

Aus der Dermatologischen Klinik mit Poliklinik
der Universität Hamburg
Direktorin: Prof. Dr. Ingrid Moll

**Einfluss von Cyclosporin A auf die Adhäsion neutrophiler Granulozyten an
humane Epidermis und ihre CD11b-Expression**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Daniel Vornhusen
aus Vechta

Hamburg, 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: 23. 06. 2006

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. P. von den Driesch

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. K. Neuber

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof Dr. F. Nolte

Meiner Frau Stephanie
und meinen Kindern Noah und Leni,
meinen Eltern Werner und Dorothea,
meinen Geschwistern Tobias und Judith
gewidmet.

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>Seite</u>
FRAGESTELLUNG	1
1. EINLEITUNG	2
2. STAND DES WISSENS	3
2.1 Cyclosporin A	3
2.1.1 Geschichte und physikalisch-chemische Eigenschaften	3
2.1.2 Wirkung	3
2.1.3 Pharmakokinetik	6
2.1.3.1 Aufnahme und Bioverfügbarkeit	6
2.1.3.2 Verteilung	7
2.1.3.3 Metabolismus und Elimination	7
2.1.3.4 Unerwünschte Wirkungen und Toxizität	8
2.1.4 Therapeutische Anwendung	9
2.2 Neutrophile und Zelladhäsion	13
2.2.1 Neutrophile Granulozyten	13
2.2.1.1 Definition	13
2.2.1.2 Aufbau	13
2.2.1.3 Aufgabe und Funktion	14
2.2.2 Adhäsionsmoleküle	15
2.2.2.1 Integrine	15
2.2.2.2 Superimmunglobuline	19
2.2.3 Keratinozyten	20
2.2.4 Zytokine	20
2.2.4.1 TNF- α	21
2.2.4.2 IFN- γ	22
2.3 Abschließende Zieldefinition	23
3. MATERIAL UND METHODEN	24
3.1 Präparation der Epidermis	24
3.1.1 Biopsien	24
3.1.2 ICAM-1-Färbung	24
3.2 Isolierung der Granulozyten	25
3.3 Adhäsionsassay	26
3.3.1 Herstellen der Ansätze und Aktivierung der Granulozyten	26

3.3.2 Färbung	26
3.3.3 Auszählung und Auswertung	27
3.4 FACS-Analyse: CD11b- und CD15-Expression unter Verwendung von Cyclosporin A	27
4. ERGEBNISSE	28
4.1 Einfluss von Cyclosporin A auf die Adhäsion neutrophiler Granulozyten an humane Epidermiszellen	28
4.2 Einfluss von Cyclosporin A auf die Expression von CD11b und CD15	30
4.3 Einfluss von TNF- α auf die CD11b-Expression	32
4.4 Einfluss von Cyclosporin A und TNF- α auf die CD11b-Expression	33
4.5 Rohdaten	35
5. DISKUSSION	36
5.1 Methoden	36
5.1.1 Adhäsionsassay	36
5.1.2 Granulozytenisolierung	37
5.1.3 Therapeutische und experimentelle Cyclosporin A- Konzentration und Inkubationszeiten	38
5.2 Mögliche Wirkmechanismen von Cyclosporin A	38
5.2.1 Allgemeiner Teil	38
5.2.2 Möglicher Einfluss auf die Qualität der Adhäsion	39
6. ZUSAMMENFASSUNG	43
7. ABKÜRZUNGEN	44
8. LITERATURVERZEICHNIS	46
9. DANKSAGUNG	54
10. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	55
11. LEBENSLAUF	56

FRAGESTELLUNG

Es existieren eine Reihe von nicht infektiösen Hauterkrankungen, die durch Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in Dermis und Epidermis gekennzeichnet sind. Die Pathomechanismen dieser Erkrankungen sind unbekannt und müssen noch aufgeklärt werden. In früheren Untersuchungen konnte man zeigen, dass ein zentraler Bindungsfaktor der Neutrophilen das Adhäsionsmolekül CD11b/CD18 ist, mit dem sie an Epidermiszellen binden. So können sich in der erkrankten Haut sterile Mikroabszesse bilden.

Aus dem klinischen Verlauf heraus haben sich in den letzten Jahren verschiedene Behandlungsmöglichkeiten mit Cyclosporin A ergeben, deren genaue Wirkmechanismen allerdings noch unklar sind.

Um zu untersuchen, wie sich die Wirksamkeit von Cyclosporin A bei der Behandlung dieser Erkrankungen erklären lässt, bedienen wir uns eines Adhäsionsassays, um das Bindungsverhalten neutrophiler Granulozyten zu untersuchen. Es werden die in vivo-Verhältnisse imitiert und die entsprechenden Gewebe und Zellsuspensionen mit den entsprechenden bekannten Aktivatoren inkubiert. Von Interesse ist, ob sich ein linearer oder logarithmischer Zusammenhang bezüglich der eingesetzten Cyclosporin A-Konzentrationen herstellen lässt.

Im Anschluß daran wird mit einem FACS-Gerät, die Oberflächenkonzentration des Adhäsionsmoleküls CD11b auf den neutrophilen Granulozyten quantitativ bestimmt. So kann auf molekularer Ebene eine Alteration der Oberflächenkonzentration von CD11b nachgewiesen werden. Auch in diesem zweiten Versuchsteil werden die in vivo-Verhältnisse durch die bekannten Aktivatoren imitiert.

Die Frage lautet also: „Verändert Cyclosporin A die zytokinvermittelte Bindung neutrophiler Granulozyten an humane Epidermis“ und „Verändert Cyclosporin A die Oberflächenkonzentration von CD11b auf neutrophilen Granulozyten“?

1. EINLEITUNG

Ein charakteristisches Kennzeichen der so genannten neutrophilen Dermatosen ist die Immigration von neutrophilen Granulozyten in die Dermis und Epidermis.

Zu den neutrophilen Dermatosen zählen in erster Linie Erkrankungen aus der Psoriasis-Gruppe, bei denen eine Akkumulation neutrophiler Granulozyten unterhalb des Stratum corneums in Form so genannter Munro'scher Mikroabszesse gefunden werden (*Christophers, E. and Sterry, W. 1993*). Weitere Krankheitsbilder sind die akute febrile neutrophile Dermatose (Sweet-Syndrom), Immunkomplexvaskulitiden, sterile pustulöse Dermatosen und das Pyoderma gangränosum.

Als etabliertes Medikament mit bekanntem Wirkmechanismus wird Cyclosporin A nur im Bereich der Organtransplantationen eingesetzt, um Abstoßungsreaktionen zu verhindern. Bestimmte Transplantationen wurden so überhaupt erst praktikabel. Für die Erkrankungen aus anderen Bereichen der Medizin, insbesondere bei Autoimmunerkrankungen, wird Cyclosporin A versuchsweise bzw. ex juvantibus eingesetzt. Indikationen bestehen allerdings für die schwere Form der endogenen Uveitis, für die Behçet-Uveitis mit Beteiligung der Retina, für bestimmte Formen der nicht infektiösen Glomerulonephritiden und für schwere Formen der Psoriasis.

Für die Aktivierung und Anlockung der polymorphkernigen Granulozyten in die Epidermis ist die Freisetzung verschiedener Chemotaxine notwendig (*Terui, T., et al., 1995*).

In vorhergehenden Studien hat sich gezeigt, dass die Bindung von Neutrophilen an Hautschnitten, die in vitro mit Interferon- γ (IFN- γ) inkubiert worden waren, durch Zugabe von Tumor-Nekrosis-Faktor- α (TNF- α) oder Platelet-Activating-Factor (PAF) steigerbar war und durch Antikörper gegen CD11b gehemmt werden konnte (*Driesch, P. v. d., et al., 1997*).

Im Folgenden soll daher anhand eines Adhäsionsassay und von Immunfluoreszenzuntersuchungen der Einfluss von Cyclosporin A auf eine zytokinvermittelte Bindung neutrophiler Granulozyten an Keratinozyten und auf die CD11b-Expression untersucht werden.

2. STAND DES WISSENS

2.1 Cyclosporin A

2.1.1 Geschichte und physikalisch-chemische Eigenschaften

Cyclosporin A wurde erstmals 1970 als Metabolit aus den Bodenpilzen *Tolypocladium inflatum* Gams und *Cylindrocarpon lucidum* Booth gewonnen (Mahrle G. and Schulze H.-J., 1990). Der suppressive Effekt auf die humorale und zellvermittelte Immunantwort wurde 1976 von Borel JF., et al. erstmals beschrieben. Als Immunsuppressivum bei Organtransplantationen wird es seit 1978 eingesetzt. Im Laufe der Jahre erkannten auch andere Disziplinen der Medizin die Potenz von Cyclosporin A, so dass es in heutiger Zeit nicht mehr nur zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen sondern in sehr vielen verschiedenen Fachbereichen angewandt wird; das Spektrum setzt sich im Wesentlichen aus folgenden Fachrichtungen zusammen: Ophthalmologie, Dermatologie, Hämatologie, Gastroenterologie, Hepatologie, Neurologie, Nephrologie, Rheumatologie, Endokrinologie und Immunologie (Schlich, T., 2000; Schröder F., and Herzig, S., 1998; Ryffel, B., 1991; Thomsen, AW., 1989).

Cyclosporin A ist ein zyklisches Peptid mit lipophilem Charakter bestehend aus elf methylierten Aminosäuren mit einer Molekularmasse von 1202 und folgender Summenformel $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$. Es ist eine geruchlose Substanz von weißer Farbe mit einem Schmelzpunkt zwischen 148 – 151 °C. Bei einer Löslichkeit in Wasser von ungefähr 0,2 g/l (20 °C) beträgt sein pH-Wert 6,5-7. Die Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln liegt wegen der Lipophilie ungleich höher; z. B. beträgt sie in Aceton > 50 g/l (20 °C). Die Schüttdichte bewegt sich in einer Größenordnung zwischen 200 – 450 kg/m³ (Sicherheitsdatenblatt, Fa. Novartis).

2.1.2 Wirkung

Die Hauptwirkung von Cyclosporin A ist eine Hemmung der T-Zellproliferation im Rahmen der Immunantwort. Dies geschieht bei allen T-Zell-Populationen. Der größte direkte Effekt lässt sich aber bei der Untergruppe der T-Helferzellen erreichen, alle anderen Wirkungen sind auf indirekte Mechanismen zurückzuführen. Es kommt dem zufolge zu einer Hemmung der antikörper- und zellvermittelten Immunität und zu einer Unterdrückung von chronischen Entzündungszuständen. Die durch Cyclosporin A ausgelösten Hemmeffekte beziehen sich auf die Induktionsphase der Lymphozytenproliferation; sie sind weder lymphozytotoxisch

noch myelotoxisch in immunsuppressiven Dosierungen (*Faulds, D., Goa, KL., Benfield, P., 1993*).

Der wichtigste Angriffspunkt von Cyclosporin A ist der T-Helfer-Lymphozyt (T_H). Nach dessen Aktivierung durch Antigenerkennung über den T-Zellrezeptor-CD3-Komplex kommt es zur Lymphokinproduktion und zur Effektorzellaktivierung (*Faulds, D., Goa, KL., Benfield, P., 1993*). Lymphokine sind maßgeblich am Immungeschehen beteiligt. So wirken die Interleukine 2, 3, 4, 5 und 6 nach Ausschüttung durch den T-Helfer-Lymphozyten auf der einen Seite auf die B-Lymphozyten und Plasmazellen im Sinne der Ak-Produktion und -Ausschüttung, auf der anderen Seite auf die zytotoxischen bzw. Suppressor-T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen im Sinne von Reifungs- und Differenzierungssignalen, so daß insbesondere die klonale Expansion von CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten erleichtert wird. Weiterhin kommt es durch die ausgeschütteten Interleukine, besonders durch Interleukin-2, zu einer autokatalytischen Aktivierung des T-Helfer-Lymphozyten selbst (*Ryffel, B., 1991*). Außerdem verursacht Interleukin-2 eine Hochregulation des Interleukin-2-Rezeptors und eine Produktion anderer Lymphokine, wie z.B. Interferon- γ .

Cyclosporin A wirkt in der Aktivierungskaskade des T-Helfer-Lymphozyten besonders intensiv auf die Synthese von Interleukin-2 und Interferon- γ -mRNA, aber auch auf die Transkription von Interleukin-3, B-Zell-Wachstumsfaktor (Interleukin-4), Interleukin-5, B-Zell-Differenzierungsfaktor (Interleukin-6), TNF- α und hat möglicherweise auch auf den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulationsfaktor einen Einfluss. Allerdings ist dies nur möglich, wenn Cyclosporin A in der G₀- oder frühen G₁-Phase auf die Zellen einwirkt (*Faulds, D., Goa, KL., Benfield, P., 1993*).

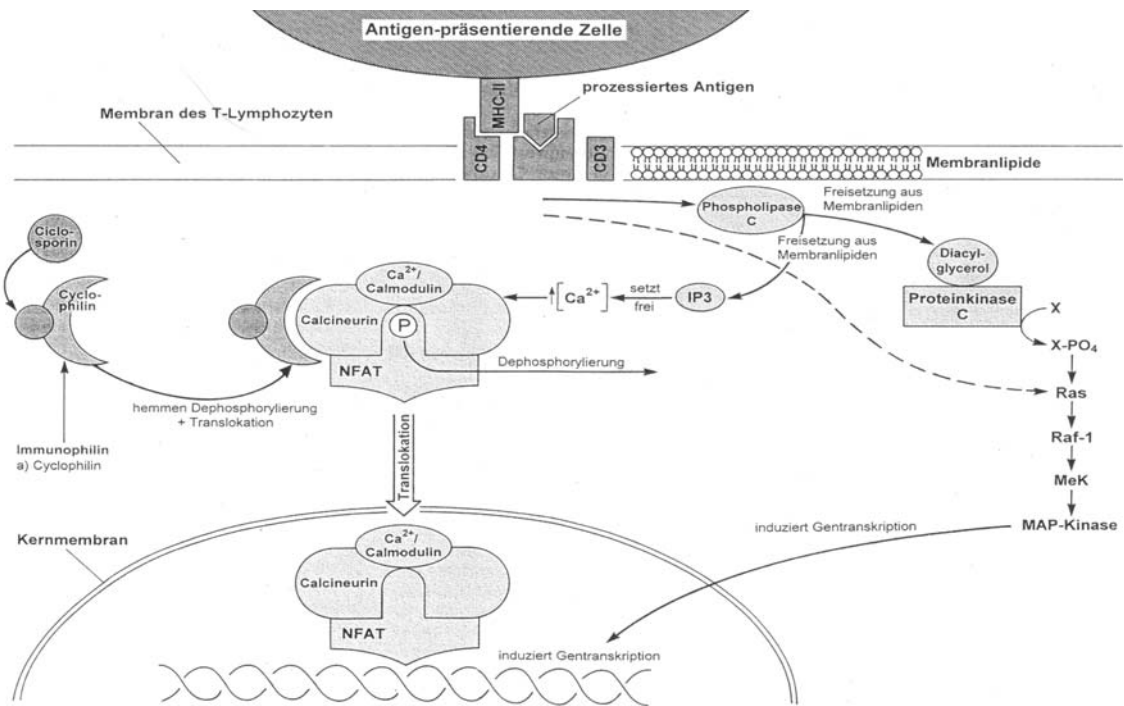
Der Anfangsschritt in der Aktivierung von T-Helfer-Lymphozyten ist die Präsentation des aufbereiteten Antigens durch beispielsweise Makrophagen. Dieses Antigen reagiert mit dem spezifischen T-Zell-Rezeptor zusammen mit dem CD3- und CD4-Glykoprotein. Durch die Rezeptorstimulation kommt es zur Aktivierung einer Phospholipase C, die aus Membranphospholipiden Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) freisetzt. IP₃ führt zur Freisetzung von Calciumionen (Ca²⁺) aus intrazellulären Speichern, die wiederum mit Calmodulin zusammen die Phosphatase Calcineurin aktivieren. Das aktivierte Calcineurin bindet das im Zytosol vorhandene Protein NFAT (nuclear factor of activated thymocytes) und bewirkt dessen Dephosphorylierung. In diesem Zustand kann der Komplex aus NFAT und Calcineurin in den Zellkern gelangen. Dort lagert sich der Komplex an die DNA an und induziert die Transkription der mRNA für Interleukin-2 und anderer Genprodukte

(s.o.). Da die erneute Phosphorylierung des NFAT durch Calcineurin gehemmt wird, endet dieser Vorgang erst, wenn durch gegenregulatorische Vorgänge der zytosolische Ca^{2+} -Spiegel gesunken ist, und dadurch der Calcineurin/NFAT-Komplex wieder in das Zytosol zurück wandert. Das zweite Produkt der Phospholipase C-Aktivität, das DAG, führt zur Aktivierung der Proteinkinase C, die ihrerseits eine GTPase (Ras) aktiviert. Das Ras-Protein interagiert mit Raf-1, einer Serin/Threonin-Kinase, wodurch eine Kinasen-Kaskade reguliert wird. Am Ende dieser Kaskade kommt es wie bei IP_3 zur Induktion der Transkription oben genannter Genprodukte (*Schröder F., and Herzig, S., 1998*).

Der zelluläre Angriffsort für Cyclosporin A befindet sich innerhalb des T-Helfer-Lymphozyten im Zytosol. Es ist ein ubiquitäres Protein mit einem Molekulargewicht von 21 kD (*Ryffel, B., 1991*) aus der Klasse der Immunophilinen, namens Cyclophilin. Dieses bildet mit Cyclosporin A einen Komplex, der sich an Calcineurin anlagert und dessen Enzymaktivität hemmt. Durch die Hemmung kommt es nicht zu der Dephosphorylierung des NFAT und dem zufolge auch nicht zu einer Translokation des NFAT/Calcineurin-Komplexes in den Zellkern. Somit bleibt die Induktion der Transkription der oben genannten Genprodukte aus und sämtliche Folgefunktionen des aktivierten T-Helfer-Lymphozyten können nicht ausgeführt werden (*Schröder F., and Herzig, S., 1998*).

Ein weiterer Wirkmechanismus, der von *Ryffel, B., 1991* diskutiert wird, ist die Beeinflussung der Enzymaktivität von Cyclophilin. Es besteht nämlich eine Identität zwischen dem Enzym Peptidyl-Prolyl-Cis-Trans-Isomerase und Cyclophilin, das somit für die Cis-Trans-Isomerisierung von Prolin-Peptid-Bindungen wichtig ist, und die korrekte Faltung von Proteinen vermittelt. Durch die nachgewiesene Enzymhemmung von Cyclosporin A, wird angenommen, dass Cyclosporin A durch Bindung an Cyclophilin die korrekte Faltung regulatorischer Proteine hemmt (*Ryffel, B., 1991*).

Außer den beiden oben genannten Wirkmechanismen gibt es noch einen dritten Angriffspunkt, der über ein Membran-Glykoprotein (gp170) vermittelt wird. Dieses Glykoprotein spielt in der so genannten Multi-Drug-Resistance von Tumorzellen eine wichtige Rolle, und wurde als Cyclosporin A-Rezeptorprotein identifiziert. Die exakte Bedeutung dieser Beobachtung, gerade auch für die Toxizität von Cyclosporin A, ist noch unklar und bedarf genauerer Klärung (*Ryffel, B., 1991*).



aus Dtsch. med. Wschr. 123 (1998), S. 121

2.1.3 Pharmakokinetik

2.1.3.1 Aufnahme und Bioverfügbarkeit

Die Zeitspanne bis eine maximale Blutkonzentration nach oraler Verabreichung von Cyclosporin A erreicht ist, beträgt zwischen einer und acht Stunden. Es kann abhängig von Nahrungsaufnahme während der Resorption bzw. durch den enterohepatischen Kreislauf zu einem zweiten Peak kommen, der ungefähr fünf bis sechs Stunden nach dem ersten auftritt und diesen oftmals übertrifft. Der Resorptionsort für Cyclosporin A ist in erster Linie der Dünndarm, der durch seine Länge den ausschlaggebenden Faktor für die Resorption von Cyclosporin A darstellt. Sie erfolgt nach dem Gesetz der 0. Ordnung, das bedeutet dosisunabhängig, so dass die Darmpassagezeit bzw. Darmlänge einen Hauptfaktor für die Aufnahme darstellt (Brynskov, J., et al., 1992).

Die Bioverfügbarkeit nach oraler Aufnahme beträgt durchschnittlich 30 %, allerdings ist sie mit einer Streuung zwischen 5 - 70 % sehr variabel. Die interindividuellen Unterschiede sind durch die Magenentleerungszeit, den Gallensäuregehalt, die Peristaltik des Gastrointestinaltraktes und durch Cyclosporin abbauende Enzyme in der Magen-Darm-Schleimhaut bedingt (Faulds, D., Goa, KL., Benfield, P., 1993).

2.1.3.2 Verteilung

Nach der Aufnahme durch den Dünndarm wird Cyclosporin A im Blut verteilt, so dass 60 – 70% von den zellulären Blutbestandteilen aufgenommen werden und der Rest sich auf das Blutplasma verteilt. Die zellulären Hauptträger sind die Erythrozyten, auf die sich 41 – 58% des aufgenommenen Cyclosporins verteilen; im Plasma sind es die HDL-Lipoproteine, die mit 18 – 22% den größten Teil des Cyclosporins aufnehmen. 1 – 3,5% liegen in ungebundener Form vor. Die Aufnahme durch Erythrozyten ist temperaturabhängig und steigt an, wenn die Temperatur abfällt, bei den Lipoproteinen verhält es sich gleichermaßen. Der Großteil einer Cyclosporin A-Dosis wird außerhalb des Blutes im Gewebe verteilt. Das scheinbare Verteilungsvolumen beträgt ungefähr 4 – 8 l/kg in Abhängigkeit vom Körpergewicht. Die Gewebekonzentrationen in den verschiedenen Organen scheinen mit dem Gehalt an Cyclophilin und dem Lipidgehalt zu korrelieren. Dem entsprechend wurden in Organen von Toten bis zu zehnfach höhere Gewebe- als Blutkonzentrationen gefunden. Gerade leukozytenreiche Gewebe (Thymus, Milz, Lymphknoten und Knochenmark) und fettreiche Gewebe (Leber, Pankreas, Niere, Nebennieren, Lunge, Haut, Schild- und Speicheldrüsen) reichern Cyclosporin in großen Mengen an, da sie reich an Cyclophilin sind, wie dies auch für Erythrozyten zutrifft. In Muskelgewebe und Gehirn bleibt die Konzentration unterhalb der Blutkonzentration, was bedeutet, dass die Blut-Hirn-Schranke nicht von Cyclosporin A überwunden wird. Anders verhält es sich aber mit der Blut-Plazenta-Schranke. So kann Cyclosporin A im Fruchtwasser und im fetalen Blut nachgewiesen werden; außerdem tritt es in die Muttermilch über (*Flechner, SM., et al., 1985; Venkataramanan R., et al., 1988*). Die Blutkonzentration von Cyclosporin A liegt bei Applikation von 14mg/kg/d für sieben Tage zwischen 240-1220 ng/ml. Die Hautgewebekonzentration liegt bei gleicher Medikation zwischen 1370-2860 ng/ml, was bedeutet, dass Cyclosporin A in der Haut angereichert wird (*Mahrle, G., Schulze, H.-J., 1990*)

2.1.3.3 Metabolismus und Elimination

Die Verstoffwechslung und der Abbau von Cyclosporin A wird von dem Cytochrom-P₄₅₀-IIIa-Enzym-System in der Leber bewerkstelligt. Im Wesentlichen handelt es sich hierbei um Mono- und Dihydroxylierung und N-Demethylierung (*Fahr, A., 1993*) unter Beibehaltung der zyklischen Struktur des Moleküls. Gerade nach oraler Aufnahme wird eine präsystemische Elimination durch die Magen-Darm-Schleimhaut beobachtet und in vitro konnte der Abbau in der Niere und in Kolonschleimhaut beobachtet werden. Allerdings wird der gastrointestinale Abbau

durch die insgesamt sieben N-methylierten Aminosäuren des Moleküls gehemmt. Beim Abbau entstehen über 30 Metabolite, die eine sehr niedrige Toxizität aufweisen, und von denen die aktivsten nur eine 10-20 %-ige immunsuppressive Potenz verglichen mit Cyclosporin A aufweisen. Es kommt aber zu synergistischen und additiven Effekten in der Wirkung der Metabolite untereinander und zusammen mit Cyclosporin A.

Die Elimination von Cyclosporin A aus dem Körper schwankt um Werte zwischen 0,38 bis 3 L/h/kg. Hohe Werte lassen sich eher bei Kindern finden, was auf altersbezogene Änderungen der Lipoproteine zurückgeführt werden könnte. Niedrige Werte finden sich bei Personen mit verminderten Serum-LDL-Werten, bei Personen mit Leberfunktionsstörungen und bei älteren Personen. Die Entfernung von Cyclosporin A aus dem Körper, bzw. Blut erfolgt nach einer linearen Kinetik mit einer scheinbaren Halbwertszeit von ca. 19 Stunden. Scheinbar deswegen, weil Cyclosporin A sich sehr stark im Gewebe anreichert; die „wahre“ Halbwertszeit dürfte bei weit über 24 Stunden anzusiedeln sein. Über 90 % des aufgenommenen Cyclosporin A werden über die Galle ausgeschieden. Ein kleiner Bruchteil dieser Menge, nämlich ein Prozent, wird als unverändertes Molekül eliminiert. Der Rest von etwa sechs Prozent wird mit dem Urin ausgeschieden, wobei im Urin nur ca. 0,1 % in Form der ursprünglichen Substanz vorkommen (*Faulds, D., Goa, KL., Benfield, P., 1993*).

2.1.3.4 Unerwünschte Wirkungen und Toxizität

Vordergründig bei den unerwünschten Wirkungen von Cyclosporin A ist die Nierenschädigung. Es kommt vorwiegend zu einem Einfluss auf den proximalen Tubulus und das Vas afferens, wobei es schon bei niedrigen Dosierungen zu funktionellen Schäden kommen kann; strukturelle Veränderungen werden erst bei höheren Dosierungen beobachtet (*Faulds, D., Goa, KL., Benfield, P., 1993*). Sie umfassen Veränderungen wie interstitielle Fibrose, glomeruläre Sklerose und tubuläre Atrophie (*Kauvar, AB., and Stiller MJ., 1994*). Es wird vermutet, dass Cyclosporin A die Ausschüttung von Thromboxan A₂ (Vasokonstriktor) verstärkt und gleichzeitig die Bildung von Prostazyklin (Vasodilatator) in Endothelzellen vermindert, so dass es in der Niere zu einer Vasokonstriktion kommt. Daraus resultiert ein Abfall des renalen Blutflusses und der glomerulären Filtration. Eine zweite Möglichkeit ist eine Verminderung der Serin-Protease-Aktivität, die zu einem Abfall der

Ausschüttung von Kininen mit vasodilatatorischen Eigenschaften führt (Faulds, D., Goa, KL., Benfield, P., 1993). Durch seinen Einfluss auf Angiotensin-II- und Vasopressin-vermittelte Vorgänge könnte Cyclosporin A überschießende Reaktionen in glatten Muskelzellen von Arteriolen und Mesangiumzellen hervorrufen, die sich bezogen auf die Mesangiumzellen in einer Abnahme der Ultrafiltrationsoberfläche und in einer verminderten glomerulären Filtration bemerkbar machen.

Weitere häufige unerwünschte Wirkungen bezogen auf das Nervensystem sind Tremor, Dysästhesien, Krämpfe, Psychosen und Koma. Auch verhältnismäßig häufig sind Konzentrationsanstieg von Bilirubin und Transaminasen, Hypertrichose, Gingivitis hypertrophicans, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe sowie arterielle Hypertonie. Gelegentlich treten Hyperglykämien auf (Schroeder, F., Herzig, S., 1998), und auch der Fettstoffwechsel kann dahingehend betroffen sein, dass es zu einem Anstieg des Gesamtcholesterins, des LDL-Cholesterins und der Triglyzeride kommt (Kauvar, AB., and Stiller MJ., 1994). Wie bei allen anderen Immunsuppressiva muss auch bei Cyclosporin A mit einer erhöhten Infektanfälligkeit gerechnet werden, außerdem sind vereinzelt Malignome und lymphoproliferative Erkrankungen beobachtet worden (Schroeder, F., Herzig, S., 1998).

Zumindest die unerwünschten Wirkungen auf die Niere, den Blutdruck, den Gastrointestinaltrakt und die Hypertrichose lassen sich durch Dosisreduktion bzw. Therapieunterbrechung zurückführen (Kauvar, AB., and Stiller MJ., 1994). Eine starke orale Überdosierung lässt sich am Besten durch Magenspülung oder Gabe von Kohle behandeln. Cyclosporin A lässt sich weder durch Dialyse noch durch Austausch des Blutes aus dem menschlichen Körper entfernen (Faulds, D., Goa, KL., Benfield, P., 1993).

2.1.4 Therapeutische Anwendung

Die primäre Hauptindikation für Cyclosporin A stellen Organtransplantationen dar. Im Rahmen von allogenen Herz-, Nieren- und Lebertransplantationen konnte Cyclosporin A die Überlebensraten und die Lebensqualität deutlich steigern. Die Durchführbarkeit von Lungen-, Dünndarm- und Pankreastransplantationen wurde durch Cyclosporin A überhaupt erst möglich. Ein weiteres Anwendungsgebiet ist der Bereich der Autoimmunkrankheiten und die Prophylaxe von Graft-versus-Host-Reaktionen nach Knochenmarkstransplantationen (Schroeder, F., Herzig, S., 1998).

Im Rahmen dermatologischer Erkrankungen wird Cyclosporin A bei der Psoriasis, beim Behçet-Syndrom, bei dem Pyoderma gangränosum, bei der Epidermolysis bullosa acquisita, beim Lichen planus, beim atopischen Ekzem, bei

der Alopecia areata, bei der Alopecia androgenetica, bei Photodermatosen, beim bullösen Pemphigoid/Pemphigus vulgaris, bei der Dermatomyositis/Polymyositis, beim Lupus erythematoses und bei der Sklerodermie (*Kauvar, AB., and Stiller MJ., 1994*).

Für die Psoriasisbehandlung gilt, dass mit einer Dosierung von 2,5-5 mg/kg/d eine signifikante Besserung der Psoriasis innerhalb von vier bis acht Wochen eintritt. Allerdings sind die Effekte dosisabhängig, so dass man mit höheren Dosierungen schneller zum Erfolg kommt, aber auch schneller mit den unerwünschten Wirkungen konfrontiert wird. Nach dem Absetzen der Medikation bei Therapieerfolg, kommt es innerhalb von Wochen bzw. Monaten zum Wiederauftreten der Krankheitszeichen; auch ernste Rückfälle können entstehen. Über eine Tachyphylaxie oder Reboundphänomene bei Cyclosporin A ist allerdings nichts bekannt (*Kauvar, AB., and Stiller MJ., 1994*).

Das Behçet-Syndrom wird äußerst effektiv mit einer Dosierung von 3-7 mg/kg/d behandelt. Während akuter Exazerbationen vermag Cyclosporin A die Entzündung im Auge zu unterdrücken und den Visus zu verbessern, und auch vaginale Geschwüre, Hautläsionen und Arthritiden zeigen Besserung (*Kauvar, AB., and Stiller MJ., 1994*).

Bei erfolgloser Behandlung des Pyoderma gangränosum mit systemischen Kortikosteroiden, Azathioprin oder Cyclophosphamid kann Cyclosporin A in einer Dosierung von 3-7 mg/kg/d innerhalb von Wochen die Symptome bessern und innerhalb von 1-3 Monaten zu einer Heilung führen (*Kauvar, AB., and Stiller MJ., 1994*).

Bei einem Nichtansprechen der Epidermolysis bullosa acquisita auf Kortikosteroide und Immunsuppressiva kann durch Cyclosporin A die Blasenentstehung reduziert werden. Durch die angewandte Dosis von 3-7 mg/kg/d lässt sich die Besserung der klinischen Symptomatik auch nach Absetzen für weitere zwei Monate beobachten (*Kauvar, AB., and Stiller MJ., 1994*).

Auch für den Lichen planus lässt sich mit Cyclosporin A eine Verbesserung der Symptome erzielen. Für eine komplette Remission des generalisierten Lichen planus wurde zwei Patienten eine Dosis von 6mg/kg/d für acht Wochen verabreicht; sie waren selbst nach zehn Monaten noch krankheitsfrei. Histologisch wurde eine verminderte ICAM-1-Expression auf den Keratinozyten und eine Reduktion der T-Zell-Infiltrate nachgewiesen. Aber auch bei Patienten mit kutanem Lichen planus oder erosiven oralen Formen konnten Besserungen bzw. Remissionen beobachtet werden; es kam allerdings auch zu Rückfällen nach Therapieende. Diese Patienten

bekamen Cyclosporin A als Mundspüllösung oder als topische Anwendung dargereicht. Dabei bewegten sich die Blutkonzentrationen in einem Bereich von 50-150 ng/ml, und es wurden keine unerwünschten Wirkungen festgestellt (*Kauvar, AB., and Stiller MJ., 1994*).

Behandelt man das atopische Ekzem mit einer Cyclosporin A-Dosis von 2-6 mg/kg/d, lässt sich bei Patienten, die auf die konventionelle Therapie (inklusive systemische Kortikosteroide) nicht ansprechen, eine dramatische Verbesserung erreichen. Vermutlich kommt es durch Cyclosporin A zu Hemmung der T-Zell-Aktivierung und somit zu einer verminderten IgE-Bildung (*Kauvar, AB., and Stiller MJ., 1994*).

Für die Behandlung der Alopecia areata macht man sich den Nebeneffekt der Hypertrichose zu Nutze. Gute Resultate erzielt man mit einer Dosis von 6 mg/kg/d. Bei Patienten, die diese Dosierung erhalten haben, kam es zu Haarwachstumssteigerung von bis zu 60 %. Wurde die Therapie abgesetzt, kam es innerhalb von drei Monaten zu einem wiederholten Ausfall der Haare. Der Wirkmechanismus wird mit dem Verlust der HLA-DR-Expression von follikulären Keratinozyten und einer verminderten perifollikulären T-Lymphozyteninfiltration Verbindung gebracht (*Kauvar, AB., and Stiller MJ., 1994*).

Bei der Alopecia androgenetica wird über zwei Patienten berichtet, die aufgrund einer Psoriasis mit Cyclosporin A behandelt werden, und darauf mit einem Neuwachstum ihrer Haare reagieren. Außerdem gibt es Studien, die mit topischem 1-2%-igem Cyclosporin experimentieren und ermutigende Ergebnisse hervorbringen. Es ist allerdings noch keine abschließende Bewertung möglich (*Kauvar, AB., and Stiller MJ., 1994*).

Bei Erkrankungen aus dem Bereich der Photodermatosen kann Cyclosporin A in einer Dosierung von 2,5-6 mg/kg/d Remissionen erzielen, allerdings kam es bei allen Patienten zu Rückfällen nachdem die Medikation abgesetzt wurde (*Kauvar, AB., and Stiller MJ., 1994*).

Die Monotherapie von bullösem Pemphigoid/Pemphigus vulgaris mit Cyclosporin A in einer Dosierung von 5-10 mg/kg/d hat nur begrenzte Effektivität. Allerdings lässt sich in Kombination mit oralen Kortikosteroiden eine Verbesserung der Hautläsionen erreichen. Rückfälle treten auf, wenn Cyclosporin A abgesetzt wird (*Kauvar, AB., and Stiller MJ., 1994*).

Bei der Behandlung der Dermatomyositis/Polymyositis konnte bei Patienten die auf die Therapie (oral 5-10 mg/kg/d bzw. i.v. 7 mg/kg/d) ansprechen, sowohl eine Verbesserung der Muskelkraft als auch eine Verminderung des Serumkreatinins

bzw. der Muskelenzyme innerhalb von ein bis zwei Wochen festgestellt werden. Rückfälle traten auf, als die Cyclosporin A-Therapie unterbrochen wurde (*Kauvar, AB., and Stiller MJ., 1994*).

Bei der Monotherapie des Lupus erythematodes mit 8-10 mg/kg/d wurden keine guten Ergebnisse produziert, und die Behandlung musste wegen unerwünschter Wirkungen (inkl. angioneurotischem Ödem, Nierentoxizität) abgebrochen werden. Als steroidsparendes Medikament und bei der steroidresistenten Form gibt es ermutigende Ergebnisse mit Dosierungen um die 2,5-5 mg/kg/d (*Kauvar, AB., and Stiller MJ., 1994*).

Bei der Behandlung der Sklerodermie kam es bei zwei Patienten, die mit 2,5-5 mg/kg/d behandelt wurden, zum Nierenversagen. Angesichts der unerwünschten Wirkungen sollte Cyclosporin A mit Vorsicht angewandt werden. Ansonsten zeigt eine Dosis von 4-10 mg/kg/d eine Verbesserung der Symptome im Bereich der kutanen Form, des Raynaud Phänomens und der ösophagealen Beweglichkeit (*Kauvar, AB., and Stiller MJ., 1994*).

Als zugelassenes Medikament wird Cyclosporin A in Deutschland nur im Bereich der Organtransplantationen eingesetzt. Hier wird es mit großem Erfolg verwendet, um Abstoßungsreaktionen zu verhindern. So ist die Erfolgsquote bei Nieren-, aber auch bei Herz- und Lebertransplantationen deutlich gestiegen, andere Transplantationen wurden überhaupt erst praktikabel. Für die Erkrankungen aus anderen Bereichen der Medizin, insbesondere bei Autoimmunerkrankungen, wird Cyclosporin A versuchsweise eingesetzt. Indikationen bestehen allerdings für die schwere Form der endogenen Uveitis, für die Behçet-Uveitis mit Beteiligung der Retina, für bestimmte Formen der nicht infektiösen Glomerulonephritiden und für schwere Formen der Psoriasis.

2.2 Neutrophile und Zelladhäsion

2.2.1 Neutrophile Granulozyten

2.2.1.1 Definition

Der Name leitet sich von der morphologisch orientierten Namensgebung aus dem Zeitalter des Lichtmikroskops ab. Die azurophilen und spezifischen Einschlusskörper (Granula) erscheinen im Lichtmikroskop als dunkle intrazelluläre Körnchen. Neutrophile Granulozyten bilden mit ca. 60-70% den größten Anteil der weißen Blutkörperchen. Funktionell bilden sie die erste unspezifische zelluläre Abwehrfront des Körpers gegen Krankheitserreger im Sinne einer heftigen Phagozytoseaktivität, weswegen ihnen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Infektionen, besonders von Bakterien und Pilzen, zukommt. Gelingt es Erregern diese unspezifische Abwehrfront zu durchbrechen, kommt es in der Folge zur Aktivierung des spezifischen Abwehrsystems, das sich unter anderem aus den B- und T-Lymphozyten zusammensetzt.

Zu der Gruppe der Granulozyten gehören neben den neutrophilen (>90% der Granulozyten) auch die eosinophilen (1-5% d. Gr.) und basophilen (<1% d. Gr.) Granulozyten. Eine Unterscheidung findet aufgrund der Färbbarkeit ihrer spezifischen Granula statt.

2.2.1.2 Aufbau

Neutrophile Granulozyten besitzen wie andere Granulozyten einen Kern mit drei bis vier Segmenten, die untereinander mittels dünner Chromatinfäden verbunden sind. Das Zytoplasma ist relativ wenig anfärbbar, die Granula ausgenommen. Die erste nachweisbare Vorstufe im Knochenmark ist der noch granulafreie Myeloblast, wobei sich die Gesamtheit des Neutrophilenpools des Blutes aus reaktionsfähigen und ausdifferenzierten Granulozyten zusammensetzt. Ca 50 % sind endothelständig besonders im Bereich von Lunge und Milz lokalisiert, der Rest zirkuliert im Blut. Bei einer Gesamtlebensdauer von etwa acht Tagen beträgt die Verweildauer im Blut ca. neun Stunden. Dies ist der Grund für die relativ schlechte Kultivierbarkeit in vitro, die durch eine hohe Erzeugungsrate von ungefähr 80 Mio. Neutrophilen/Minute kompensiert wird.

Die Granula der Neutrophilen lassen sich nach morphologischen, biochemischen und funktionellen Kriterien in Klassen einteilen. Der Inhalt der Granula ist sowohl für die Abwehr von Mikroorganismen im positiven Sinne als auch für Symptome autoimmuner Erkrankungen im negativen Sinne verantwortlich. Die

primären, azurophilen Granula sind peroxidase-positiv. Sie machen ungefähr ein Drittel aller Granula aus und haben einen Durchmesser von etwa 0,4µm. Ihr Inhalt besteht zum großen Teil aus Myeloperoxidase, Lysozym (Muramidase), Proteinasen, Glykosidasen, Sulfatasen, Elastasen, Kathepsin G und kationischen, antibakteriellen Proteinen. Die sekundären, spezifischen Granula sind peroxidase-negativ, und machen zwei Drittel der Granula aus. Ihr Durchmesser beträgt weniger als 0,3µm. Die sekundären, spezifischen Granula enthalten Lactoferrin, Kollagenase und alkalische Phosphatase. Außer diesen Proteinen enthalten sie die Komplementrezeptoren CR3 (CD11b), CR4 (CD11c), einen Rezeptor für das Chemotaxin fMLP und weitere Rezeptoren, und stellen somit eine Speicherform für diese Zellfunktion dar. Bildung und Transport der Granula erfolgt über das raue endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat. Kommt es zu einem Mangel an einem Granulatyp oder der Myeloperoxidase, z. B. im Rahmen einer akuten myeloischen Leukämie resultiert daraus in gewissem Maße die erhöhte Anfälligkeit für Infektionen. Schon auf dem Weg der Neutrophilen an den Ort der Entzündung kommt es zur Verschmelzung der spezifischen Granula mit der Zellmembran und der Sekretion ihres Inhaltes in den Extrazellulärraum, da ihre Mobilisation relativ einfach ist.

2.2.1.3 Aufgabe und Funktion

Eine wichtige Funktion im unspezifischen Abwehrsystem ist die Phagozytose von Mikroorganismen und Gewebetrümmern. Immunglobulin- und komplementmarkierte (opsonierte) Erreger werden über Oberflächenrezeptoren (u.a. CR3, Rezeptoren für den Fc-Teil von IgG) erkannt, woraufhin sich Pseudopodien entwickeln und ein Phagosom in Richtung Zellinneres ausbilden. Dieses intrazelluläre Kompartiment verschmilzt nun mit Lysosomen, die u. a. Muramidasen und Hydrolasen enthalten. Aus dieser Verschmelzung gehen die Phagolysosomen hervor, in denen der enzymatische Abbau des aufgenommenen Materials erfolgt. Die Opsonierung von Mikroorganismen ist nicht obligat erforderlich, da Neutrophile auch ohne diese Markierung zur Phagozytose fähig sind. Durch die Opsonierung wird jedoch eine Beschleunigung oben genannter Prozesse erreicht.

Ist es dem Neutrophilen nicht möglich den Erreger zu phagozytieren, weil dieser zu groß ist, so besteht die Möglichkeit zur Ausschüttung des Granulainhalts nach außen (Degranulation). Geschieht dies mit antikörpermarkierten (opsonierten) Erregern, so spricht man von der antikörperabhängigen, zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC).

Eine weitere Eigenschaft von Neutrophilen ist die Beteiligung an der Pathogenese von nicht infektiösen Gewebeschäden wie z. B. der Gicht, der rheumatoiden Arthritis, der Immunkomplexvaskulitis und der Glomerulonephritis. Der Gewebedefekt entsteht durch Freisetzung von proteolytischen Enzymen und reaktiven O₂-Metaboliten, die an einem plasmamembranständigen Enzymkomplex mittels NADPH-Oxidase/Superoxid-Dismutase gebildet werden. Weiterhin wird eine Beteiligung an der Entstehung von Entzündungen des Gastrointestinaltraktes, des Respirationstraktes (beim ARDS), beim Myokardinfarkt und beim Asthma bronchiale vermutet. Aber auch viele Erkrankungen aus dem dermatologischen Bereich sind durch eine Einwanderung von Neutrophilen in bestimmte Hautschichten gekennzeichnet, was wir in dieser Arbeit untersuchen wollen.

2.2.2 Adhäsionsmoleküle

Adhäsionsmoleküle sind Strukturen, die einen Zell-Zell-Zusammenhalt oder Verbindungen zur Gewebematrix (Kollagen, Laminin) ermöglichen. Es sind integrale Moleküle, die im Zytoskelett verankert sind und durch verschieden Stimuli qualitativer und quantitativer Art in ihrer Expression modifiziert werden (*Driesch, P. v. d., 1992*). Durch zelluläre Adhäsionsmoleküle (CAM's) können Makrophagen und Neutrophile aus den Gefäßen austreten und an ihren Wirkort gelangen (*Kishimoto, TK., et al., 1989*). Die beiden wichtigen Familien der Integrine und der Superimmunglobulin-Gen-Familie werden im Folgenden kurz dargestellt, da sie für diese Arbeit von Bedeutung sind.

2.2.2.1 Integrine

Bei ihnen handelt es sich um Oberflächenrezeptoren der Plasmamembran für extrazelluläre Matrixmoleküle; biochemisch bilden sie eine Gruppe heterodimerer Glykoproteine, die jeweils aus einer nicht-kovalent verbundenen α - und β -Kette bestehen. Subfamilien entstehen dadurch, dass die β -Ketten mit verschiedenen α -Ketten typischerweise verbunden sind. Durch die unterschiedliche Kombination der bekannten 18 α -Ketten und 8 β -Ketten können mindestens 24 verschieden Integrine gebildet werden.

Die Primärstruktur der Integrine besteht aus einer kurzen C-terminalen, zytoplasmatischen und einer großen N-terminalen, extrazellulären Domäne, die auch die Bindungsregion für Liganden trägt. Die Liganden tragen als Bindungspartner den RGD-Rezeptor, der eine charakteristische Aminosäuresequenz aus Arginin, Glycin und Asparaginsäure darstellt (*Driesch, P. v. d., 1992*) oder ähnliche spezifische

Sequenzen. Zwingend notwendig für die Bildung stabiler α/β -Einheiten bzw. für die Bindung der Integrine an ihre extrazellulären Liganden ist die Anwesenheit von extrazellulären divalenten Kationen (Calcium^{2+} , Magnesium^{2+}). Nach ihrer Synthese werden die Integrine entweder an die Zelloberfläche transportiert, oder sie werden in intrazellulären Granula gespeichert, wie es in erster Linie mit den β_2 -Integrinen MAC-1 und gp 150/95 geschieht (*Kishimoto, TK., et al., 1989; Arnaout, MA., 1990; Stacker, LA, and Springer, TA., 1991*).

Durch ihre transmembranöse Anordnung wirken die Integrine als Bindeglieder zwischen dem Extrazellulärraum und dem Zytoskelett des Zellinneren. Die Verbindung zwischen den Integrinen und den Aktinfilamenten erfolgt über mit dem Zytoskelett assoziierten Proteinen wie Talin oder Vinkulin (*Albelda, S., and Buck, CA., 1990*).

Die Leukozyten(β_2 -)Integrine

Die Gruppe der β_2 -Integrine hat den Namen „Leukozyten-Integrine“ deshalb erhalten, weil sie ausschließlich auf Leukozytensubpopulationen zu finden ist. Sie enthält die Proteine LFA-1 (lymphocyte function antigen), MAC-1 (von engl. macrophage) und gp 150/95 (nach dem Molekulargewicht seiner Untereinheiten benannt), die für die Interaktion von Immunzellen untereinander oder zu anderen Zellen (besonders Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten) von entscheidender Bedeutung sind.

Der genetische Code für die drei verschiedenen α -Einheiten (CD11 a-c) ist auf dem Chromosom 16 lokalisiert, der für die gemeinsame β_2 -Einheit (CD18) liegt auf Chromosom 21.

Durch das Leukozytenadhäsionsdefizienzsyndrom (Leu-Cam-Deficiency-Syndrom) kann man sich die zentrale Bedeutung der β_2 -Integrine für Immunprozesse verdeutlichen. Bei diesem Syndrom liegt ein genetischer Defekt der β_2 -Integrine vor, wodurch deren Expression nicht mehr realisierbar ist. Folglich ist es den Neutrophilen dieser Patienten nicht möglich, an Endothelzellen zu binden, und den Gefäßraum zu verlassen. Es resultiert ein mit schwerer Immunsuppression einhergehender, lebensbedrohlicher Krankheitsverlauf, der nur durch intensive Antibiotikatherapie kontrolliert werden kann.

LFA-1 (CD11a/CD18) ist ein Leukozytenintegrin, das auf allen leukozytären Subpopulationen (Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten, Makrophagen, NK-Zellen) nachgewiesen werden kann. Es ist von entscheidender Bedeutung für zahlreiche Funktionen der Lymphozyten, wie z. B. die Zytotoxizität von natürlichen

Killerzellen, die Adhäsion von Lymphozyten an Endothelzellen, die T-Zellproliferation und die Antigenpräsentation (*Cronstein, BN., and Weissmann, G., 1993*). Im Weiteren ist es an der antigenabhängigen und antigenunabhängigen Adhäsion beteiligt. Der Bindungspartner für LFA-1 ist u. a. die erste N-terminale Domäne von ICAM-1 (CD54), einem Superimmunglobulin, welches nach Zytokinaktivierung mittels Interferon- γ (IFN- γ) auch auf Keratinozyten nachgewiesen werden kann (s. 2.2.4.2). Im Rahmen von entzündlichen Hauterkrankungen wie Ekzem, Lichen ruber und Psoriasis, als auch bei akut gefäßgebundenen Reaktionen wie Sweet-Syndrom, Erythema nodosum und Erythema multiforme kommt es zu einer dramatischen Zunahme LFA-1-exprimierender Immunzellen (*Driesch, P. v. d., 1992*).

MAC-1 (CD11b/CD18) wurde als erstes Integrin entdeckt und ursprünglich als Differenzierungsmarker für Zellen der myeloischen Reihe angesehen. Es kommt auf Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Langerhanszellen und einigen Lymphozytensubpopulationen vor. Im Nachhinein fand man heraus, dass es sich um einen Rezeptor für Fibrinogen, für den Gerinnungsfaktor X und das Komplementfragment C3bi handelt, weswegen MAC-1 auch als Komplementrezeptor 3 (CR3) bezeichnet wird. Außerdem kann MAC-1 die Leukozytenadhäsion an Endothel bzw. Keratinozyten vermitteln (*Cronstein, BN., and Weissmann, G., 1993*). Dies geschieht über Liganden an der dritten N-terminalen Domäne von ICAM-1 (*Driesch, P. v. d., 1992*). Es ist zudem an der Vermittlung von Aggregation, Chemotaxis und Degranulation Neutrophiler beteiligt. Die entsprechende Bindungsregion an MAC-1 stellt eine aus 200 Aminosäuren bestehende I-Domäne (inserted domain) dar (*Zhou, L., et al., 1994*). Einer neueren Studie zufolge soll die MAC-1 Expression auch für die Bindung Neutrophiler an Korneozyten der Haut verantwortlich sein, wobei der korneozytengebundene Ligand durch C3bi repräsentiert wird (*Terui, T. et al., 1995*).

Einen Hinweis darauf, dass MAC-1 in der Interaktion zwischen Neutrophilen und Keratinozyten eine wichtige Rolle spielt, liefern In-vivo-Experimente, bei denen Neutrophile untersucht wurden. Die Neutrophilen entstammten Hautbiopsien von Patienten mit Pusteln und zeigten zu 100 % eine CD18-Expression und zu 90 % eine CD11b-Expression, während die CD11a-Expression nur bei 30-40 % lag. Dies zeigt die Bedeutung von MAC-1 für die Interaktion von Neutrophilen und Keratinozyten (*Driesch, P. v. d. 1993*).

Eine Zunahme der Zahl der CD11b-Moleküle auf den Neutrophilen im Rahmen der CD11b-Regulation muss nicht zwangsläufig mit einer Steigerung der adhäsiven Fähigkeit einhergehen (*Philipps, MR., et al., 1988; Vedder, NB. and*

Harlan, JM. 1988), denn die Adhäsionsfähigkeit kann auch über eine qualitative Beeinflussung der CD11b-Moleküle reguliert werden, die aber noch nicht weiter aufgeklärt wurde. Ein Erklärungsversuch wäre eine Adhäsionssteigerung über die spezifische Aktivierung bestimmter Epitope. Für die Initiierung der Neutrophilen-Aggregation wird das „arming“ des CD11b/CD18-Integrins verantwortlich gemacht. Dabei handelt es sich um eine Phosphorylierung der β_2 -Kette (CD18) des Integrins mit Hilfe der Proteinkinase C, die zu einer qualitativen Veränderung des Moleküls führt (*Merill, JT. et al., 1990*). Die chemotaktischen Faktoren TNF- α , Leukotrien B4 oder fMLP führen in Neutrophilen zu einer Phosphorylierung von Tyrosinresten des MAC-1-Moleküls. Dies wurde von *Nacchache, PH., et al. (1994)* nachgewiesen, indem man die Neutrophilen mittels Tyrosinkinase-Inhibitoren an einer Hochregulation von CD11b/CD18 gehemmt hat, was in einer verminderten Adhäsion an Endothelzellen bemerkbar machte. Die Frage nach dem Substrat dieser Tyrosinkinase kann nicht endgültig beantwortet werden, aber nach bisherigen Erkenntnissen handelt es sich vermutlich um ein Protein mit der Molekülmasse von 60 – 70 kD. Ebenso unklar ist, ob es sich bei diesen Vorgängen um Konformationsänderungen des β_2 -Integrins handelt, oder ob es zu einer Verschmelzung der Integrin-haltigen Granula mit der Plasmalemmembran kommt.

Auch andere Plasmarezeptoren wie der Immunglobulinrezeptor Fc γ R III (CD16), CD63 und besonders der Urokinaserezeptor CD87 (uPAR) haben nach Zytokinstimulation regulatorische Eigenschaften bezogen auf die Integrinfunktion. Sie sind mit der Plasmamembran über einen Glykosylphosphatidylinositol(GPI)-Anker verbunden, haben aber keine direkte Verbindung zum Zellinneren. Diese wird durch Interaktion mit membranüberspannenden Proteinen wie dem CR3-Rezeptor (MAC-1) erreicht. Die Abwesenheit von uPAR (CD87) führt zu einer Blockade der β_2 -Integrin-vermittelten Adhäsion von Leukozyten an ICAM-1 auf Endothelzellen, so dass von einer Beteiligung von uPAR (CD87) an der Adhäsionsregulierung ausgegangen wird (*May, AE., et al., 1998; Simon, DI., et al., 1996*)

gp150/95 (CD11c/CD18) ist das dritte Protein der Leukozyten(β_2)-Integrine. Es findet sich auf Monozyten und Neutrophilen. In gesunder Haut wird es von Gewebsmakrophagen und ruhenden Langerhanszellen exprimiert (*De Panifilis, G., et al., 1989*). Granulozyten können aber nach (Zytokin?)-Aktivierung in hohem Maße gp150/95 exprimieren. Bindungspartner für gp150/95 ist ebenso wie für MAC-1 das Komplementspaltprodukt C3bi.

Zur Aminosäuresequenz kann man hinzufügend sagen, dass die α -Untereinheit von MAC-1 und gp150/95 eine 63 %-ige Identität aufweisen. Die Übereinstimmung zur α -Untereinheit von LFA-1 beträgt hingegen nur 35 %.

2.2.2.2 Superimmunglobulin-Gen-Familie

Diese Klasse von Adhäsionsmolekülen umfasst schon länger bekannte Moleküle, die entweder monomer (LFA-2, LFA-3, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1, CD4), oder heterodimer (T-Zellrezeptor, CD8, MHC- Klasse I- und II-Antigen) strukturiert sind. Ich beschränke mich in dieser Arbeit auf die Darstellung des monomeren ICAM-1 (CD54) als einen möglichen Liganden für die Leukozyten(β_2)-Integrine auf neutrophilen Granulozyten.

ICAM-1 besteht aus fünf immunglobulinähnlichen, extrazellulären Domänen, einem transmembranösen und einem zytoplasmatischen Anteil. Biochemisch handelt es sich um ein Glykoprotein, dessen kodierendes Gen auf Chromosom 19 liegt.

Über die erste Domäne kann zwischen ICAM-1 und LFA-1 (CD11a/CD18) eine Bindung aufgebaut werden, die dritte Domäne dient als Bindungsstelle für MAC-1 (CD11b/CD18), jedoch können einer Untersuchung zufolge nicht alle MAC-1-Integrine effektiv an ICAM-1 binden (*Diamond, MS., et al., 1993*). Neben MAC-1 und LFA-1 als β_2 -Integrine können sowohl Fibrinogen und CD43 Liganden für ICAM-1 sein. Das Rhinovirus, einige Arten des Coxsackievirus und des Parainfluenzavirus binden ebenfalls an ICAM-1 (*Tosi, MF., et al., 1992*).

Der Nachweis von ICAM-1 gelingt auf vielen hämatopoetischen Zellen (z. B. T- und B-Lymphozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten), auf Gefäßendothelien, auf dendritischen Zellen und einigen Epithelien (z. B. Thymus, Tonsillen); auch eine de-novo-Synthese ist möglich. Eine zytokinabhängige Hochregulation lässt sich bei Entzündungen nach ca. zwei Stunden auf Keratinozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und Infiltratzellen beobachten, wodurch die Immigration LFA-1-positiver Leukozyten sowie die immunozytologischen Interaktionen ermöglicht werden. Aber auch die Antigenpräsentation von Langerhans-Zellen und anderen akzessorischen Zellen ist ICAM-1-abhängig.

ICAM-1-induzierende Substanzen sind die Zytokine IFN- γ , TNF- α / β und IL-1 (für Endothel). Die Induktion hemmende Faktoren sind Steroide. Hierbei reichen schon geringe Dosierungen (*Rothlein, R., et al., 1988*).

Da ICAM-1 auf gesunden Keratinozyten nicht exprimiert wird (*Lange Wantzin, G., et al., 1988; Böhnke, W., et al., 1992*), ist es um so interessanter, dass es bei Patienten mit entzündlichen Dermatosen wie Psoriasis, Pityriasis lichenoides,

palmoplantarer Pustulose, Sweet-Syndrom u.a. nachgewiesen werden kann (*Driesch, P. v. d., (1992)*). Eine Erklärung für dieses Phänomen liefern eingewanderte Lymphozyten. Sie sezernieren IFN- γ , das dann die Induktion auf Keratinozyten bewirkt. Eine Korrelation von eingewanderten Lymphozyten und ICAM-1-Expression wurde von *Griffiths, CEM., et al., 1989* beobachtet. Auch die Zunahme der Adhäsion von Neutrophilen hat möglichenfalls einen Bezug zur gesteigerten ICAM-1-Expression, da die Neutrophilen über CD11a/CD18 und CD11b/CD18 an ICAM-1 binden können (*Nickoloff, BJ., et al., 1987; Barker JNWN., et al., 1992*).

2.2.3 Keratinozyten

Bei den immunologisch relevanten Zellen der normalen Epidermis muss man die antigenpräsentierenden Zellen zusammen mit den Keratinozyten betrachten. Die antigenpräsentierenden Zellen beinhalten Langerhans-Zellen, Neutrophile, Mastzellen und Endothelzellen. Die Keratinozyten greifen durch Produktion von Zytokinen wie IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, TNF- α , M-CSF, G-CSF, GM-CSF, TGF- α , und TGF- β aktiv in das Immungeschehen ein und tragen folgende wichtige Oberflächenmoleküle: die Immunglobulinrezeptoren FcR I (CD64) und FcR III (CD16), aus der β_1 -Integrin-Familie die VLA-Moleküle (very late antigen) und das LFA-3 (CD58) aus der Superimmunglobulinfamilie. Die Keratinozyten sind auch in der Lage auf immunmodulierende Stimulantien spezifisch anzusprechen. So reagieren sie z. B. auf IFN- γ und TNF- α mit der Expression verschiedener Oberflächenmarker, wie den MHC-II-Molekülen HLA-DR und HLA-DQ, dem Thrombospondinrezeptor (CD36) und ICAM-1 (CD54). ICAM-1 kommt besondere Bedeutung in zytokin-mediierter entzündeter Haut zu (*Hunyadi, J., et al., 1992*).

2.2.4 Zytokine

Bei diesen Substanzen handelt es sich um Polypeptide mit einer Molekülmasse zwischen 8.000 bis 80.000 Dalton, die regulatorische Wirkungen auf Immun- und Entzündungszellen ausüben. Sie dienen der Kommunikation zwischen den Zellen des Immunsystems untereinander und den Zellen, die an inflammatorischen Prozessen mitwirken. Die Funktion vieler Zytokine besteht in der Auslösung der Differenzierung und Reifung von Immunzellen (*Metcalf, 1989*), oder in der Aktivierung und Regulation von Effektorfunktionen von Immunzellen. Diese Signalübertragung erfolgt über kurze Distanzen zu einem bestimmten Zweck, und ist temporär und lokal beschränkt. Für Zytokine gilt der Grundsatz der Pleiotropie. D. h., dass die Zytokine nicht ausschließlich von einem Immunzelltyp gebildet werden,

sondern auch von anderen Zellen erzeugt werden können. Außerdem kann ein einzelnes Zytokin in mehr als einem Zelltyp biologische Reaktionen auslösen. Im Folgenden sollen die Zytokine, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, kurz erläutert werden.

2.2.4.1 TNF- α

TNF- α ist dadurch bekannt und benannt worden, dass es bei Mäusen in bestimmten transplantierten Tumoren hämorrhagische Nekrosen erzeugen kann. Es entsteht aus einem Vorläuferprotein durch gezielte Proteolyse, um nachher als monomeres 17 kD großes Protein, bestehend aus 157 Aminosäuren, vorzuliegen; auch trimere Formen kommen vor.

Hauptsächlicher Bildungsort sind aktivierte Makrophagen und Monozyten, die TNF- α zu einem sehr frühen Entzündungszeitpunkt ausschütten. Zusammen mit IL-1 und IL-6 vermag TNF- α entzündliche Immunprozesse zu medieren und somit einen regulatorischen Einfluss auf Immunreaktionen auszuüben. Beispiele für Zustände, an denen TNF- α beteiligt ist, sind der septische Schock (Fehlregulation mit hohen TNF- α -Konzentrationen), die Kachexie (durch Hemmung der Lipoprotein-Lipase, die die normale Fettspeicherung vermittelt), die akute Entzündung, die Immunantwort, die Wachstumshemmung einiger Tumorzellen und die Stimulierung der Angiogenese. Des Weiteren besteht eine Assoziation zwischen TNF- α und der gramnegativen Sepsis bzw. dem ARDS (adult respiratory distress syndrome). Als wichtige Funktion bezogen auf unseren Versuch, muss natürlich die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten genannt werden (*Larrick, JW., et al., 1987*).

Die Rezeptoren für TNF- α heißen p55-TNF-Rezeptor (55kD) und p75-TNF-Rezeptor (75kD). Auf Granulozyten bindet TNF- α mit hoher Affinität an beide, wobei der entscheidende Rezeptor der p-55 ist (*Kondo, S., and Sauder, DN., 1997*). Die Bindung von TNF- α an seinen Rezeptor führt bei Granulozyten zu Verstärkung der Phagozytoseaktivität und der zellvermittelten Zytotoxizität gegen Mikroorganismen, Parasiten und Tumorzellen sowie zu einer verstärkten Freisetzung von Superoxidradikalen und H₂O₂. Ein weiteres Resultat ist die Expressionssteigerung von Adhäsionsmolekülen, im speziellen des β_2 -Integrins MAC-1 (CD11b/CD18), wodurch sich die Bindung an Endothelzellen und Keratinozyten steigern lässt. Einer Studie von *Limb, GA., et al. (1991)* zufolge ist dieser Effekt am ehesten durch TNF- α und nicht durch TNF- β induzierbar und durch monoklonale Antikörper gegen MAC-1 blockierbar. Als das so genannte Shedding bezeichnet man einen Mechanismus, bei

dem TNF-Rezeptoren durch proteolytische Spaltung hydrolysiert werden. Dabei entstehen aus den extrazellulären Rezeptoranteilen die löslichen TNF-bindenden Proteine TNF-R55-BP und TNF-R75-BP. Durch diesen Mechanismus können sich auch Tumorzellen dem zytotoxischen Effekt von TNF- α entziehen. (*Richter, J. and Zetterberg, E. 1994*).

2.2.4.2 IFN- γ

IFN- γ ist eine Substanz aus der Gruppe der Interferone. Es ist in der Lage, die intrazelluläre Vermehrung von Viren zu hemmen. Überdies stoppt es die Zellvermehrung und kann zur Rückbildung von Tumoren führen. IFN- γ ist ein Glykoprotein mit einem Proteinanteil von 146 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht von 22 kD. Die Hauptquellen für IFN- γ sind T-Helferzellen und NK-Zellen, die nach Antigenkontakt größere Mengen freisetzen. Die Signaltransduktion an den Zielzellen erfolgt nach Bindung an einem heterodimeren Typ-II-Rezeptor. An ihm kommt es zur Konformationsänderung der beiden Polypeptidketten und zur Aktivierung der Proteinkinase C.

Zielzellen sind sowohl Leukozyten als auch Keratinozyten. Bei polymorphkernigen Leukozyten kommt es nach IFN- γ -Aktivierung zur Steigerung der Phagozytose, des oxidativen Metabolismus, der Proteinsynthese, der Degranulation, der Chemotaxis, der mikrobiellen Aktivität und der antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität. Die IFN- γ -Aktivierung beinhaltet die Expressionssteigerung eines funktionellen Fc-Rezeptors, der eine hohe Affinität für monomeres IgG besitzt, wodurch oben genannte Modulationen vermittelt werden. Ferner ist IFN- γ in der Lage, die Abnahme der CD11b- und CD18-Moleküle zu inhibieren, wenn Neutrophile mehrere Stunden damit inkubiert werden. Diese Beobachtung korrelierte mit konstanten mRNA-Levels für CD11b und CD18 (*Klebanoff, S.J., et al., 1992*). Durch Langzeitinkubation mit IFN- γ ließ sich in mehreren humanen Tumorzelllinien, durch eine Induktion von TNF-Rezeptoren, eine gesteigerte Bindung von TNF- α herbeiführen.

Zentrale Bedeutung hat in dieser Arbeit die Wirkung von IFN- γ auf Keratinozyten, da die Bindung TNF- α -aktivierter neutrophiler Granulozyten an humaner Epidermis, die mit IFN- γ vorinkubiert war, bestimmt wurde. IFN- γ wurde deswegen verwendet, weil es im Vergleich mit TNF- α und IL-1 den stärksten Effekt zeigte im Sinne einer Erhöhung der ICAM-1-Expression (*Dustin, M.L., et al. 1988; Griffiths, CEM., 1989*).

2.3 Abschließende Zieldefinition

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung einer Cyclosporin A-abhängigen Änderung des Bindungsverhaltens TNF- α -stimulierter neutrophiler Granulozyten an IFN- γ vorinkubierten Epidermisschnitten. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit soll ein Beitrag zur Aufklärung des Wirkmechanismus geleistet werden, der dem klinischen Erfolg bei der Behandlung neutrophiler Dermatosen mit Cyclosporin A zugrunde liegt.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Präparation der Epidermis

3.1.1 Biopsien

Es wurden von Patienten nach deren schriftlicher Einverständniserklärung gesunde Hautareale verwendet, die ohne dies im Rahmen von erforderlichen operativen Eingriffen entnommen werden mußten. Von diesen Präparaten wurden ex vivo mittels kleiner Ringmesser Stanzen mit einem Durchmesser von 3 Millimeter gewonnen. Diese Gewebestücke wurden mit IFN- γ (1000 IE/ml; Genzyme Diagnostics, Cambridge, USA) bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert, um eine ICAM-1-Induktion zu erzielen. Nach einer Inkubationsdauer von 16 Stunden wurden die Gewebestücke in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, und bis zur weiteren Verwendung nicht länger als 8 Wochen bei -70°C gelagert. Für den Adhäsionsassay wurden jeweils zwei 8 μ m dicke Kryostatschnitte auf einen silanisierten Objektträger gebracht. Die Objektträger wurden dann jeweils bis zum Beginn des Adhäsionsassays wiederum bei -70°C tiefgefroren.

3.1.2 ICAM-1-Färbung

Um zu überprüfen, ob ICAM-1 auf Keratinozyten induziert wurde, erfolgte bei jedem zehnten Objektträger eine Immunfärbung mit anti-ICAM-1-Antikörpern. Hierfür wurden tiefgefrorene Objektträger aufgetaut und bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Es folgte eine zehnminütige Fixation in kaltem Aceton und anschließend eine Aufbewahrung der Objektträger in PBS-Puffer (phosphat buffered saline) in Coverplates, die ein Austrocknen der Schnitte verhindern und eine gleichmäßige Verteilung der Antikörper auf den Schnitten bewirken. Die Objektträger wurden mit Ziegen Serum in einer Verdünnung von 1:20 in PBS für 20 Minuten vorbehandelt. Danach wurden die Schnitte mit monoklonalen Antikörpern gegen ICAM-1 in einer Verdünnung von 1:150 in CAD (common-antibody-diluent; Dako, Glostrup, Dänemark) inkubiert. Nach 30 Minuten wurden die Objektträger mit PBS dreimal gewaschen. Danach wurde der Sekundärantikörper (biotinylierter goat-anti-mouse-Brücken-Antikörper) in einer Verdünnung von 1:1000 30 Minuten auf die Schnitte gegeben. Woraufhin im Anschluss wieder jeweils dreimal mit PBS gewaschen wurde. In einem vierten Schritt erfolgte die 30-minütige Inkubation mit Avidin, das hochspezifisch an das Biotin des Sekundärantikörpers bindet, und alkalischer Phosphatase (APAAP-Komplex; 1:1000). Nach diesem Schritt wurden die Objektträger aus den Coverplates herausgenommen und in einer Glasküvette mit

PBS gespült. Anschließend wurden sie zur Färbung vorbereitet und auf eine geeignete Platte gelegt. Die Färbung erfolgte mit einem Chromogen der Firma BioGenex, bestehend aus einer Tablette FastRed und dem Lösungsmittel Naphtal-Phosphat. Die filtrierte Färbelösung wurde auf die Schnitte aller Objektträger verteilt und für zwölf Minuten inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Objektträger erneut in PBS gewaschen und danach in einer Glasküvette unter fließendes Wasser zum Intensivieren der Färbung gestellt. Als letzte Schritte schlossen sich die Kernfärbung nach Mayer (Hämalaun) und das Eindecken mit einem wasserlöslichen Eindeckmedium an.

3.2 Isolierung der Granulozyten

Die Isolierung der Granulozyten erfolgte nach dem Prinzip eines Dichtedoppelgradienten. Als erstes wurde in ein Falcon-Reagenzgefäß 15 ml Histopaque 1119 (Fa. Sigma) eingefüllt. Diese Phase wurde unter größter Vorsicht mit 15 ml Histopaque 1077 (Fa. Sigma) überschichtet, so dass sich beide Lösungen nicht vermischten und ein „Meniskus“ zwischen beiden Phasen sichtbar wurde. Sodann wurde erneut unter größter Vorsicht 10 ml EDTA-Vollblut von gesunden Spendern mittleren Lebensalters auf den Gradienten aufgefüllt, ohne dass sich der Gradient mit dem Blut vermischt. Dieser Ansatz wurde für 45 Minuten bei 1500 Umdrehungen/Minute und 20°C ohne Bremswirkung zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurden von oben her die Banden des Plasmas, der Lymphozyten/Thrombozyten und des Histopaque 1077 abgesaugt. Die nun folgende Granulozytenbande wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Falcon-Tube gefüllt. Um die Granulozytensuspension von verunreinigenden Erythrozyten zu befreien, wurde eine Erythrozytenlyse mittels einminütiger Zugabe von Aqua dest. durchgeführt. Danach werden die physiologischen Bedingungen durch Zugabe hypertoner NaCl-Lösung wieder hergestellt. Gefolgt von erneuter Zentrifugation wird die reine Granulozytenmasse in einem Milliliter Zellmedium (RPMI 1640) ohne Zusätze resuspendiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellkonzentration in einer Neubauer-Zählkammer (Faktor 50.000). Die Zellkonzentration wurde im Anschluss auf $6 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt.

3.3 Adhäsionsassay

Die angewandte Methode basierte auf dem „Stamper-Woodruff-Assay“ (Stamper, HB., Jr. and Woodruff, JJ. 1976).

3.3.1 Herstellen der Ansätze und Aktivierung der Granulozyten

Im Anschluss an die Granulozytenisolierung erfolgte die Herstellung der Ansatzlösungen. Verwendet wurden Stammlösungen von Cyclosporin A (Reinsubstanz, zur Verfügung gestellt von der Fa. Novartis), die in einer Konzentration von 1mM vorlagen. Lösungsmittel für Cyclosporin A war DMSO, welches wir in einem eigenen Ansatz auf Effekte bezüglich der Adhäsion der Neutrophilen untersucht haben. Zu der Zellsuspension von $6 \cdot 10^6$ Zellen/ml wurde Cyclosporin A in unterschiedlichen Konzentrationen (10^{-6} bis 10^{-10} M) zugegeben. Ein weiterer Ansatz enthielt die Granulozyten und DMSO in äquivalenten Konzentrationen (0,1%-ig bis 0,00001%-ig), der dritte Ansatz enthielt als Positivkontrolle weder Medikament noch Lösungsmittel und der vierte Ansatz als Negativkontrolle nur Medium. Die Ansätze wurden dann für 10 Minuten bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% kultiviert.

Im Weiteren wurde danach TNF- α (10^3 IE/ml; Pharma Biotechnologie, Hannover) zu den entsprechenden Ansätzen (nicht Ansatz vier) zugegeben, von denen dann jeweils 40 μ l auf zwei vorher aufgetaute Objektträger verteilt wurde. Diese Objektträger wurden daraufhin für 30 Minuten bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% inkubiert.

3.3.2 Färbung

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Objektträger 10-mal in HBSS (Hanks balanced salt solution) gewaschen, um die nicht gebundenen Granulozyten zu entfernen. Die gebundenen Granulozyten wurden durch eine Färbung mit Toluidinblau bei einem pH von 7,2 sichtbar gemacht (Barker et al., 1992). Zum Entfärben benutzten wir eine aufsteigende Alkoholreihe (90%, 96%, 100%, 100%, Xylol) um die Objektträger danach mit Entellan (Merck, Darmstadt) einzudecken.

3.3.3 Auszählung und Auswertung

Die Auszählung erfolgte an einem Lichtmikroskop (Leitz Orthoplan) in der 16-fachen Vergrößerung durch Auszählen von 32 Quadraten eines Zählrasters, das in das Okular des Mikroskops eingelegt wurde. Dies entspricht einer Gesamtfläche von 1mm^2 . Alle spezifisch gebundenen Granulozyten unterhalb des Stratum corneum und oberhalb der Basalmembran wurden gezählt. Für die Auswertung wurden jeweils die Ergebnisse desselben Tages miteinander verglichen. Alle Adhäsionsassays wurden mindestens dreimal reproduziert. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test.

3.4 FACS-Analyse: CD11b- und CD15-Expression unter Verwendung von Cyclosporin A

Die isolierten Granulozyten wurden in jeweils 2 Ansätzen mit Cyclosporin A ($1\mu\text{M}$ und 10nM), DMSO ($0,1\%$ und $0,001\%$) oder HBSS (Hanks balanced salt solution) für 1 Stunde bzw. 5 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 -Gehalt kultiviert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen jeweils eines Ansatzes von beiden mit $\text{TNF-}\alpha$ (10^3 IE/ml) aktiviert, und zusammen mit den anderen Ansätzen erneut für 20 Minuten unter oben genannten Bedingungen kultiviert. Nach dem Waschen aller Ansätze mit jeweils 2ml PBS und Zentrifugation bei 1200 Umdrehungen/Minute für 8 Minuten wurden die Ansätze mit den Antikörpern beschickt. Der CD11b-Antikörper (Fa. Dako; mouse-anti-human-CD11b-PE konjugiert) wurde ebenso wie der CD15-Antikörper (Fa. Dianova; Anti-CD15-FITC konjugiert) in einer 1:10-Verdünnung angeboten. Nach diesem Schritt wurden die Ansätze für 60 Minuten bei 4°C inkubiert, um anschließend die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Dies geschah durch zweimaliges Waschen mit PBS bei 1200 Umdrehungen/Minute und 4°C , das erste Mal für acht Minuten und das zweite Mal für fünf Minuten. An diesen Schritt schloss sich nach Aufnahme des Zellpellets in kaltem PBS die Fluoreszenzmessung im FACScan 3 der Firma Becton-Dickinson an. Für die Auswertung (Cellquest™-Software) wurde die mittlere Fluoreszenzintensität der CD11b- bzw. CD15-positiven Zellen herangezogen. Jeder Versuch wurde zweimal wiederholt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test.

4. ERGEBNISSE

4.1 Einfluss von Cyclosporin A auf die Adhäsion neutrophiler Granulozyten an humane Epidermiszellen

Für diesen Versuch wurden neutrophile Granulozyten aus venösem Blut gesunder Spender isoliert und mit absteigenden Konzentrationen Cyclosporin A für fünfzehn Minuten inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte eine Aktivierung mit TNF- α . Die Suspensionen wurden dann auf die Hautschnitte, die vorher mit IFN- γ behandelt wurden, appliziert und für weitere 30 Minuten inkubiert.

Es zeigte sich, dass es unter dem Einfluss von Cyclosporin A zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Bindung von Granulozyten an Epidermalzellen kommt. Diese Hemmung scheint logarithmisch linear zu verlaufen, wobei der größte Effekt bei einer Konzentration von 1 μ M zu sehen ist und der Effekt bei einer Konzentration von 0,1 nM nicht mehr nachweisbar ist (siehe Abb. 2.1.).

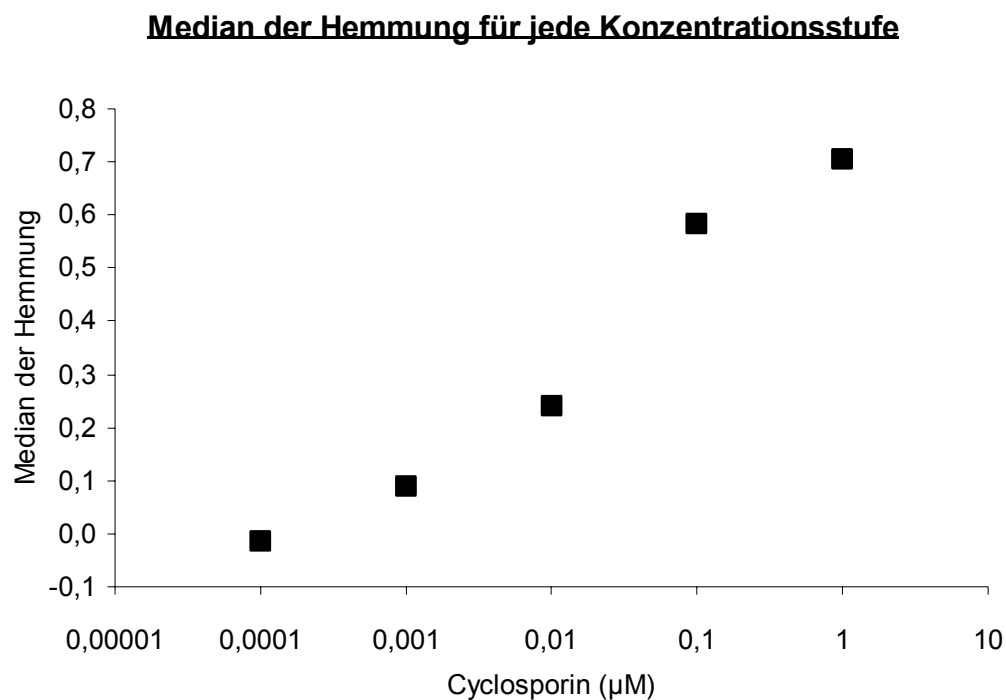


Abb. 2.1: Signifikante, dosisabhängige Hemmung ($p < 0,001$ im Kruskal-Wallis-Test) der Adhäsion von TNF- α -aktivierten Granulozyten an Epidermisschnitten (Median der Hemmung im Vergleich zur Kontrolle)

Des Weiteren kommen fotografierte Versuchsergebnisse zur Darstellung, um den beobachteten Effekt unserer Versuche zu demonstrieren. Es handelt sich um Epidermisausschnitte mit Granulozytenbindung nach Vorinkubation für 15 Minuten mit der angegebenen Cyclosporin A-Konzentration und anschließender TNF- α -Aktivierung. Deutlich ist die Bindungsreduktion im unteren Bild (Abb. 2.3) bei hoher Cyclosporin A-Konzentration zu erkennen.

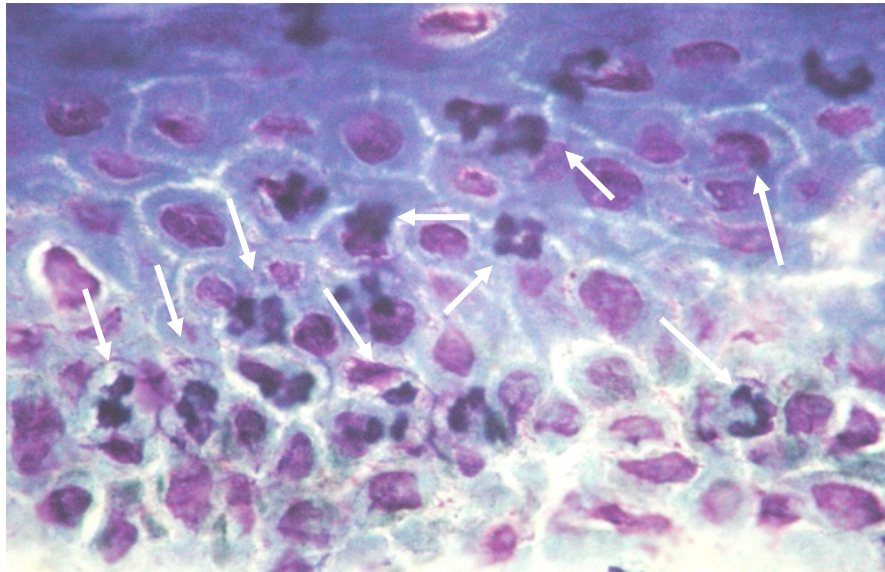


Abb. 2.2 0,1 nM Cyclosporin A
→ zeigt einige gebundene Granulozyten

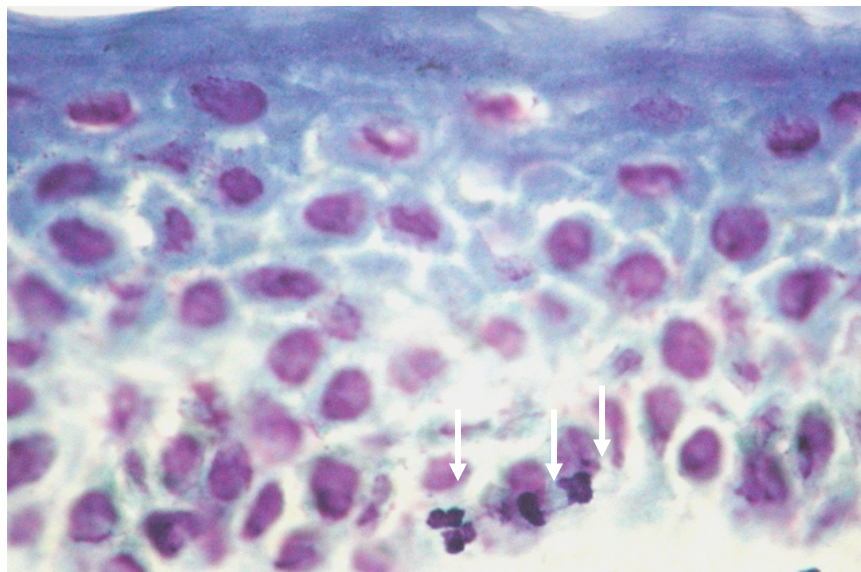


Abb. 2.3 1 μ M Cyclosporin A
deutlich weniger gebundene Granulozyten

4.2 Einfluss von Cyclosporin A auf die Expression von CD11b und CD15

Um eine Erklärung für den hemmenden Effekt des Cyclosporin A zu finden, wurde dessen Einfluss auf die granulozytäre Expression von CD11b mittels FACS-Messungen untersucht. Als Kontrolle diente die parallele Untersuchung des CD15-Antigens unter gleichen Wirkstoffkonzentrationen und Inkubationszeiten. CD15 wird als typisches Oberflächenantigen regelhaft von neutrophilen Granulozyten exprimiert. Es wurden zwei Konzentrationen, eine hohe ($1\mu\text{M}$) und eine niedrige (10nM), mit jeweils zwei Inkubationsintervallen von einmal einer Stunde (1h) und einmal fünf Stunden (5h) gemessen. Mit den Kontrollansätzen wurde natürlich ebenso verfahren. Die Behandlung der Granulozyten war, abgesehen von den Inkubationszeiten, die gleiche wie beim Adhäsionsassay.

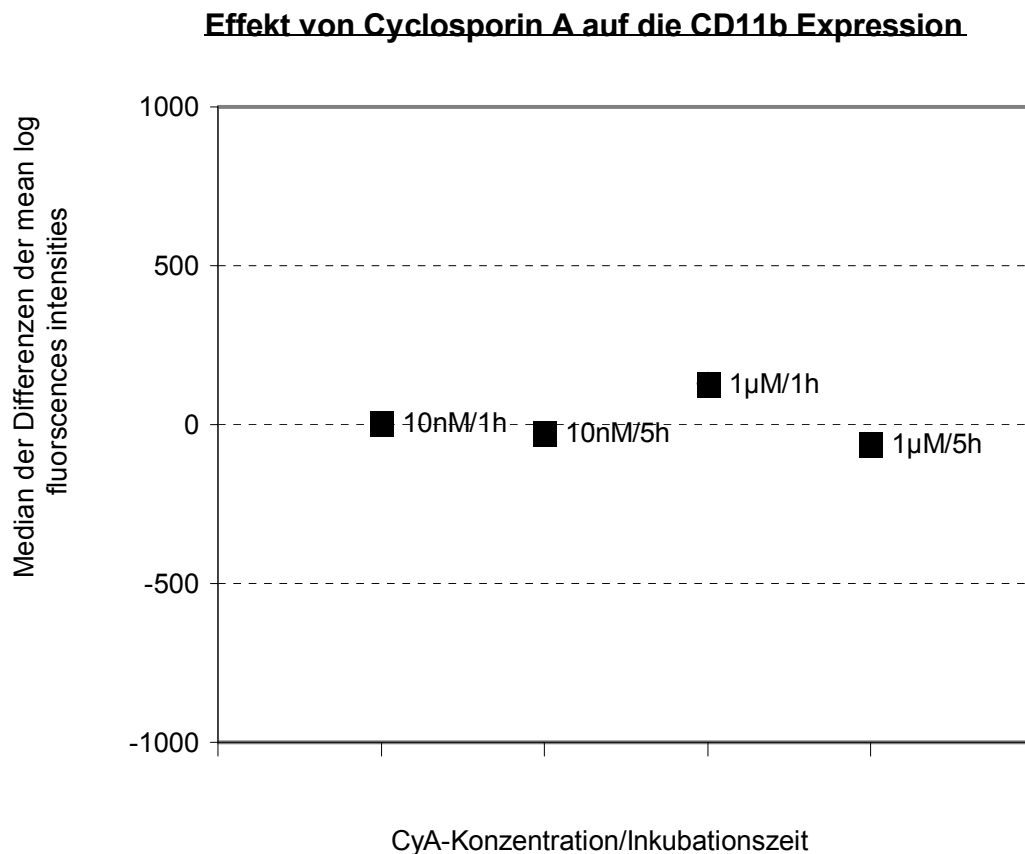


Abb. 3: CD11b Expression der Neutrophilen unter Cyclosporin A-Einfluss.

In dem Diagramm wird sichtbar, dass es nicht zu einer statistisch signifikanten Änderung der Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von Wirkstoffkonzentration bzw. Inkubationszeit kommt. Allerdings ist bei verlängerten Inkubationszeiten eine Fluoreszenzabnahme zu beobachten, die sich bei hohen Cyclosporin A-Konzentrationen ($1\mu\text{M}$) sogar noch deutlicher abzeichnet.

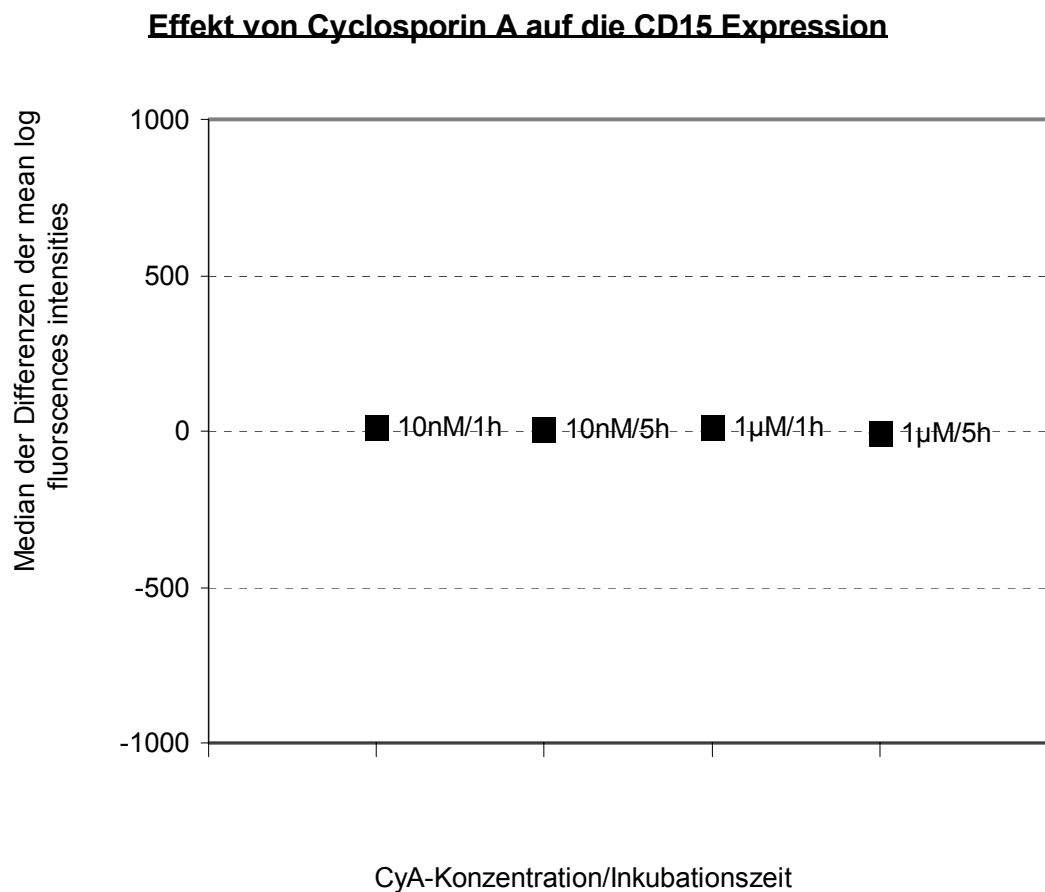


Abb. 4: CD15 Expression der Neutrophilen unter Cyclosporin A-Einfluss.

Es ergibt sich kein statistisch signifikanter Einfluss auf die Fluoreszenzintensität der CD15-Moleküle in Abhängigkeit von Wirkstoffkonzentration bzw. Inkubationsdauer.

4.3 Einfluss von TNF- α auf die CD11b-Expression

Durch die Behandlung der Neutrophilen mit TNF- α kommt es im Rahmen der Entzündungsreaktion zu einer Aktivierung der Zellen. Diese Aktivierung ließ sich in der FACS-Analyse durch einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zu unbehandelten Zellen darstellen. Dieser Effekt ist bei der einstündigen Inkubation deutlicher ausgeprägt als bei der fünfständigen.

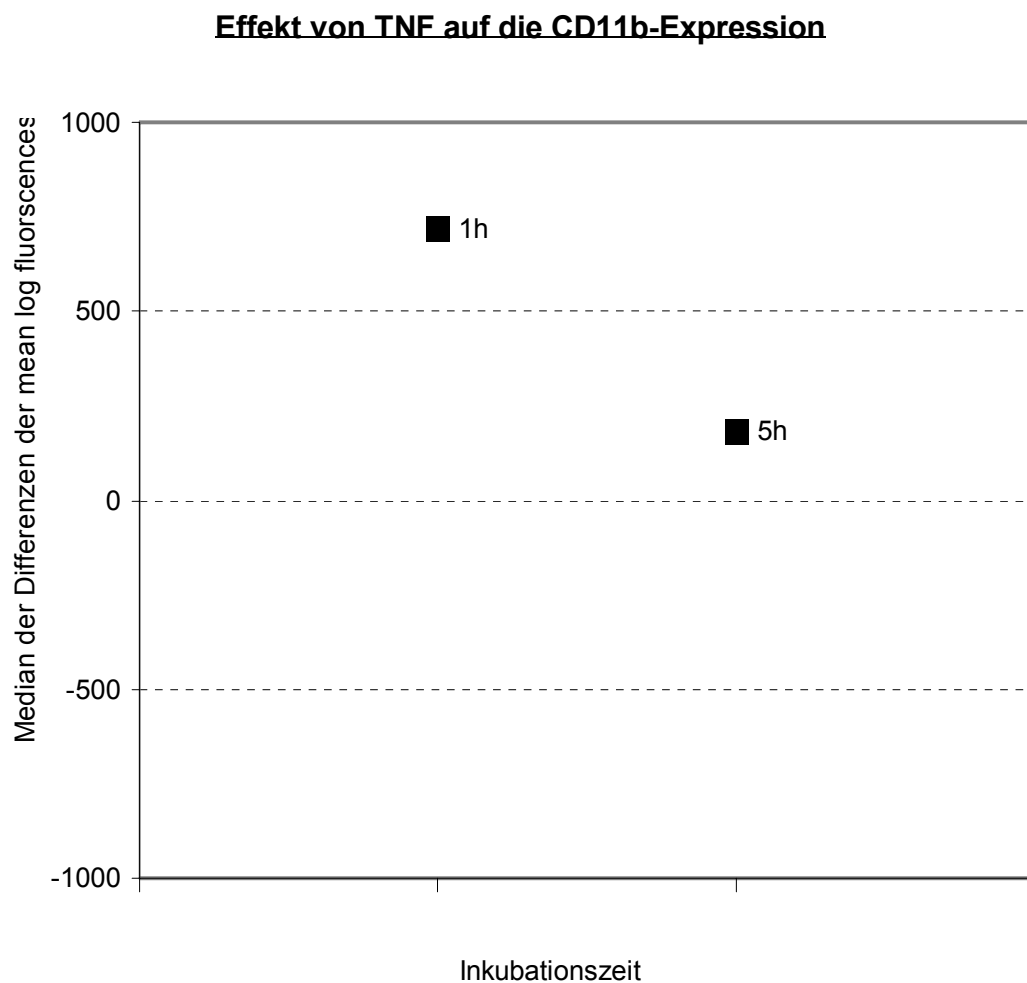


Abb. 5: Granulozytäre CD11b-Expression unter TNF- α . Signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensitäten ($p < 0,001$ im Wilcoxon-Test).

4.4 Einfluss von Cyclosporin A und TNF- α auf die CD11b-Expression

Ein weiterer Versuchsaspekt untersucht die CD11b-Expression nach Applikation von Cyclosporin A und TNF- α im Vergleich zu einer Kontrolle, der weder Cyclosporin A noch TNF- α zugefügt wurden. Hierbei zeigt sich, dass der schon oben beschriebene TNF- α -Effekt signifikant nachgewiesen werden kann ($p < 0,001$ im Wilcoxon-Test). Allerdings kommt es zu keiner signifikanten Reduktion der Fluoreszenzen durch Cyclosporin A oder veränderte Inkubationszeiten.

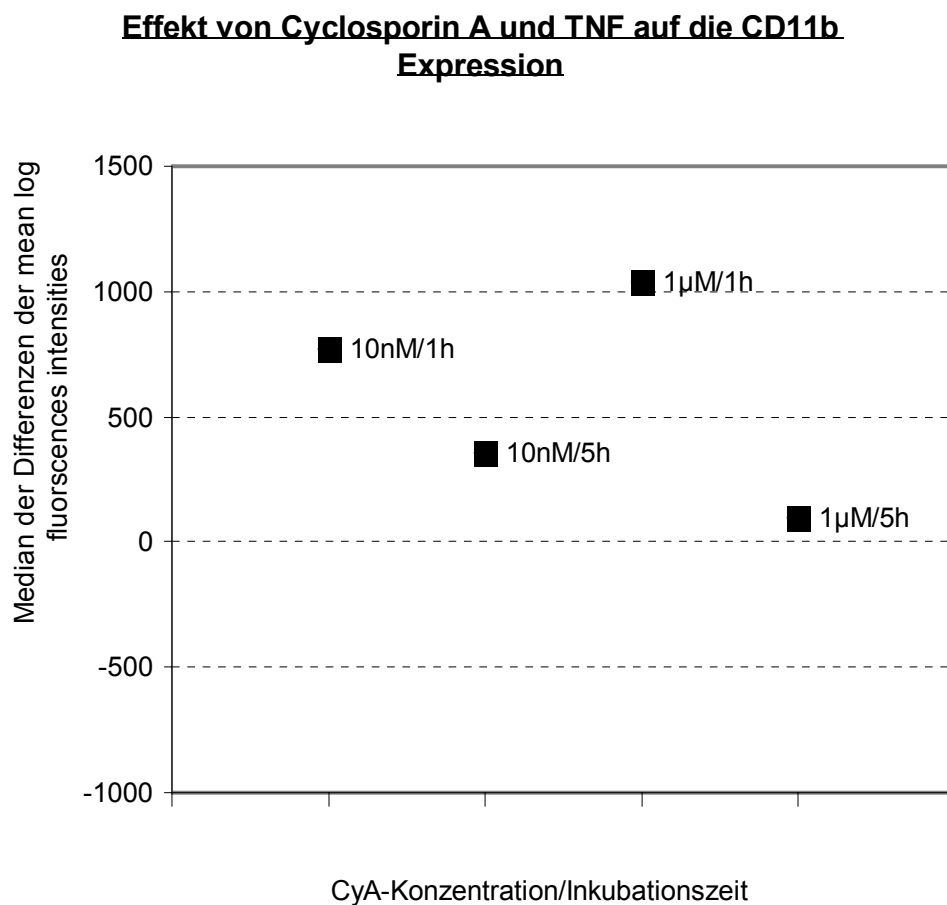


Abb. 6: Granulozytäre CD11b-Expression in Abhängigkeit von verschiedenen Cyclosporin A-Konzentrationen und Inkubationszeiten in Kombination mit TNF- α -Aktivierung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollansätzen.

Abschließend sollen die Ansätze, die Cyclosporin A und TNF- α enthielten mit denen verglichen werden, die nur TNF- α enthielten. Dadurch sollen die vorherigen Befunde nochmals verifiziert werden. Es konnte die Ergebnisse aus 4.2, 4.3, und 4.4 bestätigt werden.

Vergleich der Ansätze mit CyA + TNF und TNF alleine

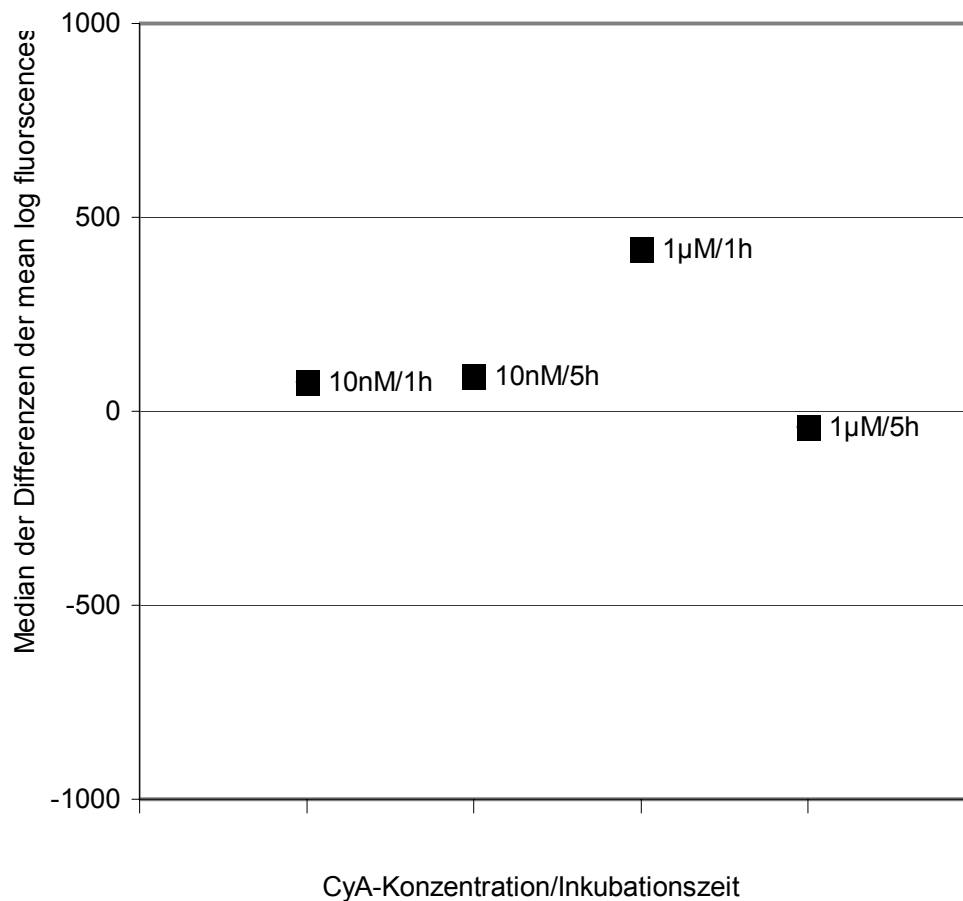


Abb. 7: Vergleich der Ansätze mit Cyclosporin A/TNF- α und TNF- α alleine in Abhängigkeit von Inkubationsdauer und verschiedenen Cyclosporin A-Konzentrationen. Ausgedrückt durch den Median der Differenzen der Fluoreszenzintensitäten.

Die von uns durch die Versuchsdurchführung erfassten Originaldaten stelle ich auf Seite 37 zur Verfügung.

4.5 Rohdaten

Rohdaten der FACS-Analysen
(mean log fluorescence intensity)

Patient	Inkubation	Kontrolle CD11b	plus TNF- α CD11b	Kontrolle CD15	CyA-Konzentration	plus CyA CD11b	plus TNF- α und CyA CD11b	plus CyA CD15
1	1h	899	1422	180	1 μ M	1030	1701	227
2	1h	833	1451	154	1 μ M	897	1868	152
3	1h	620	1613	157	1 μ M	895	2403	170
4	1h	726	1286	100	10nM	734	1361	223
5	1h	612	1442	192	10nM	801	1812	117
6	1h	958	1775	60	10nM	888	1733	70
7	5h	721	911	101	1 μ M	609	873	93
8	5h	576	697	59	1 μ M	512	677	67
9	5h	608	653	80	1 μ M	550	553	64
10	5h	675	850	136	10nM	651	790	91
11	5h	517	783	65	10nM	470	876	70
12	5h	599	856	110	10nM	605	1077	120

Rohdaten des Adhäsionsassays

Cyclosporin A-Konzentration [μ M]	Adhäsionshemmung [%]
1	72
1	69
1	86
1	51
0,1	58
0,1	58
0,1	64
0,1	44
0,01	27
0,01	2
0,01	24
0,001	9
0,001	13
0,001	2
0,0001	4
0,0001	0
0,0001	0

5. DISKUSSION

5.1 Methoden

Für die Untersuchung des Cyclosporin A-abhängigen Adhäsionsverhaltens neutrophiler Granulozyten an Schnitten humaner Epidermis verwendeten wir einen Adhäsionsassay, der in den 70er Jahren entwickelt und etabliert wurde. Die dafür notwendige Isolation der neutrophilen Granulozyten wurde nach einem besonders schonenden Verfahren durchgeführt. Für die Vorinkubationszeiten und Wirkstoffkonzentrationen orientierten wir uns zunächst an Werten, die wir in einer intensiven Literaturrecherche objektivieren konnten. Daraufhin überprüften wir diese Angaben auf ihre Durchführbarkeit bzgl. unserer Fragestellung und modifizierten sie dementsprechend. Im Folgenden werden die Methoden und Ergebnisse kritisch diskutiert.

5.1.1 Adhäsionsassay

Wir benutzten in unseren Experimenten zur Analyse des Bindungsverhaltens neutrophiler Granulozyten an humane Epidermisschnitte einen Adhäsionsassay, der bereits 1972 als „frozen section assay“ vorgestellt wurde (*Stamper, HB., Jr. and Woodruff, JJ. 1976*). Die oben beschriebene Versuchstechnik wurde weiterhin im Jahre 1989 von Nickoloff und Griffiths erfolgreich dazu verwendet, die Interaktion von T-Zellen und Keratinozyten zu untersuchen. Und auch Barker et al. konnten vor einigen Jahren mittels dieser Technik eine erhöhte Bindung von T-Lymphozyten und Neutrophilen an Keratinozyten bei an Psoriasis erkrankten Patienten nachweisen (*Barker, JNWN., et al. 1992*). Diese drei Beispiele demonstrieren, dass der Adhäsionsassay eine geeignete Methode darstellen kann, um uns in unserer Fragestellung bzgl. des Bindungsverhaltens Neutrophiler an humane Epidermisschnitte Antworten zu liefern. Allerdings ist kritisch zu bemerken, dass die Zell-Zell-Interaktion von Seiten der Keratinozyten durch avitale Zellen repräsentiert wird. Weiterhin ist auch die Tatsache, dass wir mit Gewebeschnitten gearbeitet haben, in die kritische Ergebnisinterpretation einzubeziehen, da eine Adhäsion der Neutrophilen an intrazelluläre spezifische wie unspezifische Strukturen und Rezeptoren nicht auszuschließen ist. Diese Rezeptoren könnten sich beispielsweise in intrazellulären Granula befinden. Ebenfalls reduzieren wir einen möglichen pathologischen Prozess bei neutrophilen Dermatosen auf ein zweidimensionales Versuchslayout.

5.1.2 Granulozytenisolierung

Die für diese Arbeit entscheidenden Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten können sowohl qualitativ im Sinne einer Änderung ihres Aktivitätszustandes, als auch quantitativ im Sinne ihrer Expressionsdichte im Verlauf der Durchführung des Experiments unspezifisch beeinflusst werden. Diese Abweichungen können eine Änderung der Reaktionsfähigkeit der Zellen in in-vitro-Experimenten zur Folge haben, was die Interpretation der Ergebnisse erschwert. Einflussfaktoren für die Abweichungen sind beispielsweise die Art der Zellisolation oder aber die Umgebungsbedingungen zum Versuchszeitpunkt. In Untersuchungen von *Kuijpers, TW., et al. 1991* und *Forsyth, KD., and Levinsky, RJ. 1990* konnte gezeigt werden, dass die β_2 -Integrinexpression abhängig ist von den experimentellen Bedingungen und von der Art der Zellisolation. Demnach ist die β_2 -Integrinexpression auf zirkulierenden Blutneutrophilen geringer als nach in-vitro-Experimenten in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen. Die Expression von CD11b auf den Neutrophilen spiegelt aber eher den Aktivitätszustand als die Adhäsionsfunktion der Zelle wieder (*Rebuck, N. and Finn, A. 1994*).

Mit dem Wissen um diese Einflussfaktoren führten wir die Granulozytenisolation so schonend wie möglich durch. Das Ziel war es jegliche physikalische, chemische, mechanische oder thermische Reizung der Zellen zu vermeiden. Die sicherlich schonendste Methode unter Verwendung von Vollblut mit dem Vorteil, die Funktion der Granulozyten am wenigsten zu beeinflussen (*Macey, MG. and McCarthy, DA. 1993; Rebuck, N. and Finn, A. 1994*), war in unserem Assay aus folgenden Gründen nicht durchführbar. Sowohl die Zellquantifizierung mit der Neubauer-Zählkammer als auch die Auswertung der Adhäsion der Neutrophilen wurde durch die störenden Effekte insbesondere der Erythrozyten nahezu unmöglich. Aus eben diesen Gründen wurde auch in der anschließenden FACS-Analyse auf die Verwendung von Vollblut verzichtet.

Die Translokationen jeglicher Zellen, ob Suspension oder Konzentrat, erfolgte im Verlauf des gesamten Versuchs immer unter größter Sorgfalt und Vermeidung mechanischer Provokation. Da die Bindung der Granulozyten an die Keratinozyten ein energieabhängiger Prozess ist (*Kishimoto, TK., et al. 1989*) und die Adhäsion auch von der Temperatur der Zellsuspension abhängt (*Bloemen, PGM., et al. 1996*) wurden die Versuche ständig unter Raumtemperatur und die Inkubationsvorgänge bei 37°C durchgeführt. Ebenso konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass ein zwischenzeitliches Abkühlen der Granulozytensuspension auf 4°C gefolgt von

einem erneuten Anwärmen auf 37°C in einer verminderten Integrinexpression resultiert (*Forsyth, KD. and Levinsky, RJ. 1990; Sengelov, H., et al. 1993*).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Experimente mit größter Sorgfalt durchgeführt wurden, um unspezifische Einflüsse auf die Granulozyten zu verhindern.

5.1.3 Therapeutische und experimentelle Cyclosporin A-Konzentration und Inkubationszeiten

Die gewählten Wirkstoffkonzentrationen waren das Ergebnis einer ausführlichen Literaturrecherche. Wir orientierten uns dabei u. a. an den Serumkonzentrationen aus der Arbeit von *Mahrle, G. und Schulze, H.-J. (1990)*, von 240 – 1220 ng/ml bei einer Applikationsdosis von 14 mg/kg/d für sieben Tage. Bei dieser Dosis handelt es sich aber um eine sehr hohe Dosis. Daher wurden die Experimente in einer Konzentrationsbreite von 0,12 ng/ml bis 1200ng/ml durchgeführt. Dies auch deswegen, weil im dermatologischen Sektor wesentlich geringere Dosen im Bereich von 2 bis 7 mg/kg/d appliziert werden. Für diese Dosierung beträgt die Blutkonzentration ungefähr 50 bis 150 ng/ml (*Kauvar, AB., Stiller, MJ., 1994*). Insofern wurden oberhalb als auch unterhalb der therapeutischen Blutkonzentrationen die Cyclosporin A-Effekte untersucht, so dass von einer biologisch-klinischen Relevanz auszugehen ist.

Für die Inkubationszeiten ergab die Literaturrecherche Inkubationsintervalle zwischen 5 bis 15 Minuten. In unseren Versuchen wählten wir eine Vorinkubation von 15 Minuten. Kontrollversuche sowohl mit kürzeren als auch mit längeren Zeitspannen zeigten aber identische Ergebnisse (Daten nicht im Detail gezeigt).

5.2 Mögliche Wirkmechanismen von Cyclosporin A

5.2.1 Allgemeiner Teil

Cyclosporin A ist eine Substanz mit immunsuppressivem Effekt auf humoraler und zellulärer Ebene, die u. a. nach Organtransplantationen und bei Autoimmunerkrankungen erfolgreich eingesetzt wird. Im Fach der Dermatologie wird sie für die Behandlung von Psoriasis, Behçet-Syndrom, atopisches Ekzem, bullöses Pemphigoid/Pemphigus vulgaris und weiteren erfolgreich eingesetzt. Über den Wirkmechanismus bei o. g. Erkrankungen ist noch wenig bekannt. Wohingegen der

Wirkmechanismus, der die Transplantatabstoßung verhindert, detailliert aufgezeigt werden konnte (siehe Kapitel 2.1.2).

Im Folgenden sollen vor dem Hintergrund einer gründlichen Literaturrecherche, die Beobachtungen und Versuchsergebnisse kritisch diskutiert bzw. Hypothesen oder Erklärungen für die Beobachtungen gefunden werden.

Ausgangshypothese für unseren experimentellen Ansatz war der Gedanke, dass Cyclosporin A in einen zentralen Punkt der Pathogenese neutrophiler Dermatosen eingreift.

In unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass die mit $\text{TNF-}\alpha$ aktivierten Granulozyten in ihrer Adhäsion an humane Epidermis durch 15 minütige Vorinkubation mit Cyclosporin A dosisabhängig gehemmt werden konnten. Allerdings geschieht dies ohne eine Änderung der Oberflächenkonzentration des Integrins CD11b/CD18, welches als wesentlich angesehen wird (*Driesch, P. v. d. 1993*).

Der bekannte Wirkmechanismus in T-Zellen über den Schlüsselschritt der Hemmung von Calcineurin und somit einer verminderten Dephosphorylierung und Translokation des NFAT in den Zellkern mit der Folge, dass verschiedenste Translokationsprodukte (z. B. IL-2) nicht gebildet werden, können die von uns objektivierten Ergebnisse nicht schlüssig erklären.

5.2.2 Möglicher Einfluss auf die Qualität der Adhäsion

Da sich das Bindungsverhalten sowohl inaktiver als auch aktivierter Neutrophiler nicht durch einen isolierten Interaktionsmechanismus beschreiben lässt, sondern sich als komplexes Zusammenspiel zahlreicher Reaktionen darstellt, kann in dieser Arbeit nur auf wenige vorstellbare Einflussgrößen Bezug genommen werden.

Für die Wirksamkeit von Cyclosporin A ist von entscheidender Bedeutung, daß es zum einen die Bindung der Neutrophilen in der Epidermis verhindert. Auf der anderen Seite werden aber die anderen physiologischen Funktionen der Neutrophilen bezogen auf Ihre ursprüngliche Bestimmung nicht beeinflusst. So konnten *Weinbaum D. L. et al. (1983)* und *Kharzami A. et al. (1985)* zeigen, dass die Phagozytoseaktivität, die Chemotaxis und die intrazelluläre Keimtötung von Granulozyten nicht durch therapeutische Cyclosporin A-Konzentrationen gehemmt werden. Dies ist von immenser Wichtigkeit insbesondere bei den dermatologischen nicht vitalen Indikationen bei denen Cyclosporin A zu Einsatz kommt. Denn anderenfalls würde eine Immunsuppression vorherrschen, die den Patienten anfällig macht für lebensbedrohliche infektiöse Komplikationen. Würde die Rezeptordichte von CD11b abnehmen, wäre davon auszugehen, daß das Verlassen von Gefäßen,

Chemotaxis, Phagozytose und Bakterizidie nur unzureichend für Neutrophile möglich wäre. Da die oben genannten granulozytären Funktionen u. a. wesentlich durch MAC-1 (CD11b/CD18) vermittelt werden, können unsere Ergebnisse durch die genannten Publikationen bestätigt werden. Und auch *Janco R. L. und English D. (1983)* konnten ebendies zeigen und postulieren für Cyclosporin A, daß es „keine widrigen Einflüsse auf die wichtigen Grundpfeiler des antimikrobiellen Abwehrsystems der Neutrophilen hat“.

Für die Durchführung unserer Untersuchungen von großer Bedeutung ist die Behandlung der Granulozyten nach möglichst realistischen Bedingungen. Dies ist insofern wichtig, als daß *Goto Y. et. al. 2000* beschreiben, daß gerade in den vorhergegangenen Jahren die Untersuchungen zur Wirkweise von Cyclosporin A oft mit „ungeprimten“ Granulozyten durchgeführt wurden. Dies resultierte in fehlenden Wirkungsnachweisen oder Wirknachweisen erst bei sehr hohen Cyclosporin A-Konzentrationen, wobei in diesen Fällen von direkten zytotoxischen Mechanismen auszugehen ist. So versuchten *Chiara et. al. 1991* erfolglos mit Cyclosporin A-Konzentrationen bis zu 1mg/ml (entspricht ca. 1mM) die PMA stimulierte O_2^- Bildung von ungeprimten Neutrophilen zu hemmen. Als ein idealer „Primer“ wird von *Goto* TNF- α oder auch andere Zytokine empfohlen, da die Granulozyten auf dem Weg ins entzündete Gewebe diesen Substanzen begegnen und von ihnen aktiviert werden. Die oben genannte Arbeitsgruppe um Goto konnte bei nicht TNF- α aktivierten Granulozyten eine signifikante Hemmung von fMLP-stimulierter O_2^- Bildung erst bei einer Cyclosporin A-Konzentration von 1 μ M nachweisen. Da dies eine supratherapeutische Dosis ist kann ein direkt zytotoxischer Effekt angenommen werden. Wurden die Neutrophilen aber vorher mit TNF- α aktiviert („geprimt“), so ergibt sich eine dosisabhängige logarithmische Hemmung der Superoxidradikalproduktion für die gemessenen Konzentrationen zwischen 1nM bis 1 μ M. Dieses Ergebnis kann für die gleichen Konzentrationsstufen im Adhäsionsassay von uns reproduziert werden. Ebenso können wir die enorme Wichtigkeit und Wirkung von TNF- α in unseren FACS-Versuchen aufzeigen.

In neueren Arbeiten zum biochemischen Verständnis der Interaktion zwischen Cyclosporin A und Neutrophilen untersuchen *Spisani et. al. 2001* verschiedene Funktionen Neutrophiler. Hierbei werden im Wesentlichen die bekannten und oben genannten Ergebnisse reproduziert. Die Beweglichkeit der Neutrophilen wird nicht durch Cyclosporin A gehemmt oder gefördert, die fMLP stimulierte O_2^- Bildung Neutrophiler wird dosisabhängig gehemmt ebenso auch die fMLP-stimulierte Exozytose spezifischer Granula. Dies geschieht zudem auch zeitabhängig. Allerdings

hat Cyclosporin A in therapeutischen Dosierungen keinen hemmenden oder fördernden Effekt auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration; weder bei aktivierten noch bei unaktivierten Neutrophilen. Ein anderes Ergebnis würde auch sämtlichen oben genannten Publikationen und den darin gemachten Beobachtungen widersprechen. Denn eine Änderung des Kalziumspiegels der Zelle hätte weitreichende Funktionsstörungen zur Konsequenz, so daß eine normale Abwehrfunktion nicht mehr von den Neutrophilen zu erwarten wäre. Und dies wurde wie oben beschrieben mehrfach nachgewiesen. Auch nach Stimulation der Neutrophilen mit fMLP und konsekutiver Degranulation lässt sich durch Cyclosporin A keine Änderung des intrazellulären Kalziumspiegels erreichen.

Auch die Arbeitsgruppe um *Scavuzzo, Mw., et al., (2001)* konnte in Ihren Versuchen keine Konzentrationsabnahme der Oberflächendichte von CD11a,b,c nachweisen. Getestet wurde dies mit Cyclosporin A-Konzentrationen, die im therapeutischen Bereich liegen. Und die Aktivierung der Zellen wurde, wie schon in vielen anderen Arbeiten, mit fMLP durchgeführt. Auch in der o. g. Arbeit wird auf die Tatsache hingewiesen, daß eine normale Granulozytenfunktionalität durch Cyclosporin A nicht vermindert wird. Demzufolge erklärt das Ergebnis die klinische Erfahrung. Die weiteren untersuchten granulozytären Funktionen/Eigenschaften unter dem Einfluß von Cyclosporin erbrachten keine neuen Erkenntnisse bzgl. molekularer Wirkungsmechanismen.

Insofern kann durch die gefundenen Arbeiten keine schlüssige Erklärung für unsere Ergebnisse gefunden werden. In der oben genannten Arbeit werden zum einen Konformationsänderungen der Epitope der β_2 -Integrine insbesondere der α -Ketten vermutet. Zum anderen könnten Änderungen des Aggregationsstatus der Oberflächenmoleküle die erhaltenen Ergebnisse erklären. Auch eine direkte Einlagerung von Cyclosporin A in die Zellmembran wird von den Autoren in Betracht gezogen. Dadurch wird die Membranfunktion gestört, was sich in einer gestörten oder veränderten zellulären Aktivierung niederschlägt.

Weitere Wirkungsweisen ergeben sich aus der Arbeit von *Siemann, G., et al. (1999)*, die festgestellt haben, dass die Zielstrukturen in nicht spezifischen Immunzellen mit großer Wahrscheinlichkeit von denen in z. B. T-Lymphozyten differieren. In der oben genannten Arbeit wurde gezeigt, dass Cyclosporin A konzentrationsabhängig die CRE-vermittelte (cAMP-responsive-element) Transkription von Genen hemmt nach Aktivierung der entsprechenden Zelle. Eine basale Gentranskriptionsaktivität in nicht aktivierten Zellen wird durch Cyclosporin A nicht vermindert. Bezogen auf neutrophile Granulozyten kann man mutmaßen, dass

es im Rahmen der Entzündungsreaktion zu einer Aktivierung der Zelle kommt mit nachfolgender negativer Beeinflussung der Adhäsivität durch Cyclosporin A-Wirkung über Hemmung der CRE-vermittelten Transkription.

Ebenso beschreiben *Rühlmann, A. und Nordheim, A. (1997)*, dass es sich bei der Calcineurinhemmung nicht um den einzigen Wirkmechanismus von Cyclosporin A handelt, sondern dass „viele andere Gene identifiziert wurden, deren Transkriptionskontrolle von Immunsuppressiva beeinflusst wird, ohne dass eine Verknüpfung mit NFAT gezeigt werden konnte“. Um welche Art von Interaktionen es sich handeln könnte, ist im vorigen Absatz beschrieben (z. B. Hemmung einer CRE-vermittelten Transkription). Außerdem sei NFAT nicht das einzige Substrat von Calcineurin, so dass auch dieser Weg Erklärungen liefern könnte, um den Wirkmechanismus weiter aufzuklären. Auch auf die in Absatz 2.1.2 beschriebene Hemmung der Peptidyl-Prolyl-Cis-Trans-Isomerase-Aktivität der Cyclophiline durch Cyclosporin A wird in dieser Arbeit eingegangen. Dementsprechend ist die zelluläre Funktion abhängig von der Enzymwirkung, die verantwortliche zeichnet für korrekte Transferrinfaltung im Endoplasmatischen Retikulum und korrekte Faltung der Triple-Helix-Formation von Kollagenen. Da der Granulozyt der erste Feind des Pilzes ist, muß dieser Abwehrstrategien erfinden, um sich der Vernichtung zu entziehen. Eine Hemmung dieser Enzymfunktion hätte für einen Pilz den Vorteil, dass die für sein Wachstum erforderliche Menge an essentiellern Eisen (Fe) nicht von Transferrin gebunden würde.

Allen zitierten Arbeiten, egal ob aus der jüngeren oder älteren Vergangenheit, ist gemeinsam, daß kein Wirkmechanismus gefunden werden kann, der die erhobenen Ergebnisse schlüssig erklärt. Insofern wird von allen Autoren und auch uns gefordert, daß weitere Studien und Experimente durchgeführt werden, um dem Wirkmechanismus von Cyclosporin A in Neutrophilen auf den Grund zu gehen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen von neutrophilen Dermatosen kommt es durch Chemotaxine bedingt zur Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und anderen Entzündungszellen in die oberen Gewebeschichten der Haut. Diese chemotaxinbedingte Entzündungsreaktion ist nicht durch korpuskuläre Erreger (z. B. Bakterien, Viren) bedingt sondern erfolgt nach heutigem Kenntnisstand aufgrund chemotaktischer Gradienten. Das Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss von Cyclosporin A, das erfolgreich in der Therapie neutrophiler Dermatosen eingesetzt wird, zu untersuchen. Im Fokus unserer Untersuchungen stand die Adhäsionsfähigkeit der Neutrophilen an Korneozyten von Epidermisschnitten und deren CD11b-Expression.

Der Versuchsablauf wurde so gestaltet, dass im Rahmen der experimentellen Bedingungen eine Entzündungsreaktion simuliert wurde. Dazu wurden die Hautpräparate mit IFN- γ vorinkubiert. Die mit TNF- α und Cyclosporin A vorinkubierten Granulozyten wurden daraufhin über die Epidermisschnitte verteilt, um eine Bindungsreaktion hervorzurufen. Nach Anfärbung der Gewebeschnitte mit Toluidinblau wurden die gebundenen Granulozyten mittels eines im Strahlengang eines Lichtmikroskops eingebrachten Zählrasters ausgewertet. Wir verwendeten Cyclosporin A-Konzentrationen von 1200ng/ml bis 0,12 ng/ml. Im Anschluss an den Adhäsionsassay untersuchten wir in einer FACS-Analyse mittels fluoreszierender Antikörper gegen CD11b die Dichte dieser Rezeptoren auf den Granulozyten unter dem Einfluss oben genannter Cyclosporin –Konzentrationen.

Wir konnten in den Versuchen nachweisen, dass Cyclosporin A konzentrationsabhängig die Adhäsion neutrophiler Granulozyten an humanen Epidermisschnitten zu hemmen vermag. Diese Hemmung ist allerdings nicht auf eine Reduktion der CD11b-Rezeptordichte auf den Neutrophilen zurückzuführen.

Es ist wahrscheinlich, dass bei der Bindungsvermittlung im Rahmen der Entzündungsreaktion mehr als nur ein Rezeptorsystem beteiligt ist. Insofern darf man sich bei der Suche nach der Wirkweise nicht fehlleiten lassen und bekannte Wirkmechanismen alleine betrachten. Das genaue Zusammenspiel und die Ebene der Induktion durch Cyclosporin A sind noch ungeklärt und bedürfen weiterer Experimente und Untersuchungen.

7. ABKÜRZUNGEN

ADCC	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
Ak	Antikörper
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti Alkalische Phosphatase
ARDS	adult respiratory distress syndrome
CAD	common antibody diluent
CAM	cellular adhesion molecule
CD	Cluster of differentiation
CRE	cAMP-responsive-element
CR	Komplementrezeptor
CsA	Cyclosporin A
CyA	Cyclosporin A
DAG	Diacylglycerol
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
FACS	fluorescence-activated cell sorter
fMLP	formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	granulocyte/monocyte colony stimulating factor
Gp150/95	Glykoprotein
gp-170	Membranprotein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hanks balanced salt solution
HDL	high density lipoproteins
HLA	human leucocyte antigen
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP ₃	Inositoltriphosphat
kD	Kilo Dalton

LFA	lymphocyte function antigen
LDL	low density lipoproteins
MAC-1	macrophage antigen-1
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NFAT	nuclear factor of activated thymocytes
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PAF	Platelet Activating Factor
PBS	phosphate buffered saline
PE	Probeexzision
O_2^-	Superoxidradikal
Raf-1	Enzym
Ras	Enzym
RGD	Aminosäuresequenz
TGF	transforming growth factor
T_H	T-Helfer-Lymphozyt
TNF	Tumor Nekrose Faktor
uPAR	Urokinaserezeptor
VLA	very late antigen

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Albelda, S., and Buck, CA., (1990). Integrins and other adhesion molecules. *FASEB Journal* 4, 2868 - 2880.
- Arnaout, MA., (1990). Structure and function of the leucocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* 75, 1037 – 1050.
- Barker, JNWN., Groves, RW., Allen, MH. and Mac Donald, DM. (1992). Peripheral adherence of T-lymphocytes and neutrophils to psoriatic epidermis. *Br J Dermatol* 127, 205 – 211.
- Bloemen, PGM., Van den Tweel, MC., Henricks, PAJ., Engels, F., Van de Velde, MJ., Blomjous, F. and Nijkamp, FP. (1996). Stimulation for both human bronchial epithelium and neutrophils is needed for maximal interactive adhesion. *Am J Physiol* 270, L80 – L87.
- Böhncke, W., Kellner, I., Konter, U. and Sterry, W. (1992). Differential expression of adhesion molecules on infiltrating cells in inflammatory dermatoses. *J Am Acad Dermatol* 26, 907 – 913.
- Borel, JF., Feurer, C., Gubler HU., Stahelin H (1976). Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 1976; 6(4), 468-75.
- Brynskov, J., Freund, L., Campanini, MC., Kampmann JP., (1992). Cyclosporin pharmacokinetics after intravenous and oral administration in patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1992 Nov; 27(11): 961-7.
- Chiara, MD., Foot, ABM., Sobrino, F. and Jones, OTG. (1991). Differential effect of cyclosporine A on respiratory burst by several types of human leukocytic cells. *Biochem Int* 1991 23: 1185 – 1193.
- Christophers, E. and Sterry, W., (1993). Psoriasis. In *Dermatology in General Medicine*, T. B. Fitzpatrick, A. Z. Eisen and K. Wolff, eds. (New York: Mc Graw Hill), pp 489 – 514.

- Cronstein, BN. and Weissman, G. (1993). The adhesion molecules of inflammation. *Arthr Rheum* 36, 147 – 157.
- De Panifilis, G., Soligo, D., Manara, GC., Ferrari, C., Torresani, C. (1989). Adhesion molecules on the plasma membrane of epidermal cells. I. Human resting Langerhans cells express two members of the adherence-promoting CD11/CD18 families, namely, H-MAC-1 (CD11b/CD18) and gp150/95 (CD11c/CD18). *J Invest Dermatol* 93, 60 – 69.
- Diamond, MS. and Springer, TA. (1993). A subpopulation of MAC-1 (CD11b/CD18) molecules mediate neutrophil adhesion to ICAM-1 and fibrinogen. *J Cell Biol* 120, 545 – 556.
- Driesch, P. v. d. (1993). Epidermotropic neutrophilic granulocytes express MAC-1 (CD11b/CD18) rather than LFA-1 (CD11a/CD18). *Arch Dermatol Res* 285, 444 – 446.
- Driesch, P. v. d. , Weller, M. and Wörl, P. (1997). Adhesion of neutrophils to epidermal cells: prerequisites for and blocking by CD11b antibodies. *Arch of Dermatol Res* 289, 692-697.
- Driesch, P. v. d., (1992). Zelluläre Adhäsionsmoleküle und ihre Bedeutung für die Dermatologie. Eine Zwischenbilanz. *Zentralblatt für Haut- und Geschlechtskrankheiten* 159, 723-736.
- Dustin, ML., Singer, KH., Tuck, DT. and Springer, TA. (1988). Adhesion to T lymphoblasts to epidermal keratinocytes is regulated by interferon- γ and is mediated by intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). *J Exp Med* 167, 1323 – 1340.
- Fahr, A., (1993). Cyclosporin clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 1993, 24 (6): 472-495.

- Faulds, D., Goa, KL. and Benfield P., (1993), Cyclosporin, A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunoregulatory disorders, *Drugs* 45 (6): 953 – 1040.
- Flechner, SM., Katz, AR. Rogers, AJ., Van Buren, C, Kahan, BD, (1985). The presence of cyclosporine in body tissues and fluids during pregnancy. *Am J Kidney Dis* 1985 Jan; 5(1): 60-3.
- Forsyth, KD. and Levinsky, RJ. (1990). Preparative procedures of cooling and re-warming increase leucocyte integrin expression and function on neutrophils. *J Immunol Meth* 128: 159 – 163.
- Goto, Y., Kono, T., Ishii, M. und Sato, EF (2000). Suppressive Effects of Cyclosporin A and FK-506 on Superoxide Generation in Human Polymorphnuclear Leukocytes Primed by Tumor Necrosis Factor α . *J Invest Dermatol* 115 (6): 986 – 989.
- Griffiths, CEM., Voorhees, JJ. and Nickoloff, BJ. (1989). Characterization of ICAM-1 and HLA-DR expression in normal and inflamed skin: modulation by recombinant γ -interferon and tumor necrosis factor. *J Am Dermatol* 20, 617 – 629.
- Hunyadi, J., Simon, M., Jr. and Dobozy, A. (1992). Immune-associated surface markers of human keratinocytes. *Immunol Letters* 31, 209 – 216.
- Janco, RL. und English D. (1983). Cyclosporine and Human Neutrophil Function. *Transplantation* 35 (5): 501 – 503.
- Kauvar, AB., Stiller, MJ., (1994). Cyclosporine in Dermatology: Pharmycology and clinical use. *International Journal of Dermatology*, Vol. 33, (2) 1994, 86-92.
- Kharzami, A., Svenson, M., Nielsen, H und Birgens, HS. (1985). Effect of Cyclosporin A on Human Neutrophil and Monocyte Function. *Scan. J. Immunol.* 21, 585 – 591.

- Kishimoto, TK., Larson, RS., Corbi, AL., Dustin ML., Staunton, DE., and Springer, TA., (1989). The leucocyte integrins. *Adv Immunol* 46, 149 – 181.
- Klebanoff, SJ., Olszowski, SO., Van Voorhis, WC., Ledbetter, JA., Waltersdorff, AM. and Schlechte, KG. (1992). Effects of γ -interferon on human neutrophils: protection from deterioration on storage. *Blood* 80, 225 – 234.
- Kondo, S. and Sauder, DN. (1997). Tumor necrosis factor (TNF) receptor type I (p55) is a main mediator for TNF- α -induced skin inflammation. *Eur J Immunol* 27, 1713 – 1718.
- Kuipers, TW., Tool, ATJ., von der Schoot, CE., Ginsely, LA., Onderwater, JJM., Roos, D. and Verhoeven, AJ. (1991). Membrane surface antigen expression on neutrophils: A reappraisal of the use of surface markers for neutrophil activation. *Blood* 78, 1105 – 1111.
- Lange Wantzin, G., Ralfkiaer, E., Lisby, S. and Rothlein, R. (1988). The role of intercellular adhesion molecules in inflammatory skin reactions. *Br J Dermatol* 119, 141 – 145.
- Larrick, JW., Graham, D., Toy, K., Lin, LS., Senyk, G. and Fendly, BM. (1987). Recombinant tumor necrosis factor causes activation of human granulocytes. *Blood* 69, 640 – 644.
- Limb, GA., Hamblin, AS., Wolstencraft, RA. and Dumonde, DC. (1991). Selective up-regulation of human granulocyte integrins and complement receptor I by cytokines. *Immunol* 74, 696 – 702.
- Macey, MG. and McCarthy, DA. (1993). A simple flow cytometric procedure for the determination of surface antigens on unfixed leucocytes in whole blood. *J Immunol Methods* 163, 155 – 160.
- Mahrle, G., Schulze, H.-J. (1990), Cyclosporin A – Dermatologic Indications. *Z Hautkr* 1990 Jan, 65 (1), 28 – 39.

- May, AE., Kanse, SM., Lund, LR., Gisler, RH., Imhof, BA. and Preissner, KT. (1998). Urokinase receptor (CD87) regulates leukocyte recruitment via β_2 -integrins in vivo. *J Exp Med* 188 (6), 1029 – 37.
- Merrill, JT., Slade, SG., Weissmann, G., Winchester, R. and Buyon, JP., (1990). Two different pathways of CD11b/CD18-mediated neutrophil aggregation with different involvement of protein kinase C-dependent phosphorylation. *J Immunol* 145, 2608 – 2615.
- Naccache, PH., Jean, N., Liao, NW., Bator, JM., McColl, SR. and Kubes, P. (1994). Regulation of stimulated integrin surface expression in human neutrophils by tyrosin phosphorylation. *Blood* 84, 616 – 624.
- Nickoloff, BJ., Lewinsohn, DM. and Butcher, EC, (1987). Enhanced binding of peripheral blood mononuclear leucocytes to γ -interferon-treated keratinocytes. *Am J Dermatopathol* 9, 413 – 418.
- Philipps, MR., Buyon, JP., Winchester, R., Weissmann, G. and Abramson, SB. (1988). Upregulation of the C3bi receptor (CR3) is neither necessary nor sufficient to promote neutrophil aggregation. *J Clin Invest* 82, 495 – 501.
- Rebeck, N. and Finn, A. (1994). Polymorphnuclear granulocyte expression of CD11a/CD18, CD11b/CD18 and L-selectin in normal individuals. *FEMS Immunol Med Microbiol* 8, 189 – 196.
- Richter, J. and Zetterberg, E. (1994). L-selectin mediates downregulation of neutrophil TNF receptors. *J Leucoc Biol* 56, 525 – 527.
- Rothlein, R., Czajkowski, M., O'Neill, MM., Marvin, SD., Mainolfi, E. and Merluzzi, VJ. (1988). Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary and continuous cell lines by pro-inflammatory cytokines. *J Immunol* 141, 1665 – 1669.

- Rühlmann, A. and Nordheim, A. (1997). Effects of the immunosuppressive drug CsA and FK506 on intracellular signalling and gene regulation. *Immunobiol* 198, 192 – 206.
- Ryffel, B., (1991), Pharmacology of Ciclosporin, *Z Hautkr* 66 (Suppl.) 11 – 14.
- Scavuzzo, M., Sagripanti, A., Mosca, F und Ambrogi, F. (2001). Modulation of β_2 integrin phenotype, adhesion, chemotaxis and oxidative burst of neutrophils by cyclosporine. *Biomed Pharmacother* 2001; 55: 61 – 9.
- Schlich, T., (2000), The history of organ transplantation in the mirror of the DMW, *Dtsch Med Wochenschr* 2000 Jul 7;125(27):847-8.
- Schroeder, F., Herzig, S., (1998), Cyclosporin, *Dtsch Med Wochenschr* 1998 Jan 30;123(5):121-2.
- Sengelov, H., Kjeldsen, L., Diamond, MS., Springer, TA. And Borregaard ,N. (1993). Subcellular localization and dynamics of Mac-1 ($\alpha_M \beta_2$) in human neutrophils. *J Clin Invest* 92(3), 1467 – 1476.
- Sicherheitsdatenblatt der Firma Novartis, (1998), Ausgabedatum 16.09.1998.
- Siemann, G., Blume, R., Grapentin, D., Oetjen, E., Schwaninger, M. and Knepel, W. (1999). Inhibition of cyclic AMP response element-binding protein/cyclic AMP response element-mediated transcription by the immunosuppressive drug cyclosporin A and FK 506 depends on the promoter context. *Mol Pharm* 55, 1094 – 1100.
- Simon, DI., Rao, NK., XU, H., Wie, Y., Majdic, O., Ronne, E., Kobzik, L. and Chapman, HA. (1996). MAC-1 (CD11b/CD18) and the urokinase receptor (CD87) form a functional unit on monocytic cells. *Blood* 88 (8), 3185 – 94.
- Spisani, S., Fabbri, E., Muccinelli, M., Cariani, A., Barbin, L., Trotta, F. Und Dovigo, L. (2001). Inhibition of neutrophil responses by cyclosporin A. An insight into molecular mechanisms. *Rheumatology* 40, 794 – 800.

- Stacker, LA., and Springer, TA., (1991). Leucocyte integrine p150/95 (CD11b/CD18) functions as an adhesion molecule binding to a counter-receptor on stimulated endothelium. *J Immunol* 146, 648 – 55.
- Stamper, HB, Jr. and Woodruff, JJ. (1976). Lymphocyte homing into lymphnodes: in vitro demonstration of the selective affinity of recirculating lymphocytes for high-endothelial venules. *J Exp Med* 144, 828 – 833.
- Terui, T., Zhen, Y. X., Kato, T. and Tagami, H. (1995). Mechanism of human polymorphnuclear leucocyte adhesion to serum-treated corneocytes. *J Invest Dermatol* 104, 297 – 301.
- Thomsen AW. Cyclosporin. Mode of action and clinical application. Boston: Kluwer Academic Publisher; 1989 in Lüllmann, H., Mohr, K., *Pharmakologie und Toxikologie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 14. überarbeitete Auflage, S. 465-6.
- Tosi, MF., Stark, JM., Hamedani, A., Smith, EW., Gruenerts, DC. and Huang, YT. (1992). Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)-dependent and ICAM-1-independent adhesive interactions between polymorphnuclear leucocytes and human airway epithelial cells infected with parainfluenza virus type 2. *J Immunol* 149, 3345 – 3349.
- Vedder, NB. and Harlan, JM. (1988). Increased surface expression of CD11b/CD18 (MAC-1) is not required for stimulated neutrophil adherence to cultured endothelium. *J. Clin Invest* 81, 676 – 682.
- Venkataramanan, R., Koneru, B., Wang, CC., Burckart, GJ., Caritis, SN., Starzl TE., (1988). Cyclosporine and its metabolites in mother and baby. *Transplantation* 1988 Sep; 46(3): 468-9.
- Weinbaum, DL., Kaplan, SS., Zdziarski, U., Rinaldo CR., und Schroeder, KK. Human Polymorphnuclear Leukocyte Interaction with Cyclosporin A. *Infection and Immunity* 43 (3), 791 – 794, 1984.

- Zhou, I., Lee, DHS., Plescia, J., Lau, CY. and Altieri, DC. (1994). Differential ligand binding specificities of recombinant CD11b/CD18 integrin I-domain. *J Biol Chem* 269, 17075 – 17079.

9. DANKSAGUNG

Frau Prof. Dr. med. I. Moll danke ich für dafür, dass Sie es mir ermöglicht hat, diese Arbeit in Ihrer Klinik für Dermatologie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. med. P. von den Driesch danke ich für freundliche Bereitstellung und Überlassung des Themas dieser Arbeit. Außerdem möchte ich mich für die kontinuierliche Unterstützung, und die Tatsache die Arbeit unter seiner Betreuung durchführen zu können, bedanken.

Frau B. Mähnß und Frau G. Finger danke ich für die persönliche Betreuung über den gesamten Zeitraum der Arbeit. Sie leisteten uns herausragende Hilfestellung vor allem in organisatorischen und technischen Fragen. Sie standen uns mit Rat und Tat jederzeit zur Seite, insbesondere zur Zeit der Untersuchungen aber auch während der Auswertung der Ergebnisse und der Phase der Diskussion der Arbeit.

Meinen Eltern, meiner Schwiegermutter, meiner Frau und meinen Kindern möchte ich danken, da es ohne ihre Unterstützung mir wohl kaum möglich gewesen wäre, sowohl diese Arbeit als auch das Medizinstudium als solches in dieser Form durchzuführen.

10. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:

10. LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE ANGABEN

- Name: Daniel Vornhusen
- Adresse: Finkenstr. 32, 49377 Vechta
- Geburtsdatum: 17. November 1975
- Geburtsort: Vechta
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Konfession: röm.-kath.
- Eltern: Werner Vornhusen, Bewährungshelfer
Dorothea Vornhusen, Pastoralreferentin
- Geschwister: Tobias Vornhusen
Judith Vornhusen
- Familienstand: verheiratet mit Stephanie Vornhusen (geb. Tadday)
- Kinder: Noah Daniel Vornhusen
Geburtsdatum: 24. Januar 2001
Leni Christina Vornhusen
Geburtsdatum: 27. Juni 2005

AUSBILDUNG

- | | |
|--|--|
| ▪ 12/2003 – heute | Facharztausbildung: Evangelisches Krankenhaus Oldenburg bei Prof. Volling in der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde/Kopf-/Halschirurgie |
| ▪ WS 2002 – SS 2003 | Praktisches Jahr: Evangelisches Krankenhaus Oldenburg, Wahlfach: HNO |
| ▪ WS 2002 – SS2003
SS 2003 | Studium der Humanmedizin in Göttingen
3. Staatsexamen |
| ▪ SS 1997 – SS 2002
SS 2002
WS 2000
WS 1999 | Studium der Humanmedizin in Hamburg
2. Staatsexamen
1. Staatsexamen
Ärztliche Vorprüfung |
| ▪ 1995 – 1996 | Zivildienst St. Marienhospital, Vechta |
| ▪ 1986 – 1995 | Kolleg St. Thomas, Vechta
Abschluss: allg. Hochschulreife |
| ▪ 1982 – 1986 | Alexanderschule Vechta |

Ort, Datum:

Unterschrift: