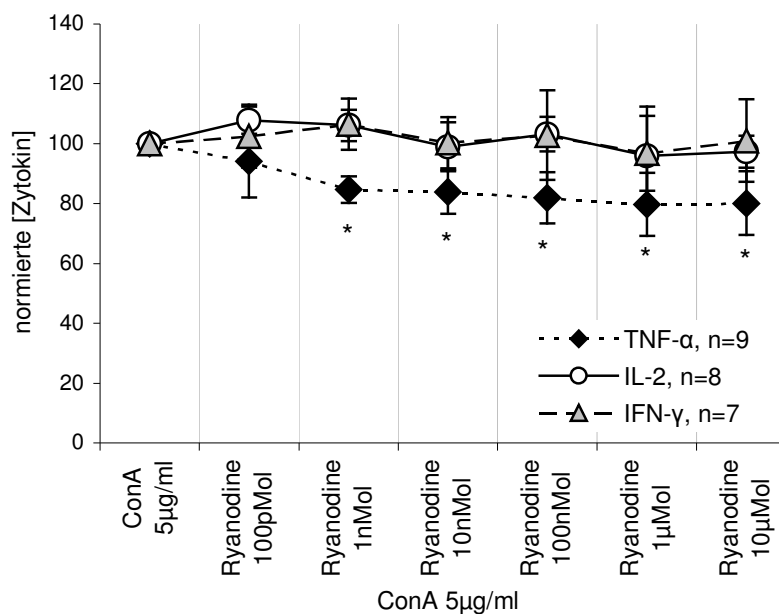


Abb.7

Splenozyten ($10^7/\text{ml}$) wurde Ryanodin in Konzentrationen von 100pMol bis $10\mu\text{Mol}$ 30min vor ConA-Stimulation zugesetzt. Konzentrationen von $\text{TNF-}\alpha$, IL-2 und $\text{IFN-}\gamma$ wurden mit ELISA bestimmt. Normierte Darstellung der Mittelwerte und der Signifikanzen in Bezug zur ConA-stimulierten Kontrolle ohne Ryanodin. Signifikanz: $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$.

Die TNF- α -Konzentration verringerte sich dabei mit Reduktion der Ryanodin-Konzentration. Bei 10 μ M Ryanodin betrug die TNF- α -Konzentration 94% der ConA-behandelten Kontrolle und war bei 100pMol Ryanodin auf 80% gefallen.

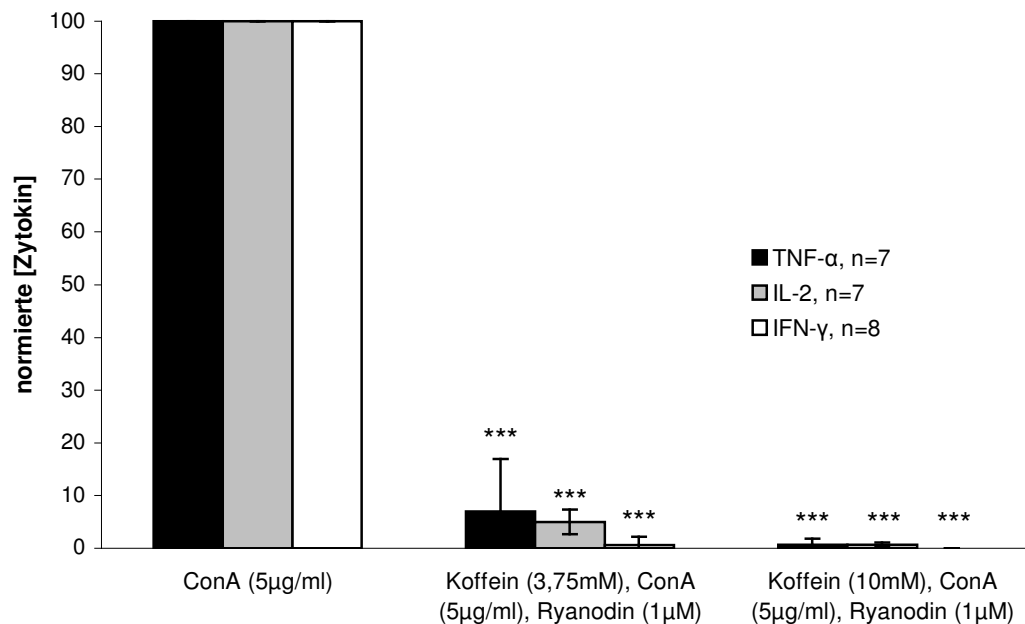
3.4 Ryanodin und Koffein

Es ist bekannt, dass Koffein intrazelluläre, Ryanodin-Rezeptor gesteuerte Kalziumspeicher entleert. Ritter et al. [50] hatten in früheren Versuchen zeigen können, dass Koffein einen solchen Kalziumausstrom auch in Lymphozyten auslöst. Wurden die Zellen jedoch 30 Minuten vor der Koffeinzugabe mit Ryanodine inkubiert, war die Koffein-induzierte Speicherentleerung nicht mehr zu beobachten.

Analog dazu wurden die Splenozyten in diesem Versuch ebenfalls mit Ryanodin (10 μ M;1 μ M;100nM;10nM;1nM;100pM) vorbehandelt, indem es 30 Minuten vor Zugabe von Koffein (3,75mM und 10mM) und ConA dem Zellmedium zugesetzt wurde. Als Kontrolle dienten nicht-vorbehandelte Zellen, die lediglich gemeinsam mit ConA und Koffein inkubiert wurden.

Ryanodin konnte die Koffein-induzierte Zytokinsuppression nicht verhindern (Abb.10). Die Zytokinsynthese der Ryanodin-vorbehandelten Zellen war ebenso supprimiert wie die der Gruppe, die lediglich mit ConA und Koffein behandelt worden war. Die Zytokinsuppression verhielt sich unabhängig von der verwendeten Konzentration für Ryanodin. Abb.10 stellt die Ergebnisse der mit Ryanodin 1 μ M behandelten Zellkulturen dar, da Ritter et al. [50] mit dieser Konzentration arbeiteten.

Weiterhin wird aus Abb.10 ersichtlich, dass Koffein unabhängig von der verwendeten Konzentration des Ryanodins während der Vorbehandlung mit Zunahme der Konzentration seine Zytokinsuppressivität steigert. Die Zunahme der Zytokinsuppression durch Steigerung der Koffeindosis ist unabhängig von Effekten des Ryanodins.

**Abb.8**

Splenozyten ($10^7/ml$) wurden mit Ryanodin in verschiedenen Konzentrationen (100pM-10µM) vorbehandelt. 30min nach Zugabe von Ryanodin wurde ConA (5µg/ml) gemeinsam mit Koffein (3,75mM oder 10mM) zugesetzt. ConA-stimulierte und unbehandelte Kontrollen wurden mitgeführt. Konzentrationen von TNF-α, IL-2 und IFN-γ wurden mit ELISA bestimmt. Normierte Darstellung der Mittelwerte und der Signifikanzen in Bezug zur ConA-stimulierten Kontrolle ohne Ryanodin. Signifikanz: $p < 0,001$ ***.

3.5 Ausschluss der Zytotoxizität eingesetzter Substanzen

Um die Toxizität der Zellbehandlung ausschließen zu können, wurde die Vitalität der Zellkultur vor Beginn und nach Ablauf der Inkubation von 24 Stunden in jedem Experiment mit der Trypanblau- Färbemethode bestimmt.

Direkt nach der Präparation der Zellkultur betrug der Anteil gefärbter Zellen im Mittel 10% und der Anteil lebender Zellen damit 90%. Nach Ablauf der Inkubationszeit (24h) zeigten unbehandelte Zellkulturen sowie ConA-stimulierte Proben einen Anteil von 30% blau-gefärbter Zellen.

Auch die Zytotoxizität von Koffein auf die Splenozyten wurde mit der Trypanblau- Färbemethode ausgeschlossen. Der Anteil gefärbter Zellen in der Kultur, die 24h mit ConA und Koffein (3,75mM;10mM) behandelt worden war, betrug im Mittel 30% (Abb.12) und unterschied sich nicht von dem der

unbehandelten Kontrolle (Abb.13). Das entspricht den Ergebnissen von Ritter et al. [50].

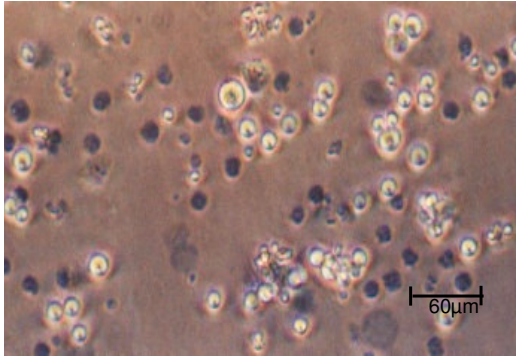


Abb.9
Splenozyten 10^7 /ml inkubierten über 24h Stunden mit ConA und Koffein (10mM). Anschliessende Färbung mit Trypanblau 0,4%.

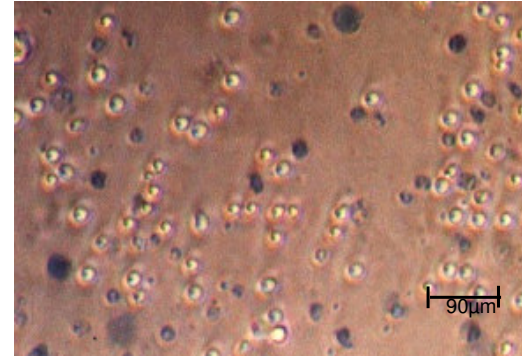


Abb.10
Splenozyten 10^7 /ml inkubierten über 24h Stunden mit Medium. Anschliessende Färbung mit Trypanblau 0,4%.

Immunstimulation in vitro

Ryanodin, Amiodaron und CyclosporinA mussten zum Herstellen der Stocklösung in reinem Alkohol gelöst und dann im Medium weiter verdünnt werden. Zur Messung der Zytotoxizität wurden deshalb neben der Kontrolle nur mit Medium, Kontrollen mit der entsprechenden Ethanolkonzentration im Medium mitgeführt. Für Ryanodin, Amiodaron und CyclosporinA konnten keine zytotoxischen Eigenschaften gezeigt werden. Der Anteil blau gefärbter Zellen entsprach nach Ablauf der Inkubation (24h) im Mittel 30% und damit dem der Kontrollen.

4 Diskussion

4.1 Koffein beeinflusst die Ca^{2+} -Homöostase der Lymphozyten

Ritter M et al. [50] konnten in früheren Experimenten zeigen, dass Koffein den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel in primären Lymphozyten erhöht. Dieser Effekt wurde durch die Vorbehandlung der Zellen mit Ryanodin ($1\mu\text{M}$) verhindert, was darauf hinweist, dass Koffein den Ca^{2+} -Anstieg durch Freisetzung aus RyR-gesteuerten Ca^{2+} -Speichern induziert. Weiterhin verminderte die Vorbehandlung mit Koffein den intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg, der durch Aktivierung mit Concanavalin A in primären Lymphozyten induziert wird und unterbrach das Oszillieren zytosolischer Ca^{2+} -Spiegel aktivierter B-Lymphozyten. Koffein ($3,75\text{mM}$) reduzierte außerdem die Zytotoxizität von Lymphozyten gegen allogene Kardiomyozyten um mehr als 50%.

Die Erhöhung intrazellulärer Ca^{2+} -Spiegel stellt ein essentielles Triggersignal für die Aktivierung der T-Zellen durch spezifische Antigene oder unspezifische Mitogene dar [33][47][49][66]. Es konnte gezeigt werden, dass Calcium als intrazellulärer Botenstoff in Abhängigkeit seiner Konzentration bestimmte Reaktionen innerhalb der T-Zelle hervorruft. Beispielsweise demonstrierten Dolmetsch et al. [14], dass die proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren NF κ B und c-Jun N-terminale Kinase JNK selektiv durch einen raschen Calciumanstieg aktiviert werden, während die Aktivierung von NF-AT durch einen anhaltenden, aber niedrigeren Ca^{2+} -Spiegel induziert wird [14]. Ferner stellten Sloan-Lancaster et al. [54] einen Zusammenhang zwischen der Höhe intrazellulärer Ca^{2+} -Spiegel und dem Grad der Aktivierung von T-Lymphozyten fest [54]. Die vollständige Aktivierung durch spezifische TCR-Agonisten induzierte höhere Ca^{2+} -Level als eine partielle Aktivierung durch Peptidliganden, sogenannte APL, die vom spezifischen TCR-Agonisten geringfügig abweichen. Wie ausserdem Lewis RS [33] feststellte, ist die Dauer, Amplitude und Kinetik des anhaltenden Ca^{2+} -Signals nach T-Zell-Stimulation ausschlaggebend für die Effizienz und Spezifität der Gen-aktivierenden Ereignisse. Die IL-2-Expression setzt die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren

NFAT, Oct/OAP und NFkB voraus, welche, wie Dolmetsch und Lewis [14] zeigen konnten, durch ein hochfrequent oszillierendes Ca^{2+} -Signal aktiviert werden. NFkB, zusätzlich ein Promoter der IL-8-Synthese, lässt sich im Gegensatz durch infrequent auftretende Spikes und damit unabhängig von NFAT und Oct/Oat aktivieren [14]. Intrazelluläre Ca^{2+} -Signalmuster sowie Ca^{2+} -Spiegel scheinen also die Funktion der Lymphozyten zu modulieren.

Aufgrund dieser Erkenntnissen stellten wir die Hypothese auf, dass Koffein durch Beeinflussung der lymphozytären Ca^{2+} -Homöostase via Interaktion mit RyR-abhängigen Ca^{2+} -Speichern die lymphozytäre Zytotoxizität reduziert [50]. Diese Arbeit konzentriert sich auf die Frage, ob der Effekt von Koffein auf intrazelluläre Ca^{2+} -Signalmuster zu Änderungen der Zytokinexpression führt und auf diese Weise die Zytotoxizität lymphatischer Effektorzellen gegen allogene Kardiomyozyten vermindert. Es wurden in dieser Arbeit vor allem Zytokine untersucht, die eine beeinträchtigende Wirkung auf Kardiomyozyten haben [48][57][69]. Weiterhin wurde IL-2 als Marker der T-Zellaktivierung bestimmt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Koffein (3,75mM; 10mM) die Zytokinexpression von unspezifisch durch ConA stimulierten Splenozyten nahezu komplett unterdrückt. Dabei ist der Effekt von Koffein vergleichbar mit dem von Cyclosporin A (100;1000nM), einem bekannten Immunsuppressivum [10][67].

4.2 Koffein interagiert mit Ryanodinrezeptoren

Unsere Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Koffein durch Störung der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase die Zytokinsynthese reduziert. Aus der Physiologie der Kardiomyozyten ist bekannt, dass Koffein RyR-gesteuerte intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher sehr effektiv entleert und dadurch einen signifikanten intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg erzeugt. Dies gilt auch für Lymphozyten und andere erregbare Zellen [49][23].

Da bisher wenig über die Funktion lymphozytärer Ryanodinrezeptoren bekannt ist, interessierten wir uns für ihre Rolle bei der Zytokinexpression. Zellkulturen wurden dazu vor Aktivierung durch ConA mit Ryanodin (100pM-10µM) vorbehandelt. Ryanodin interagiert spezifisch und konzentrationsabhängig mit Ryanodinrezeptoren: Experimentelle Studien haben ergeben, dass nanomolare Konzentrationen (10nM) von Ryanodin die RyR-Leitfähigkeit auf ein normales Level steigern [7][59]. In einer Übergangsdosis von etwa 1µM reduziert sich die Leitfähigkeit auf etwa 50% [8][9][39][44][59]. Ab mikromolaren Konzentration von 100µM wird der RyR-vermittelte Ca²⁺-Ausstrom blockiert [6][18][40][43][59].

In unseren Experimenten hatte die Ryanodinbehandlung weder Auswirkungen auf die Synthese von IL-2 und IFN-γ, noch konnte sie den Zytokin-supprimierenden Effekt von Koffein auf stimulierte Zellen verhindern. Daraus folgt, dass eine durch Ryanodin verursachte Elimination des Ryanodinrezeptors aus der intrazellulären Ca²⁺-Signalkaskade die Expression von IL-2 und IFN-γ nicht stört. Ähnliche Ergebnisse beschreiben Takeshima H et al. [60], denn sie konnten zeigen, dass entsprechend gezüchtete Mäuse ohne RyR3 keine offensichtliche Dysfunktion der Lymphozyten aufweisen [60]. Die Mäuse entwickelten sich normal und unterschieden sich nicht vom Wildtyp. Weiterhin zeigten kultivierte Splenozyten ohne RyR3 nach Stimulation durch Mitogene wie ConA ein normales Proliferationsverhalten und unterschieden sich in der [³H]-Thymidin Aufnahme vor und nach Stimulation nicht von Splenozyten der Wildtypen [60].

Die Tatsache, dass Ryanodin die Synthese von TNF-α um etwa 20% reduziert, legt die Vermutung nahe, dass RyR-gesteuerte Ca²⁺-Speicher an der Synthese von TNF-α beteiligt sind. TNF-α wird hauptsächlich von Monozyten/Makrophagen synthetisiert [5], welche zu 16±5% in der Zellkultur vertreten waren. Jedoch sind auch aktivierte Lymphozyten, NK-Zellen und Neutrophile in der Lage, TNF-α zu exprimieren [5], sodass es deshalb nicht möglich ist, festzustellen, in welchen Zellen Ryanodin die Synthese von TNF-α unterdrückte: in Lymphozyten, Makrophagen oder beiden Zelltypen.

4.3 Koffein interagiert mit IP3-Rezeptoren

Neben seiner Eigenschaft RyR-gesteuerte Ca^{2+} -Speicher zu entleeren beeinflusst Koffein durch einen weiteren Effekt die Ca^{2+} -Homöostase der Lymphozyten: Koffein blockiert IP3-Rezeptoren [4][53]. IP3R sind ebenfalls von essentieller Bedeutung für die Aktivierung der Lymphozyten. Die Stimulation der T-Zelle durch das Antigen setzt eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang, die über die Aktivierung von Phospholipase C zur Entstehung von Diacylglycerol und IP3 führt. IP3 induziert durch die Entleerung IP3R-gesteuerter Ca^{2+} -Speicher den transplasmalemalen Eintritt von Ca^{2+} [2][3][34]. Wie Jayaraman et al. [27] zeigen konnte, sind mutante T-Lymphomzellen der Maus ohne Typ1-IP3R weder in der Lage, intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel zu steigern, noch IL-2 zu exprimieren.

Aus diesem Grund ist es möglich, dass Koffein in unseren Experimenten intrazelluläre Ca^{2+} -Signale durch Interaktion mit IP3-Rezeptoren beeinflusst hat und die Zytokinsynthese auf diese Weise unterdrücken konnte. Damit würde sich auch erklären lassen, weshalb die Vorbehandlung mit Ryanodin den Effekt von Koffein nicht verhindern konnte.

5 Zusammenfassung

Koffein verändert intrazelluläre Kalziumsignalmuster von Lymphozyten, die nach Stimulation im Rahmen der Zellaktivierung messbar sind. Dieser Effekt wird wahrscheinlich durch den Einfluss von Koffein auf intrazelluläre Ryanodinrezeptor Typ 3-gesteuerte Kalziumspeicher bedingt, welche bei Exposition von Koffein Calcium freisetzen. Weiterhin reduziert Koffein die Zytotoxizität von Lymphozyten gegen allogene Kardiomyozyten.

Welche zytotoxischen Mechanismen durch Koffein tatsächlich unterdrückt werden, ist noch unbekannt.

In dieser Arbeit sollten die Auswirkungen von Koffein auf die Expression von IL-2, einem Marker der T-Zell-Aktivierung, sowie der als kardiotoxisch bekannten Zytokine IFN- γ und TNF- α gezeigt werden. Zu diesem Zweck wurden Splenozyten-Kulturen, welche Lymphozyten zu 87% enthalten, unspezifisch durch Concanavalin A (ConA, 5 μ g/ml) stimuliert, worauf sie mit einem signifikanten Anstieg von TNF- α , IL-2 und IFN- γ im Zellüberstand reagierten. Die Inkubation der Splenozyten mit Koffein (3,75mM; 10mM) während der Stimulation verhinderte die Zytokinexpression komplett. Ryanodin 1 μ Mol blockt Ryanodinrezeptoren spezifisch und verhindert den Koffein-induzierten Calciumausstrom. In unseren Experimenten hatte Ryanodin (100 pM - 10 μ M) keinen Einfluss auf die durch ConA stimulierte Expression von IL-2 und IFN- γ . Jedoch konnte die Expression von TNF- α durch Ryanodin (100pM-10 μ M) um bis zu 20% reduziert werden im Vergleich zur ConA-stimulierten Kontrolle. Weiterhin hatte Ryanodin keine Auswirkungen auf die Koffein-induzierte Zytokinsuppression in ConA -stimulieren Splenozyten.

Anhand dieser Ergebnisse postulieren wir, dass Koffein die die Zytokinsynthese hemmt und dadurch zu einer verminderten Zytotoxizität der Lymphozyten gegen allogene Kardiomyozyten führt. Der Ryanodinrezeptor-abhängige intrazelluläre Calciumspeicher scheint in diesem Prozess keine signifikante Rolle zu spielen. Eventuell ist eine durch Koffein verursachte Blockade von IP3-Rezeptoren verantwortlich für die Zytokinsuppression.

6 Referenzen

- [1] Aukrust P, Ueland T, Lien E, Bendtzen K, Muller F, Andreassen AK, Nordoy I, Aass H, Espevik T, Simonsen S, Froland SS, Gullestad L. Cytokine network in congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 1999;83:376-382.
- [2] Berridge MJ & Irvine RF. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature.* 1984;312:315-321.
- [3] Berridge MJ. Actions of inositol phosphates on Ca^{2+} pools in guinea-pig hepatocytes. *Biochem J.* 1984;220:345-360.
- [4] Bezprozvanny I, Bezprozvannya S & Ehrlich BE. Caffeine-induced inhibition of inositol(1,4,5)-triphosphate-gated calcium channels from cerebellum. *Mol Biol Cell.* 1994;5:97-103.
- [5] Borish LC & Steinke JW. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(2):460-475.
- [6] Buck E, Zimanyi I, Abramson JJ & Pessah IN. Ryanodine stabilizes multiple conformational states of the skeletal muscle calcium release channel. *J Biol Chem.* 1992;267:23560-67.
- [7] Bull R, Marengo J, Suarez-Isla B, Donoso P, Sutko J & Hidalgo C. Activation of calcium channels in sarcoplasmic reticulum from frog muscle by nanomolar concentrations of ryanodine. *Biophys J.* 1989;56:749-756.
- [8] Carroll S, Skarmeta JG, Yu X, Collins KD & Inesi G. Interdependence of ryanodine binding, oligomeric receptor interactions, and Ca^{2+} release regulation in junctional sarcoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys.* 1992;290:239-247.
- [9] Chu A, Diaz-Munoz M, Hawkes MJ, Brush K & Hamilton S. Ryanodine as a probe for the functional state of the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum calcium release channel. *Mol Pharmacol.* 1990;37: 735-741.
- [10] Clipstone NA, Crabtree GR (1992) Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature.* 25;357(6380):695-697.

-
- [11] Coronado R, Morrissette J, Sukhareva M, Vaughan DM. Structure and function of ryanodine receptors. *Am J Physiol.* 1994;266:C1485-C1504.
- [12] da Silva CP, Guse AH. Intracellular Ca^{2+} release mechanisms: multiple pathways having multiple functions within the same cell type? *Biochimica et Biophysica Acta.* 2000;1498:122-133.
- [13] DeGubareff T, Sleator Jr. W. Effects of caffeine on mammalian atrial muscle and its interaction with adenosin and calcium. *J Pharmacol Exp Ther.* 1965;148:202-14.
- [14] Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI. Differential activation of transcription factors induced by Ca^{2+} response amplitude and duration. *Nature.* 1997;386:855–858.
- [15] Eisner RM, Husain A, Clark JI. Case report and brief review: IL-2-induced myocarditis. *Cancer Invest.* 2004;22(3):401-4.
- [16] Endo M, Tanaka M & Ogawa Y. Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature.* 1970;228:34-36.
- [17] Felzen B, Berke G, Rosen D, Binah O. Mechanisms whereby cytotoxic T lymphocytes damage guinea-pig ventricular myocytes in vitro. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 1994;427:422-31.
- [18] Fewtrell C (1993) Ca^{2+} oscillations in non-excitable cells. *Annu Rev Physiol.* 55:427-54.
- [19] Fill M, Copello JA. Ryanodine receptor calcium release channels *Physiol Rev.* 2002; 82: 893–922.
- [20] Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG & Simmons RL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science.* 1992;257:387-389.
- [21] Goldhaber JI, Kim KH, Natterson PD, Lawrence T, Yang P, & Weiss JN. Effects of TNF-alpha on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and contractility in isolated adult rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol.* 1996;271:H1449-H1455.
- [22] Guse AH, da Silva CP, Berg I, Skapenko AL, Weber K, Heyer P, Hohenegger M, Ashamu GA, Schulze-Koops H, Potter BVL & Mayr GW.

-
- Regulation of calcium signaling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature*. 1999;398:70-73.
- [23] Guse AH, Roth E, Emmerich F. Intracellular Ca^{2+} pools in Jurkat T-lymphocytes. *Biochemical Journal*. 1993; 291: 447-451.
- [24] Hancox JC. Amiodarone blocks L-type calcium current in single myocytes isolated from the rabbit atrioventricular node. *Gen Pharmacol*. 1997 Sep;29(3):429-35.
- [25] Ing DJ, Zang J, Dzau VJ, Webster KA & Bishopric NH. Modulation of cytokine-induced cardiac myocyte apoptosis by nitric oxide, Bak and Bcl-x. *Circulation Research*.1999;84:21-33.
- [26] Ing DJ, Zang J, Dzau VJ, Webster KA, Bishopric NH (1999) Modulation of cytokine-induced cardiac myocyte apoptosis by nitric oxide, Bak and Bcl-x. *Circulation Research*. 84:21-33.
- [27] Jayaraman T, Ondriasova E, Ondrias K, Harnick DJ, Marks AR. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is essential for T-cell receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:6007–11.
- [28] Kay JE. Mechanisms of T lymphocyte activation. *Immunology Letters*. 1991;(29)51– 54.
- [29] Krown KA, Page MT, Nguyen C, Zechner D, GutierrezV, Comstock KL et al. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes: involvement of the sphingolipid signalling cascade in cardiac cell death. *J Clin Invest*. 1996;98:2854–65.
- [30] Lee HC. Physiological functions of cyclic ADP-Ribose andNAADP as calcium messengers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:317-45.
- [31] Lee HC. Potentiation of calcium- and caffeine-induced calcium release by cyclic ADP-ribose. *J Biol Chem*. 1993;268:293-299.
- [32] Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit H, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med*. 1990;323:236–41.
- [33] Lewis RS & Cahalan MD. Potassium and calcium channels in lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:623-53.

-
- [34] Lewis RS. Calcium signaling in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:497-521.
- [35] Lubic SP, Nguyen KP, Dave B, Giacomini JC. Antiarrhythmic agent amiodarone possesses calcium channel blocker properties. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1994;24(5):707-14.
- [36] Mackrill JJ. Protein-protein interactions in intracellular Ca^{2+} -release channel function. *Biochem J.* 1999; 337:345-61.
- [37] Malgaroli A, Fesce R & Meldolesi J. Spontaneous $[\text{Ca}^{2+}]$ fluctuation in rat chromaffine cells do not require inositol 1,4,5-triphosphate elevations but are generated by a caffeine- and ryanodine-sensitive intracellular Ca^{2+} store. *J Biol Chem.* 1990;265:3005-8.
- [38] McPherson, PS, Kim YK, Valdivia H, Knudson CM, Takekura H, Franzini-Armstrong C, Coronado R & Campbell K. The brain ryanodine receptor: a caffeine-sensitive calcium release channel. *Neuron.* 1991;7:17-25.
- [39] Meissner G. Ryanodine activation and inhibition of the Ca^{2+} release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 1986;261: 6300-6306.
- [40] Meissner G. Ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu Rev Physiol.* 1994;56:484–508.
- [41] Munger, MA, Johnson, B, Amber, IJ, Callahan, KS, & Gilbert, EM: Circulating concentrations of proinflammatory cytokines in mild or moderate heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 1996;77:423-427.
- [42] Niederwieser D, Grassegger A, Aubock J, Herold M, Nachbaur D, Rosenmayr A, Gachter A, Nussbaumer W, Gaggl S, Ritter M, et al. Correlation of minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes with graft-versus-host disease status and analyses of tissue distribution of their target antigens. *Blood.* 1993;81(8):2200-8.
- [43] Ozawa T. Ryanodine-sensitive Ca^{2+} release mechanism in non-excitabile cells. *Int J Mol Med.* 2001;7(1):21-5.
- [44] Pessah IN & Zimanyi I. Characterization of multiple $[\text{3h}]$ ryanodine binding sites on the Ca^{2+} release channel of sarcoplasmic reticulum from skeletal

-
- and cardiac muscle: Evidence for a sequential mechanism in ryanodine action. *Mol Pharmacol.* 1991;39: 679–689.
- [45] Pessah IN, Stambuk RA, Casida JE. Ca^{2+} -activated ryanodine binding: mechanisms of sensitivity and intensity modulation by Mg^{2+} , caffeine, and adenine nucleotides. *Mol Pharmacol.* 1987;31(3):232-8.
- [46] Pinsky DJ, Cai B, Yang X, Rodriguez C, Sciacca RR, Cannon PJ. The lethal effects of cytokine induced NO on cardiac myocytes are blocked by nitric oxide synthase antagonism or transforming growth factor beta. *J Clin Invest.* 1995;95(2):677-85.
- [47] Premack BA & Gardner P. Signal transduction by T-cell receptors: mobilization of Ca and regulation of Ca-dependent effector molecules. *Am J Physiol.* 1992;263:C1119-40.
- [48] Pulkki KJ. Cytokines and cardiomyocyte death. *Ann Med.* 1997;29:339-343.
- [49] Rasmussen H & Rasmussen JE. Calcium as intracellular messenger: from simplicity to complexity. *Curr Top Cell Regul.* 1990;31:1-109.
- [50] Ritter M, Menon S, Zhao L, Xu S, Shelby J & Barry WH. Functional importance and caffeine sensitivity of ryanodine receptors in primary lymphocytes. *Int Immunopharmacology.* 2001;1:339-47.
- [51] Robaye B, Mosselmans R, Fiers W, Dumont JE, Galand P. Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol.* 1991;138(2):447-53.
- [52] Roig E, Orus J, Pare C, Azqueta M, Filella X, Perez-Villa F, Heras M & Sanz G. Serum interleukin-6 in congestive heart failure secondary to idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 1998;82:688–90.
- [53] Sei Y, Gallagher KL, Daly JW. Multiple effects of caffeine on Ca^{2+} release and influx in human B lymphocytes. *Cell Calcium.* 2001;29(3):149-160.
- [54] Sloan-Lancaster J, Allen PM. Altered peptide ligand-induced partial T cell activation: molecular mechanisms and role in T cell biology. *Ann Rev Immunol.* 1996; 14: 1-27.

-
- [55] Stein B, Frank P, Schmitz W, Scholz H, Thoenes M. Endotoxin and cytokines induce direct cardiodepressive effects in mammalian cardiomyocytes via induction of nitric oxide synthase. *J Mol Cell Cardiol.* 1998;28(8):1631-9.
- [56] Stobo JD. Phytohemagglutinin and concanavalin A: probes for murine T cell activation and differentiation. *Transplant Rev.* 1972;11:60-86.
- [57] Sun X, Delbridge LM, Dusting GJ. Cardiodepressant effects of interferon-gamma and endotoxin reversed by inhibition of NO synthase 2 in rat myocardium *J Mol Cell Cardiol.* 1998 (5):989-97.
- [58] Sutko JL & Airey JA. Ryanodine receptor Ca^{2+} release channels: does diversity in form equal diversity in function? *Physiol Rev.* 1996;76, 1027-1071.
- [59] Sutko JL, Airey JA, Welch W & Ruest L. The pharmacology of ryanodine and related compounds. *Pharmacol Rev.* 1997;1:54-98.
- [60] Takeshima H, Ikemoto T, Nishii M, Nishiyama N, Shimuta M, Sugitani Y, Kuno J, Saito I, Saito H, Endo M, Iino M & Noda T. Generation and Characterization of Mutant Mice Lacking Ryanodine Receptor Type 3. *J Biol Chem.* 1996;271:33(16):19649-52.
- [61] Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol.* 1996;27:1201-6.
- [62] Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Bies RD, Lebovitz R & Mann DL. Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium. *Circulation.* 1995;92:1487-93.
- [63] Torre-Amione, G, Kapadia, S, Lee, J, Durand, JB, Bies, RD, Young, JB, & Mann, DL: Tumor necrosis factor- α and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation.* 1996;93:704-711.
- [64] Travers P, Janeway CA, , Walport M, Shlomchik M. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* (5th edition). Garland Pub. ISBN:0815320442

- [65] Wagner JA, Weisman HF, Levine JH, Snowman AM & Snyder SH. Differential effects of amiodarone and desethylamiodarone on calcium antagonist receptors. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1990;15:501–507.
- [66] Weiss A & Imboden JB. Cell surface molecules and early events involved in human T lymphocyte activation. *Adv Immunol.* 1987;41:1-38.
- [67] Wiederrecht G, Lam E, Hung S, Martin M, Sigal N (1993) The mechanism of action of FK-506 and cyclosporin A. *Ann N Y Acad Sci.* 30;696:9-19.
- [68] Yokoyama T, Vaca L, Rossen RD, Durante W, Hazarika P & Mann DL. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor- α in the mammalian heart. *J Clin Invest.* 1993;92:2303-2312.
- [69] Zhang J, Yu ZX, Hilbert SL, Yamaguchi M, Chadwick DP, Herman EH, Ferrans VJ Cardiotoxicity of human recombinant interleukin-2 in rats. A morphological study. *Circulation.* 1993;87(4):1340-53.

7 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
al.	alii
BSA	bovine serum albumine
Ca ²⁺	Calcium ²⁺
cAMP	cyclic Adenosine-Monophosphate
CaM-Kinase	Calmodulin-Kinase
cADPR	cyclic Adenosine Diphosphate Ribose
CD	cluster of differentiation
CHI	Chronische Herzinsuffizienz
CICR	Ca ²⁺ induced Ca ²⁺ release
ConA	Concanavalin A
CsA	Cyclosporin A
DAG	Diacylglycerol
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	fluoreszenz activated cell sortine
FCS	fetal calf serum
FSC	forward sorting scatter
h	Stunde
HRP	horse-radish-peroxydase
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
IL-2R	IL-2 – Rezeptor
IP3	Inositol ₃ -Phosphat
IP3R	Inositol ₃ -Phosphat – Rezeptor
LPS	Lipopolysacharid
Lsg.	Lösung
M	Mol

Mol	Molar
mM	Millimol
μ	Micro
μM	Micromol
MHC (-I;-II)	major histocompatibility complex
NFAT	nuclear factor of activated t-cells
NFκB	nuclear factor kappa B
NK	Natürliche Killerzellen
NM	Nanomol
Palmitoyl-CoA	Palmitoyl-Coenzym A
PBS	Phosphate buffered saline
PHA	Phytohämagglutinin
PIP2	Phosphatidylinositolbisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
pM	Picomol
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetat
rpm	rotations per minute
RyR	Ryanodin-Rezeptor
SSC	Sideward sorting scatter
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell – Rezeptor
TLR (-2;-4)	Toll-Like-Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
VCAM	vascular cell adhesion molecule
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Im folgenden genannt sind meine akademischen Lehrer während des Studiums der Humanmedizin, welchen ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen möchte.

Arnold	Hellinger	Moll
Barth	Hesse	Müller
Basler	Hofmann	Mutters
Baum	Jaspersen	Oertel
Christiansen	Jungclas	Remschmidt
Czubayko	Kern	Renz
Daut	Klenk	Röthlin
Eilers	Krieg	Schäfer
Feuser	Kroll	Schmidt
Geus	Lammel	Steiniger
Gotzen	Lang	Sundermeyer
Griss	Lippert	Weihe
Gudermann	Löffler	Werner
Happle	Maisch	Wulf

9 Danksagung

Bis zu der erfolgreichen Veröffentlichung dieser Arbeit war es ein weiter Weg, auf dem mich viele Menschen unterstützt und begleitet haben. Ihnen allen gilt mein aufrichtiger Dank.

Insbesondere möchte ich meinem Betreuer Dr. Michael Ritter und meinem Doktorvater Professor Dr. Bernhard Maisch danken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. An dieser Stelle sollen die Worte genügen, dass ich mir keine bessere Betreuung hätte wünschen können.

Das zweite Standbein dieser Arbeit sind meine lieben Eltern, die immer an mich geglaubt haben. Und auch wenn sie dies nie als dankenswerte Einstellung empfunden haben, möchte ich sie hier nennen, weil niemand diesen Dank mehr verdient hat als sie.

10 Ehrenwörtliche Erklärung

Nach § 16 der Promotionsordnung des Fachbereichs Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg (Lahn).

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Koffein inhibiert die lymphozytäre Zytokinsynthese“ im Medizinischen Zentrum für Innere Medizin, Abteilung Kardiologie unter Leitung von Prof. Dr. Bernhard Maisch mit Unterstützung von Dr. Michael Ritter ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischem Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile dieser Arbeit wurden bei dem wissenschaftlichen Magazin „Cytokine“ eingereicht und im Dezember 2004 zur Publikation akzeptiert.

Marburg, 30.03.2005

11 Curriculum Vitae von Katja Hohenberger

Curriculum Vitae	
geboren	am 11.02.1978 in Berlin
Schulbildung	1984-1997
Abitur	13.06.1997
Hochschulbildung	10/1997-11/2004
Ärztliche Prüfung bestanden am	02.11.2004
Approbation seit	09.11.2004
berufstätig als Assistenzärztin in der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsklinik Jena seit	01.01.2005
Extracurriculare Tätigkeiten	langjähriges Mitglied der Jungen Marburger Philharmonie Aktivität im Leo-Club Marburg

