

Aus dem Kopf- und Hautzentrum des
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie

Direktorin
Prof. Dr. Ingrid Moll

**Bestimmung von Adhaesionsmolekülen
(sE-Selektin, sICAM-1, sVCAM-1) und Wachstumsfaktoren (IGF-1, IGR-
1R und hGH) und ihr Einfluß auf die Alterung des Immunsystems**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Hülya Acar
aus Hamburg

Hamburg, 2007

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 13.02.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuß, der/die Vorsitzende: PD Dr. E. Coors

Prüfungsausschuß: 2. Gutachter/in: PD Dr. K. Foitzik

Prüfungsausschuß: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. H. Beck

INHALTSVERZEICHNIS

1. AUSGANGSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG.....	1
2. EINLEITUNG	2
2.1 ALTERUNG DES IMMUNSYSTEMS: IMMUNOSENESZENZ.....	2
2.1.1 Angeborene und erworbene Immunität	3
2.1.2 B-Lymphozyten.....	4
2.1.3 T-Lymphozyten	5
2.1.4 Der T-Zellrezeptor und CD3-Proteinkomplex.....	6
2.2 KOSTIMULATORISCHE REZEPTOREN	9
2.2.1 CD28+ T- Lymphozyten	9
2.2.2 Cutaneous Lymphocyte Antigen (CLA)	11
2.3 DAS KUTANE IMMUNSYSTEM	11
2.3.1 Alterungsbedingte Veränderungen des kutanen Immunsystems	13
2.3.2 Die Migration von Lymphozyten	14
2.4 ZELLULÄRE ADHÄSIONSMOLEKÜLE.....	14
2.4.1 Die Zelladhäsionskaskade.....	16
2.4.2 E-Selektin (CD 62 E), s(souble)E-Selektin und seine Liganden (z.B.CLA).....	18
2.4.3 Immunglobulinsuperfamilie	19
2.4.4 ICAM-1.....	20
2.4.5 VCAM-1	21
2.5 ALLGEMEINE GRUNDLAGEN DER INTERZELLULÄREN SIGNALÜBERTRAGEUNG	22
2.5.1 Wachstumshormon (GH), IGF-1	22
2.5.2 Das IGF1-System	23
2.5.3 IGF1 Ligand.....	24
2.5.4 IGF-1- Rezeptor	25
2.5.5 Staphylokokken Superantigene (SEB)	26
3. MATERIAL UND METHODEN	28
3.1 VERWENDETE CHEMIKALIEN, REAGENZIEN UND LÖSUNGSMITTEL	28
3.1.1 Verwendete Pufferlösungen.....	29
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	29
3.1.3 Geräte.....	30
3.2 BLUTSPENDERKOLLEKTIVE.....	30
3.2.1 Blutspenderkollektive zur Bestimmung der Adhäsionsmoleküle mittels ELISA	30
3.2.2 Blutspenderkollektive zur Isolierung von peripheren mononukleären Zellen	31
3.3 DER ENZYMIMMUNOASSAY	31
3.3.1 Prinzip des Enzymimmunoassays.....	31
3.3.2 Die Bestimmung von sE-Selectin im Plasma.....	32
3.3.3 Die Bestimmung von sICAM-1 im Plasma	32
3.3.4 Die Bestimmung von sVCAM-1 im Plasma.....	33
3.3.5 Die Bestimmung von IGF-1 im Plasma.....	33
3.3.6 Die Bestimmung von hGH im Plasma	34
3.4 PRÄPARATION VON ZELLEN AUS HUMANEM VOLLBLUT	34
3.4.1 Präparation von mononukleären Blutzellen.....	34
3.4.2 Zellzählung.....	35
3.5 STIMULATION VON PBMC MIT SEB UND IGF-1	36
3.6 DURCHFLUßZYTOMETRIE	37
3.6.1 Grundlagen der Durchflußzytometrie	37
3.6.2 Färbung der Oberflächenmarker an isolierten PBMC	39
3.6.3 Färbung der Oberflächenmarker (an stimulierten PBMC).....	40
3.6.4 Messung mit dem Durchflußzytometer	40
3.7 STATISTISCHE ANALYSE	41
4. ERGEBNISSE	42
4.1 ERGEBNISSE DER MEDIATORBESTIMMUNG IM PLASMA	42

4.1.1	Plasmaspiegel von sE-Selektin.....	42
4.1.2	Plasmaspiegel von sICAM-1	43
4.1.3	Plasmaspiegel von sVCAM-1	44
4.1.4	Plasmaspiegel von IGF-1.....	45
4.1.5	Plasmaspiegel von hGH.....	46
4.2	VERÄNDERUNG DER OBERFLÄCHENMARKER BEI STIMULIERTEN PBMC.....	47
4.2.1	Veränderung der Oberflächenmarker CD3/CD28 durch Stimulation	48
4.2.2	Veränderung der Oberflächenmarker CD3/IGF-R durch Stimulation.....	49
4.2.3	Veränderung der Oberflächenmarker CLA/CD28 durch Stimulation.....	50
4.2.4	Veränderung der Oberflächenmarker CLA/IGF-R durch Stimulation.....	52
5.	DISKUSSION	53
5.1	DIE EXPRESSION DER ADHAESIONSMOLEKÜLE IM ALTER.....	53
5.2	IGF-1 UND hGH KONZENTRATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM ALTER	56
5.3	EXPRESSION VON OBERFLÄCHENMOLEKÜLEN AN PBMC DES KUTANEN UND DES ZIRKULIERENDEN IMMUNSYSTEMS IM ALTER NACH STIMULATION.....	59
5.3.1	Expression von CD28 im zirkulierenden und kutanen Immunsystem in Abhängigkeit vom Alter.....	59
5.3.2	IGF-1-R Expression im zirkulierenden und kutanen Immunsystem in Abhängigkeit vom Alter.....	62
6.	ZUSAMMENFASSUNG	65
7.	LITERATURVERZEICHNIS	67
8.	DANKSAGUNG.....	82
9.	LEBENS LAUF	84
10.	ERKLÄRUNG.....	85

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APZ	Antigen-präsentierende Zellen
CD	Cluster of Differentiation
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EGF	Epidermal Growth Faktor
ELAM-1	Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1
ELISA	Enzymimmunoassay
ESL-1	E-Selektin Ligand-1
EZ	Endothelzelle
FACS	Durchflußzytometrie
FCS	fetales Kälberserum
FSC	forward light scatter
GH	Growth Hormon
GHRH	Growth hormone releasing hormone
GHRH	Growth hormone releasing inhibiting hormone
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
ICAM-1	Interzelluläre Adhaesionsmolekül-1
IFN γ	Interferon- γ
IGF-1	Insulin-like-Growth-Faktor 1
IGFBP	Insulin-like-Growth-Faktor Bindungs Protein
IGSF	Immunglobulin - Superfamilie
IL-1	Interleukin -1
IL-6	Interleukin -6
ITAMs	Immunreceptor Tyrosine-based Activation Motivs
LT	Leukotriene
MAC-1	Makrophae antigen alpha pols peptide
MHC	Major Histocompatibility Complex
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PECAM-1	Platelet-Endothelial Cell Adhaesion Molecule-1
PSGL-1	P-selektin glykoprotein ligand-1
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
sICAM	soluble Intercellular Adhesion Molecule
sLeA	Sialyl-Lewis-A
sLeX	sialyl-Lewis-X
SSC	Side light scatter

Staph.	Staphylokokken
TCR	T-Zell-Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
WH	Wachstumshormon

1. AUSGANGSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

Mit dem Altern des Organismus verändert sich beim Menschen das Immunsystem. Eine Vielzahl von Faktoren ist bei diesen Veränderungen beteiligt.

Die Immunoseneszenz (lat., das Altern und die dadurch bedingten körperlichen Veränderungen) scheint für bestimmte Erkrankungen im Alter eine wichtige Rolle zu spielen. Insbesondere Infektionen, Autoimmunphänomene und maligne Erkrankungen treten häufiger auf. In diesen Prozessen scheint die Dysregulation der T-Zell Funktion von entscheidender Bedeutung zu sein. Diese Arbeit beschäftigt sich mit verschiedenen Fragestellungen zur Immunoseneszenz der zirkulierenden und kutanen T-Lymphozyten.

1. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Expression von Adhaesionsmolekülen und dem Altern?
2. Wie verändern sich die Serumwerte von Wachstumshormonen (hGH und IGF-1) mit zunehmendem Alter?
3. Unterscheidet sich die Expression der Oberflächenmarker CD28 und IGF-1-R auf T-Lymphozyten bei jungen und älteren Probanden?
4. Wie verändert sich die Funktion der kutanen und zirkulierenden T-Lymphozyten nach Stimulation mit SEB und IGF-1?

2. EINLEITUNG

2.1 Alterung des Immunsystems: Immunoseneszenz

Mit zunehmendem Alter erhöht sich die Morbidität und Mortalität des Menschen; die Infektanfälligkeit, die Häufigkeit von Autoimmunerkrankungen und Malignomen nimmt zu (Castle 2000).

Studien belegen einen gewissen Zusammenhang mit der Immunoseneszenz. So wird postuliert, dass Funktionsverluste des Immunsystems zu einer kürzeren Lebenserwartung und einer schlechteren Lebensqualität führen (Pawelec et al. 1998). In einem Tierversuch mit Mäusen, die genetisch auf eine hohe immunologische Reaktionsfähigkeit hin selektiert wurden, zeigte sich, dass diese länger leben und weniger Tumore entwickeln als solche, die eine niedrigere Reaktionsfähigkeit hatten (Franceschi u. Doria 1998).

In einer Schwedischen Longitudinalstudie wurden Daten von 102 Menschen zwischen dem 86. und dem 92. Lebensjahr gesammelt. Nach zwei Jahren waren nur noch 75 von ihnen am Leben. Im Vergleich dieser beiden Gruppen konnte beobachtet werden, dass die verstorbenen Probanden eine schlechtere T-Zellfunktion hatten. Sie zeigten einen höheren Anteil an zytotoxischen CD8-Zellen und einen niedrigeren Anteil an T-Helfer Zellen (CD4) (Pawelec et al. 1998). Die Altersveränderungen zeigen sich nicht einfach in einem definierten Immundefekt, sondern in einem Ungleichgewicht des Immunsystems. Vielfältige Faktoren sind für die schlechtere Immunlage im Alter verantwortlich. Einer der vielen Parameter ist die verminderte T-Zellfunktion (Pawelec et al. 1998). Diese Daten lassen vermuten, dass die gut erhaltene Funktion des Immunsystems mit Langlebigkeit assoziiert ist.

Die T-Zell Funktionen sind in älteren Individuen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* im Vergleich zu jüngeren Individuen verändert. Diese Veränderungen werden auch mit einer Verschlechterung der Funktion des Immunsystems gleichgesetzt. Die Immunoseneszenz kann aber auch in einigen Fällen ein Vorteil sein. Beispielsweise kommt es im Alter zu einer verminderten Abstoßungsreaktion nach Nieren- und Kornealtransplantationen (Pawelec u. Solana 1997).

Die Gesamtzahl der Lymphozyten im Alter ändert sich nur geringfügig. Es kommt eher zu quantitativen Umverteilungen der Lymphozyten-Subpopulationen. Im Vergleich zu jüngeren Menschen kommt es bei den älteren zu einer Vermehrung der Gedächtniszellen (CD45RO+) und zu einer Verringerung der naiven T-Zellen (CD45RA+). Auch die Zahl der B-Zell-Lymphozyten verringert sich. Die Zahl der natürlichen Killer-Zellen (CD16+) steigt wiederum an. Die Fähigkeit des Immunsystems auf neue Antigene zu reagieren, nimmt durch die Dominanz der Memory-Zellen im Alter ab, da diese nur an ihr spezifisches Antigen binden und nicht auf neue Antigene reagieren können.

Paradox erscheint jedoch, dass trotz abnehmender T-Zell Funktion, die Alterung nicht immer mit einer verminderten Immunreaktion einhergeht.

Autoimmunprozesse sind im höheren Alter stärker ausgeprägt. Es kommt zum altersabhängigen Anstieg von Autoantikörpern im Serum, die mit körpereigenem Gewebe reagieren und zu Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise dem bullösen Pemphigoid führen können (Klinmann u. K 1997).

Diese vielfältigen Ergebnisse zeigen, dass die Immunoseneszenz keine einfache Reduktion der Immunantwort ist sondern eher eine Umgestaltung des Immunsystems und seiner Zellen bzw. der Reaktionsfähigkeit auf Antigene.

2.1.1 Angeborene und erworbene Immunität

Zur Abwehr körperfremder Moleküle, Molekülverbände und Organismen steht ein umfangreiches Arsenal zur Verfügung, das sich in das unspezifische Abwehrsystem und das adaptive Immunsystem unterteilen lässt.

Für die Erstantwort des Organismus auf ein Pathogen ist das unspezifische, angeborene Abwehrsystem zuständig. Die wichtigsten zellulären Komponenten des unspezifischen Abwehrsystems sind die Granulozyten, Monozyten, Makrophagen sowie natürliche Killer (NK)-Zellen. Die wichtigsten humoralen Anteile dieses Systems werden aus dem Komplementsystem und den Akutphaseproteinen gebildet. Dieses System dient der Begrenzung der Infektion für einige Tage, bis die adaptierte Immunantwort einsetzt. Die natürliche Resistenz stellt sozusagen eine erste Abwehrlinie dar.

Die spezifische Immunität ist Bestandteil eines integrierten Systems, bei dem zahlreiche Zellen und Moleküle koordiniert miteinander funktionieren. Die Mechanismen der adaptiven Immunität führen zur Verstärkung und Verfeinerung der Resistenzfunktion. Eine wichtige Eigenschaft der spezifischen Immunität ist das immunologische Gedächtnis. Es ermöglicht die Wiedererkennung eines Antigens beim Zweitkontakt und führt dadurch zu einer effizienteren Stimulierung der Abwehrmechanismen gegen bekannte Antigene. Effektorzellen der adaptiven Immunität sind die Lymphozyten. Spezifische Antikörper stellen die Effektormoleküle der humoralen Komponente dieses Systems dar (siehe Tabelle 1) (Abbas et al. 1996; Koolman u. Röhm 1998; Löffler u. Petrides 1998).

Tabelle 1: Zellen des Immunsystems

Abwehr	Spezifisch	Unspezifisch
Zellulär	T-Lymphozyten (CD4-CD8-Zellen) B-Lymphozyten	Granulozyten Makrophagen NK-Zellen
Humoral	Immunglobuline	Komplementfaktoren Akutphaseproteine

Wie bereits erwähnt sind die Hauptzellen des spezifischen Immunsystems die Lymphozyten. Die Lymphozyten machen ca. 20-35 % der Leukozyten im Blut aus. Davon sind etwa 75% T-Lymphozyten und 15% B-Lymphozyten (Greten u. Schettler 2001; Bucher u. Wartenberg 1997).

2.1.2 B-Lymphozyten

Die humorale, antikörpervermittelte Immunität wird durch die B-Lymphozyten vermittelt. Die differenzierten Abkömmlinge der B-Lymphozyten, die Plasmazellen, synthetisieren und sezernieren Antikörper mit jeweils unterschiedlicher Bindungsspezifität für die entsprechenden Antigene. Die humorale Immunität ist gegen extrazelluläre Mikroorganismen und deren Toxine gerichtet (Abbas et al. 1996).

2.1.3 T-Lymphozyten

Die zelluläre Immunität wird von den T-Lymphozyten vermittelt. Die zelluläre Immunität von T-Lymphozyten setzt den Kontakt mit Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) voraus.

Die T-Lymphozyten dienen der Abwehr von intrazellulären Mikroorganismen wie virusinfizierten Zellen, aber auch von Tumorzellen und Transplantaten. Die Differenzierung der T-Lymphozyten erfolgt im Thymus. Auf der Zellmembran der T-Lymphozyten befindet sich ein Protein, der T-Zell-Rezeptor. Dieser Rezeptor kann Antigene, die mit Hilfe des MHC- (Major Histocompatibility Complex) Komplexes präsentiert werden, binden und erkennen. Die maximale Bindungsfähigkeit erlangt der T-Zellrezeptor allerdings nur zusammen mit einem Korezeptor (CD28), der das zweite unbedingt notwendige Aktivierungssignal vermittelt. Die T-Lymphozyten werden weiterhin unterteilt in funktionelle Subpopulationen, wovon die T-Helfer -Zellen und die zytotoxischen T-Zellen am besten charakterisiert sind.

Die zytotoxischen-CD8-T-Lymphozyten reagieren auf Zellen, die intrazelluläre Fremdartigene enthalten, und lysieren diese durch Ausscheidung zytotoxischer Substanzen (z.B.: Perforin). Die Erkennung des präsentierten Antigens erfolgt mit Hilfe der MHC-Proteine Klasse I.

Die CD4 -T-Helferzellen erkennen Antigene, die von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) auf ihrer Oberfläche dargeboten werden. Für die Antigenerkennung sind MHC-Proteine der Klasse II auf den APZ notwendig. Die Helferzellen sind teilweise auch an der humoralen Immunantwort mitbeteiligt. Durch die Aktivierung der Helferzellen kommt es zur Freisetzung von Zytokinen, die zur Differenzierung der B-Lymphozyten zu antikörperbildenden Plasmazellen führt (Abbas et al. 1996; Löffler u. Petrides 1998; Bucher u. Wartenberg 1997).

2.1.4 Der T-Zellrezeptor und CD3-Proteinkomplex

Die molekulare Eigenschaft des T-Zell-Rezeptors (TCR), der für die MHC-restringierte Antigenerkennung verantwortlich ist, wurde in den achtziger Jahren entdeckt (Abbas et al. 1996). Der TCR besteht aus einem Polypeptidpaar, der T-Zell-Rezeptorkette- α und der β -Kette, die durch eine Disulfidbrücke kovalent miteinander verbunden sind (siehe Abb.1).

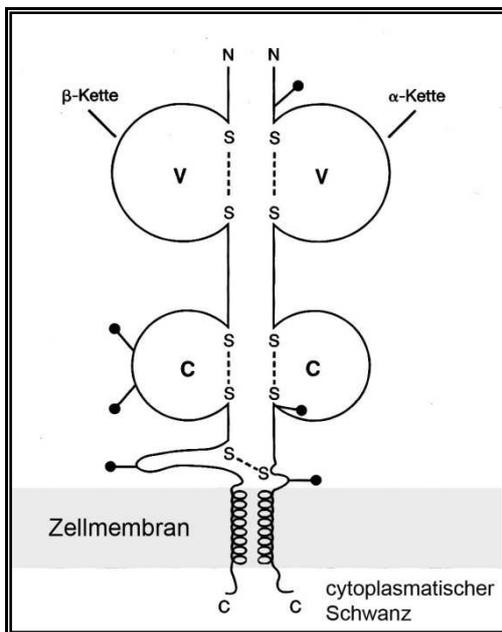


Abb.1: Schematische Darstellung des T-Zellrezeptors (TCR) für Peptid-MHC-Komplexe, V und C bezeichnen die variablen und konstanten Domänen der α - und β -Ketten. Das Aminoterminalende der Polypeptidkette ist mit N und das carboxyterminale Ende mit C gekennzeichnet. S—S Disulfidbindung. (Abbas et al. 1996)

Das TCR-Heterodimer ermöglicht den T-Lymphozyten Antigenepitope, die zusammen mit körpereigenen Haupthistokompatibilitätsmolekülen (MHC, major histocompatibility complex) von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) dargeboten werden, zu erkennen (Fremont et al. 1996). Sie sind für die Antigenerkennung aller Klassen von T-Zellen verantwortlich (Bentley u. Mariuzza 1996). Eine weniger häufige Variante des TCR, den man auf einer kleinen Subpopulation von T-Zellen findet, besteht aus γ - und δ - Ketten. Der T-Zell-Rezeptor aus dem γ : δ Heterodimer wird auf 1-5% aller CD3-positiven T-Zellen exprimiert und kommt hauptsächlich in Epithelien vor. Die genaue Funktion dieser T-Zellsubpopulationen ist unklar, jedoch scheinen sie an der Immunantwort

infizierter Epithelzellen beteiligt zu sein (Chien et al. 1996). Keine der Ketten des TCR-Heterodimers besitzt eine enzymatisch aktive zytoplasmatische Domäne, die nach Bindung des Antigens durch den TCR die Übertragung von Signalen in das Zellinnere ermöglicht. An der Zelloberflächenexpression der TCR-Moleküle wie auch Ihrer Funktion bei der Aktivierung der T-Zellen ist der CD3-Komplex beteiligt.

Der CD3-Komplex besteht aus 3 transmembranen Proteinen (CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ) und vier bis fünf anderen Proteinen, die nicht-kovalent mit dem Heterodimer assoziiert sind. Zusätzlich enthalten 90% der TCR-Komplexe das Homodimer einer nicht glykolysierten- ζ -Kette und 10% enthalten ein Heterodimer (ζ -Kette und nicht-glykolysierte- η -Kette).

Die CD3-Proteine, sowie die ζ -Kette sind für die Expression des TCR an der Zelloberfläche wichtig. Bei den γ , δ - und ϵ -Ketten handelt es sich um Monomere, die untereinander und mit dem $\alpha\beta$ -Heterodimer nicht kovalent verbunden sind. In den extrazellulären Bereichen befinden sich die α - und β -Ketten des TCR sowie der γ , δ - und ϵ -Ketten des CD3-Komplexes. Diese besitzen Ig-ähnliche Domänen, die aus Disulfidbrücken bestehen.

In den extrazellulären Domänen der CD3-Proteine findet man keine Variabilität, weshalb es unwahrscheinlich ist, dass diese Proteine einen Beitrag zur Spezifität der Antigenerkennung leisten. In den Transmembransegmenten der CD3-Proteine befinden sich negativ geladene Asparaginanteile. Diese Bereiche könnten eine Bedeutung bei der physiologischen Assoziation oder funktionellen Interaktion der CD3-Proteine mit den TCR- α - und β -Ketten haben, da diese Polypeptide in ihrem Transmembransegment mindestens eine positiv geladene Aminosäure enthalten (Abbas et al. 1996).

Die CD3-Proteine dienen der Weiterleitung des Aktivierungssignals in das Zellinnere, wenn der T-Zellrezeptor (TCR) ein Antigen gebunden hat. Bei der Aktivierung von T-Zellen spielt die Proteintyrosinphosphorylierung eine entscheidende Rolle. Die zytoplasmatischen Domänen aller CD3-Moleküle, besonders aber der ζ -Ketten, enthalten mit den Immunreceptor Tyrosine-based Activation Motifs (ITAMs) Sequenzen, die ihnen die Wechselwirkung mit zytoplasmatischen Proteinkinasen erlauben, und so die Signale in das Zellinnere übertragen (Cambier 1995; Malissen u. Malissen 1996). Die CD3-Proteine besitzen jeweils einen ITAM und die ζ -Ketten jeweils drei ITAM-Motive. Die ζ -Ketten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden und bilden ein Dimer. Diese Dimere sind nichtkovalent mit dem TCR und dem CD3-Komplex

verbunden und sind mit Ihren ITEMS genauso wie die CD3-Proteine an der Signaltransduktion beteiligt (Kersh et al. 1998).

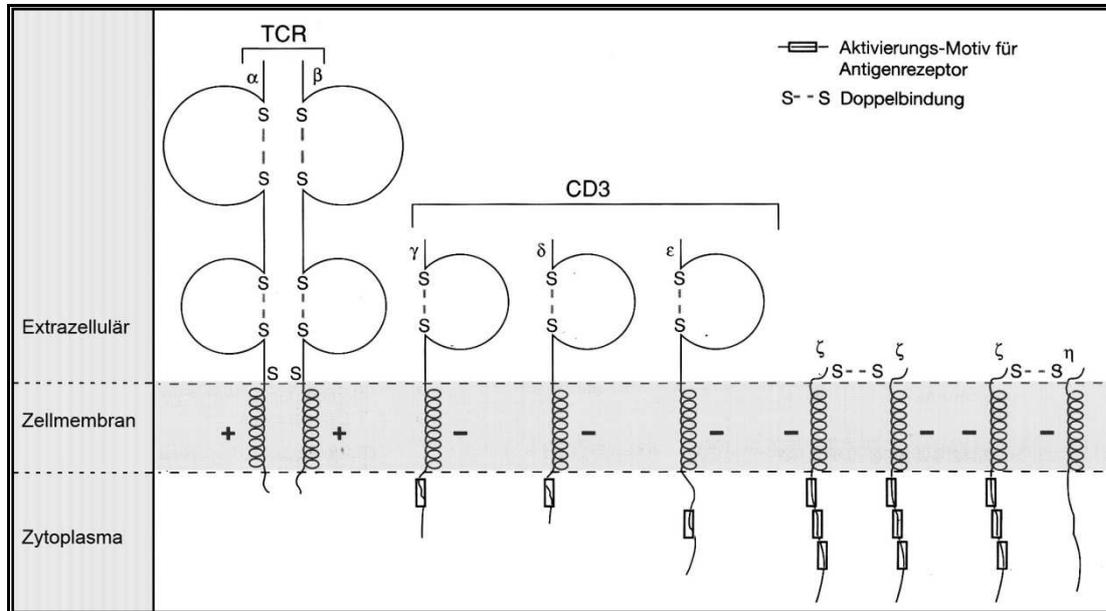


Abb.2: Struktur des T-Zell-Rezeptors/CD3-Komplexes

Der T-Zell-Rezeptorkomplex besteht aus dem antigenbindenden T-Zell-Rezeptor (TCR) sowie den signalvermittelnden Untereinheiten des CD3-Komplexes. Bei den γ -, δ - und ϵ - Ketten handelt es sich um Monomere, die untereinander und mit dem $\alpha\beta$ - Heterodimer nicht kovalent verbunden sind. ζ - und η - Ketten bilden $\zeta\zeta$ - Homodimere oder $\zeta\eta$ - Heterodimere, und die einzelnen Ketten können auch physikalisch mit dem TCR oder den CD3-Ketten assoziiert sein. Mit + und - werden geladene Gruppen der Transmembranregion bezeichnet, die möglicherweise für die Assoziation der einzelnen Ketten verantwortlich sind. Aktivierungsmotive des Antigenrezeptors in den zytoplasmatischen Anteilen bestehen aus konservierten Sequenzen, unter denen sich auch Orte der Tyrosin- Phosphorylierung befinden (Abbas et al. 1996)

Obwohl die Initialisierung der normalen T-Zell-Aktivierung durch den TCR-Komplex vermittelt wird, reicht dieses Signal nicht aus. Es sind zusätzliche kostimulatorische Signale notwendig.

2.2 Kostimulatorische Rezeptoren

Wie bereits erwähnt, kommt es bei der Antigenerkennung zu einer Assoziation des TCR mit CD4 (exprimiert auf Helfer-T-Zellen) bzw. CD8 (exprimiert auf zytotoxischen T-Zellen). Beide Korezeptoren erhöhen die Empfindlichkeit von T-Lymphozyten für das präsentierte Antigen um den Faktor 100 (Löffler u. Petrides 1998). Die Bindung eines Antigens an den TCR ist das erste Signal der T-Zell-Aktivierung (siehe Abb. 2). Das erste Signal alleine reicht nicht aus, um naive Zellen zu stimulieren. Zur vollständigen Aktivierung der T-Zellen ist ein zweites kostimulatorisches Signal nötig, das der T-Zelle von einer APZ geliefert wird (Liu u. Janeway 1992).

2.2.1 CD28+ T- Lymphozyten

Das CD28-Molekül ist ein Korezeptor das eine wichtige Rolle während der T-Zell-Aktivierung spielt. Es interagiert mit den Glycoproteinen B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) auf den APZ. Diese Moleküle sind homodimere Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie und werden ausschließlich auf APZ exprimiert. Der Rezeptor für die B7 Moleküle auf den naiven T-Zellen ist CD28, ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie. Das kostimulatorische Signal führt in Verbindung mit dem aktivierten TCR/CD3-Komplex zum Wechsel der naiven Zellen von der G₀- in die G₁-Phase. Weiterhin wird die Synthese des Cytokins IL-2 und der α -Kette des IL-2-Rezeptors induziert. Diese α -Kette bildet mit den konstitutiv exprimierten β - und γ -Ketten einen hochaffinen IL-2-Rezeptor (Abbas et al. 1996; Löffler u. Petrides 1998). Durch IL-2 wird die T-Zellreplikation autokrin induziert (Löffler u. Petrides 1998). Fehlende Kostimulation führt zur Anergie, d.h. einem inaktiven Status der T-Zelle, oder zum Zelltod durch Apoptose (Rudd 1996). CD28 stellt den einzigen Korezeptor naiver Zellen dar.

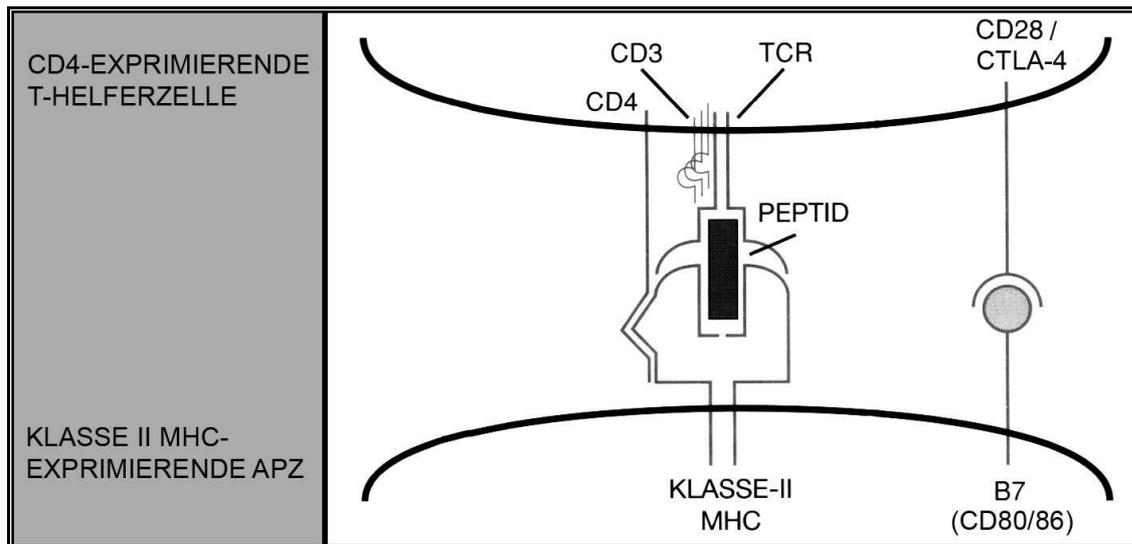


Abb. 3: Die Aktivierung von T-Lymphozyten erfordert zwei unabhängige Signale:

Die Bildung des Peptid:MHC-Komplexes durch den T-Zell-Rezeptor vermittelt ein Signal an die T-Zelle, die das Antigen erkannt hat. Zur vollständigen Aktivierung der T-Zelle ist ein zweites Signal, vermittelt von den APZ essentiell. Dabei bindet das CD28-Molekül (und CTLA-4) an die kostimulierenden Moleküle CD80 oder CD86 auf APZ (Abbas et al. 1996).

In den aktivierten T-Zellen wird darüber ein homologes Molekül, CTLA-4 (CD152) exprimiert. CTLA-4 interagiert ebenfalls mit den Molekülen CD80/CD86 auf APZ, allerdings führt in diesem Fall die Interaktion zu einem negativen proliferationshemmenden Signal für die T-Zelle (Burmester u. Pezzutto 1998). Die Gene von CD28 und auch CTLA-4 sind auf dem menschlichen Chromosom 2 eng gekoppelt (Abbas et al. 1996). Im Alter kommt es zu einer Abnahme der CD3+CD28+ T-Zellen (Hoshino et al. 1993; Effors et al. 1994; Fagnoni et al. 1996).

Der altersbedingte Abfall der CD28+ T-Zellen korreliert mit einer verminderten Proliferationsfähigkeit der T-Zellen im Alter (Adibzadeh et al. 1995). Des Weiteren scheint die Stimulation der CD28 Korezeptors die Zellen vor Apoptose zu schützen (Boise et al. 1995). Die CD152 Expression der T-Zellen scheint im Alter erhöht zu sein, was kostimulatorische Signale erschweren könnte, selbst dann, wenn CD28 normal funktioniert (Wakikawa et al. 1997).

2.2.2 Cutaneous Lymphocyte Antigen (CLA)

Lymphozyten, die hauptsächlich in die Haut rezirkulieren, exprimieren das „cutaneous lymphocyte-associated antigen“ (CLA) (Butcher u. Wartenberg 1999; Olson u. Ley 2002). Der Ligand des CLA-Moleküls ist das E-Selektin, dieses wird erst nach Umwandlung eines unreifen Lymphozyten in eine Gedächtniszelle unter Anwesenheit von IL-12 und TGF- β („transforming growth factor- β “) exprimiert (Picker et al. 1993). CLA ist definiert als ein Marker für Memory-T-Zellen, die spezifisch in die Haut auswandern. Antigenpräsentierende Zellen der Haut, wie Langerhanszellen und dermale dendritische Zellen, internalisieren fremde Antigene in der Haut und wandern über afferente Lymphbahnen in die Lymphknoten aus. Trifft nun eine naive T-Zelle in den die Haut drainierenden Lymphknoten auf ein Antigen, wird die T-Zelle aktiviert und zur Memory-T-Zelle. Danach kommt es zu Expression von CLA über Induktion von Glykosilierungsenzymen, die das PSGL-1 spezifisch verändern.

T-Zellen, die CLA exprimieren, können an das Adhäsionsmolekül E-Selektin binden, das vom Endothel der Hautgefäße exprimiert wird und so aus dem peripheren Blut in die Haut einwandern.

Dies erklärt, warum T-Zellen der Haut CLA⁺ sind, während T-Zellen die in entzündlichen Prozessen anderer Gewebe involviert sind, kein CLA exprimieren (CLA⁻) (Butcher u. Wartenberg 1999). Ob es im Alter auch zu einer Abnahme von CD28⁺CLA⁺ T-Zellen und IGFR⁺CLA⁺ T-Zellen kommt, ist bislang nicht eindeutig geklärt.

2.3 Das Kutane Immunsystem

Die Haut ist das größte Organ des Menschen und stellt eine chemische, physikalische und immunologische Abwehrbarriere dar. Viele fremde Antigene dringen durch die Haut in den Körper ein, so dass viele Immunreaktionen ebenfalls in der Haut beginnen. Zu den zellulären Komponenten des Immunsystems der Haut gehören Keratinozyten, die epidermalen Langerhanszellen, die epidermalen und dermalen Lymphozyten und die Makrophagen.

Epidermale Keratinozyten sind mit einem Anteil von über 90 % der häufigste Zelltyp der menschlichen Epidermis. Es handelt sich um multipotente Zellen, die im Laufe Ihres Lebens verschiedene Reifungs- bzw. Differenzierungsgrade durchlaufen.

Sie gehören zum ersten Zelltyp, der Kontakt mit einem über die Haut aufgenommenen Antigen erhält. Sie produzieren eine Vielfalt von Chemokinen und Zytokinen, was darauf hinweist, dass sie die lokale Entzündung und die Lymphozytenaktivierung verstärken können. Die Keratinozyten können nach Stimulation mit IFN- γ vermehrt MHC Moleküle Klasse II und kostimulatorische Moleküle exprimieren, die sich von Rezeptoren auf Makrophagen, B-Lymphozyten und dendritischen Zellen unterscheiden (Abbas et al. 1996).

Die epidermalen Langerhanszellen sind dendritische Zellen (APZ), die wie die Monozyten und Makrophagen aus dem Knochenmark stammen. In der Haut formen sie ein Netzwerk und spielen eine zentrale Rolle bei der Auseinandersetzung des Körpers mit Fremdanitigenen. Sie gehören zu den zur Phagozytose fähigen Zellen und sind in der Lage, Antigene aufzunehmen und zu präsentieren. Diese Zellen wandern nach Antigenprozessierung, d.h. Aufnahme und Zerkleinerung von Fremdanitigenen, in die regionären Lymphknoten aus und stimulieren dort naive T-Zellen, die dann als CLA-exprimierende Memory-Zellen die Fähigkeit zur Einwanderung in die Haut über E-Selektin erwerben.

Die Lymphozyten befinden sich teils intraepidermal, zum größeren Teil aber in der Dermis. Mehrheitlich bestehen diese aus zytotoxischen CD8+ T-Zellen.

Aufgrund des Homings in die Haut über CLA / E-Selektin exprimieren fast alle T-Zellen der Haut das CLA-Antigen und sind Memory-T-Zellen.

In der Haut finden sich kaum naive T-Zellen, dies ist auch wohl das wichtigste Kriterium zur Unterscheidung von den im Blut zirkulierenden T-Zellen, welche nur zu einem geringen Prozentsatz CLA exprimieren und sowohl aus naiven als auch aus Memory-Zellen bestehen.

Außer den Langerhanszellen können auch die dermalen Makrophagen und venöse Endothelzellen den T-Lymphozyten Antigene in der Haut präsentieren (Abbas et al. 1996; Steinman 1991).

2.3.1 Alterungsbedingte Veränderungen des kutanen Immunsystems

Wie sich das Immunsystem der Haut, speziell die Population der CD28+CLA+ und IGFR+CLA+ hautspezifischen T-Zellen, mit zunehmendem Alter verändert ist weitgehend unbekannt. Die bisher durchgeführten Studien beziehen sich meist nur auf die zirkulierenden CD28+CLA- und IGFR+CLA- T-Zellen. Höchstwahrscheinlich ist man davon ausgegangen, dass es keine Unterschiede zwischen diesen Populationen gibt und sich die Ergebnisse der CD28+CLA- und IGFR+CLA- T-Zellen auf die hautspezifischen T-Zellen übertragen lassen. Dies würde bedeuten, dass auch die Zahl der hautspezifischen T-Zellen mit zunehmendem Alter abnehmen würde, mehr Memory-Zellen und weniger naive und CD28+ T-Zellen im Vergleich zu jüngeren Individuen vorhanden wären.

Wie am Anfang dieser Arbeit erwähnt, gibt es eine negative Abhängigkeit zwischen dem Altern und der Funktion des Immunsystems. Im Alter kommt es zu einer Verschlechterung verschiedener Funktionen des Immunsystems und zu einer Zunahme von Infektionen und Malignomen. Bezogen auf die Haut spiegelt sich dies in einer erhöhten Inzidenz von viralen, bakteriellen und mykotischen Hautinfektionen wider und geht mit einer erhöhten Inzidenz von Hautmalignomen wie zum Beispiel dem Basalzellkarzinom und dem Spindelzellkarzinom einher. Demnach liegt die Vermutung nahe, dass die hautspezifischen T-Zellen mit zunehmendem Alter in ihrer Funktion geschwächt werden.

Es ist aber interessant, dass andererseits besonders im Alter vermehrt Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise das bullöse Pemphigoid auftreten. Das deutet darauf hin, dass das Immunsystem nicht in allen seinen Funktionen geschwächt wird. Beeindruckend ist auch die Tatsache, dass der Schweregrad bestimmter entzündlicher Hautkrankheiten bei denen T-Lymphozyten eine zentrale pathophysiologische Rolle spielen, wie z.B. die Psoriasis vulgaris unabhängig vom Alter ist. Diese Beobachtungen führten zu experimentellen Untersuchungen des Immunsystems der Haut, um mögliche Unterschiede im Rahmen der Immunoseneszenz festzustellen.

2.3.2 Die Migration von Lymphozyten

Das Aufspüren spezifischer Antigene und ihre Bekämpfung erfordern eine ständige Überwachung des Organismus. Eine wichtige Eigenschaft, um dieses zu gewährleisten, ist die Fähigkeit der Lymphozyten, in nahezu alle Organe und Gewebe ein- und auswandern zu können („Migration“). Die Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut in das geschädigte Gewebe ist entscheidend bei Trauma, Schock, Sepsis, Reperfusionprozessen, bei allergischen Erkrankungen, Tumormetastasierung, Embriogenese und Transplantatabstoßungsreaktionen (Westermann u. Pabst 1990; Böcker et al. 2001; Gosset et al. 1995; Ohkawara et al. 1995; Gearing u. Newman 1993). Die Rekrutierung wird über eine Reihe von Adhäsionsmolekülen gesteuert (siehe Tabelle 2).

2.4 Zelluläre Adhäsionsmoleküle

Adhäsionsmoleküle sind Rezeptoren, die sich auf der Oberfläche der Leukozyten und des Endothels der Venolen befinden. Sie führen über eine Liganden-Rezeptor-Erkennung zur Bindung zwischen Endothel und Leukozyten (Böcker et al. 2001). Der Begriff „Adhäsionsmoleküle“ ist insofern eine inkomplette Beschreibung, da er nur die Adhäsion zwischen Zellen beschreibt. Zelluläre Adhäsionsmoleküle bewirken aber nicht nur Adhäsion, sondern übertragen auch Signale in das Zellinnere und regulieren damit die Immunantwort der Zelle im Rahmen des Entzündungsgeschehens. So wird gelegentlich der Begriff „akzessorische Rezeptoren“ gebraucht (Wegner 1994). Zu den wichtigsten Adhäsionsmolekülen die wir hier behandeln, gehören die Immunglobulinfamilie (Walsh u. Doherty 1997), die Selektine (Kansas 1996) und die Integrine (Hynes 1992; Hynes u. Lander 1992).

2.4.1 Die Zelladhäsionskaskade

Die initialen Prozesse der sog. Leukozytenadhäsionskaskade, das Andocken und das Rollen, werden durch die Rezeptorfamilie der Selektine vermittelt (siehe Abb. 4).

P-Selektin (CD 62P) ist innerhalb der Endothelzelle in Weibel-Palade-Körpern gespeichert, und kann innerhalb von Minuten nach einem entsprechenden Reiz (z.B. durch Histamin, LTC₄, Thrombin) auf der endothelialen Zelloberfläche exprimiert werden (Albelda et al. 1994). Dort vermittelt P-Selektin die frühe Bindung der zirkulierenden Leukozyten und verringert deren Geschwindigkeit, so dass die Leukozyten auf der Oberfläche des Endothels entlangrollen (Böcker et al. 2001).

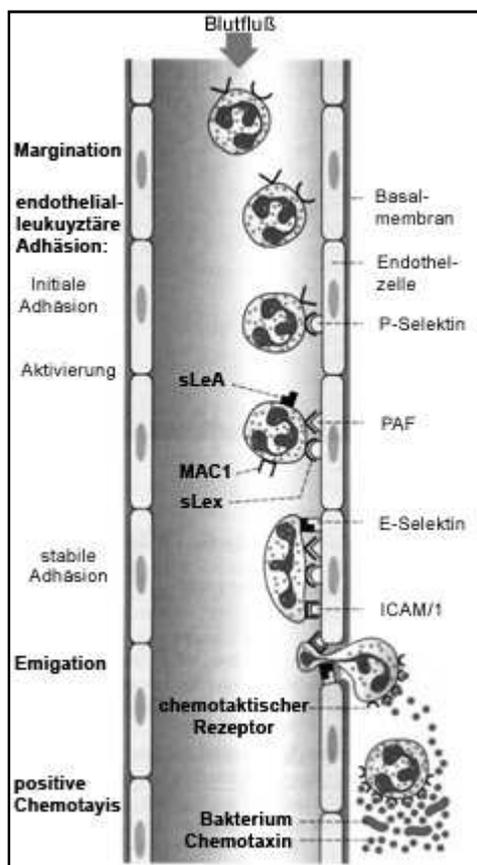


Abb. 4: Die Zelladhäsionskaskade

Margination und Adhäsion an das Endothel erfolgen über endotheliale und leukozytäre Adhäsionsmoleküle. Das aktivierte Endothel exprimiert in der Zellmembran den plättchenaktivierenden Faktor (PAF), der über eine PAF-Rezeptor-Ligandenbildung eine Aktivierung des Leukozyten induziert. PAF und weitere Entzündungsmediatoren verursachen eine Zunahme der Zahl und der Affinität von Adhäsionsmolekülen mit fester Adhäsion und anschließender Emigration durch interzelluläre Endothellücken ins Interstitium (Böcker et al. 2001).

Der Vorgang des Rollens der Leukozyten führt noch nicht zur leukozytären Rekrutierung. Bei fehlenden weiteren Aktivierungsschritten können sich die Leukozyten wieder lösen und vom Blutstrom mitgerissen werden (Löffler et al. 1998). Selektine (CD62) sind Ca^{2+} -abhängige, transmembrane Glykoproteine, die vor allem auf Endothelien vorkommen (Gearing u. Newman 1993). Sie besitzen eine extrazelluläre Lektindomäne mit denen sie die lipid- bzw. proteingebundenen Kohlenhydratketten, die auf Lymphozyten vorkommen, binden (Löffler u. Petrides 1998). Die Selektine besitzen weiterhin eine kurze intrazelluläre Domäne (Bevilacqua 1993a; Bevilacqua u. Nelson 1993b) durch die sie in der Lage sind, nach der Interaktion mit Ihren Liganden kostimulatorische Signale zu vermitteln, die zu der Aktivierung von Leukozyten beitragen (Brenner et al. 1996; Lo et al. 1997).

Durch proinflammatorische Mediatoren (z.B. Zytokine) werden nach einer gewissen Zeit zusätzlich endotheliale Adhäsionsmoleküle (z.B. E-Selektin, ICAM -1 und VCAM -1), deren konstitutive Basisexpression gering ist, synthetisiert. Für die feste Adhäsion sind hauptsächlich die Integrine von Bedeutung. Im Ausgangszustand sind die Integrine in einer inaktiven Form vorhanden, die zur Adhärenz noch nicht beiträgt. Erst in Anwesenheit von PAF (platelet-activating-factor) und/oder Interleukin-8 (IL-8), Mediatoren, die unter anderem durch die aktivierten Endothelzellen freigesetzt werden, kommt es zu einer Konformationsänderung und Aktivierung der Integrin-Rezeptoren. Durch hochaffine LFA-1-Integrine kommt es dann zu einer festen Bindung mit dem wichtigsten Liganden dem endothelialen ICAM-1-Ligand (Tonnesen 1989; Zimmerman et al. 1992). Gleichzeitig kommt es zu einer Abflachung der Leukozyten, so dass Sie sich den mechanischen Kräften des Blutstromes entziehen können. Nach der Adhäsion gelangen die Leukozyten durch eine amöboide Bewegung zum nächsten interendothelialen Spalt, durch den sie in das interstitielle Gewebe auswandern können. Nun kommt es zu einer gerichteten Wanderung der Leukozyten unter Einfluss von chemotaktischen Faktoren in Richtung des Entzündungsprozesses (Abbas et al. 1996; Löffler u. Petrides 1998; Böcker et al. 2001; Carlos u. Harlan 1994; Froese et al. 1994; Laffon u. Gonzales-Amaro 1995).

2.4.2 E-Selektin (CD 62 E), s(souble)E-Selektin und seine Liganden (z.B.CLA)

E-Selektin, welches erstmals von Bevilacqua et al. [1989] charakterisiert wurde, wird ausschließlich von Endothelzellen nach der Aktivierung durch Zytokine wie IL-1 oder TNF- α exprimiert (Gearing u. Newman 1993; Bevilacqua et al. 1989).

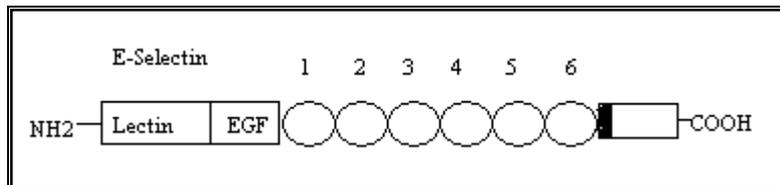


Abb. 5 : Struktur des E-Selektins

Alle Selektine haben eine homologe Struktur und bestehen aus 5 Domänen. Der zytoplasmatische Teil besteht aus einem kleinen C-terminalen-Rest, dem eine transmembranäre Domäne folgt. Die extrazelluläre Ausdehnung wird durch eine, bei den einzelnen Selektinen unterschiedliche Anzahl, von „short consensus repeats“ geprägt (bei E-Selektin 6 Stück). Nach einer dem „Epidermalen Wachstumsfaktor“ ähnlichen Domäne (EGF) folgt die eigentliche Kohlenhydrat-Bindungsstelle (Lektindomäne) am N-Terminus. Die EGF-Domäne soll durch Beeinflussung der Lektinkonformation am Bindungsprozess aktiv beteiligt sein (Simanek et al. 1998; Lis u. Sharon 1998).

Da die Aktivierung des E-Selektins auf Transkriptionsebene über *de-novo* Synthese erfolgt, wird das Maximum der E-Selektin Konzentration erst nach ca. 4 Stunden erreicht und fällt nach ca. 16-24 Stunden auf das Ausgangsniveau zurück (McEver 1997). Die Expression des Gens für das E-Selektin wird durch den Transkriptionsfaktor κ B (NF κ B) gesteuert (Schindler u. Baichwal 1994). Wie L-Selektin auf der leukozytären Seite, stellt E-Selektin auf endothelialer Seite einen Hauptvermittler des „rolling“ der Leukozyten auf dem Endothel dar (Palluy et al. 1992; Gearing u. Newman 1993; Engelberts et al. 1992). Als unspezifische Liganden von E-Selektin finden sich Kohlenhydrate wie sLeX (sialysiertes LeX), sLeA (sialysiertes LeA) (Bevilacqua et al. 1993), sulfatisierte Polysaccharide (Heparin, Fucoidan) und Mannose-6-Phosphat (Rosen u. Bertozzi 1994). Spezifische Liganden sind PSGL-1 (P-selektin glykoprotein ligand-1) und ESL-1 (E-Selektin Ligand-1) (Sako et al. 1993; Steegmaier et al. 1995).

Das Cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) ist ein Homingrezeptor für T-Zellen, der selektiv an E-Selektin bindet und so eine Auswanderung dieser Lymphozyten in die Haut ermöglicht (Bos et al. 1993; Abbas et al. 1996). Untersuchungen zeigten, dass die Mehrzahl der hautinfiltrierenden T-Zellen den Phänotyp CD45RO+ memory/effektor aufweist und das hautselektive CLA exprimieren (Picker et al. 1990).

Vom E-Selektin gibt es lösliche Isoformen (sE-Selektin), die im peripheren Blut nachweisbar sind. Diese löslichen Isoformen werden als zirkulierende Adhäsionsmoleküle bezeichnet. Sie entstehen durch eine Ablösung der membranständigen Moleküle von der Zelloberfläche, die durch proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren (TNF- α , IL-1,2,6,8, GM-CSF) hervorgerufen wird (del Pozo et al. 1994; Fries et al. 1993). Der Prozeß wird auch als „shedding“ bezeichnet und ist auf eine Endothelschädigung zurückzuführen (Engelberts et al. 1992; Lobb et al. 1991; Ulich et al. 1994). Das sE-Selektin kann die Aktivierung von polymorphkernigen Leukozyten an das vaskuläre Endothel steuern. Es ist aber auch möglich, dass durch Bindung freier Leukozyten eine Adhäsion verhindert wird (Lobb et al. 1991; Munro et al. 1991). Bei septischen Patienten wurden stark erhöhte Werte von sE-Selektin gefunden (Cowley et al. 1994). Die einzigartige Bedeutung dieser Kohlenhydrat-bindenden Proteine für die Initiierung der Immunabwehr konnte in vielfältigen *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen bewiesen werden (Lasky 1995). Bei dem Leukozyten Adhäsions Defizienz Syndrom (LAD2) können keine funktionsfähigen Selektinliganden gebildet werden, weil eine Mutation im Kohlenhydratstoffwechsel vorhanden ist. So leiden die Patienten, obwohl Sie eine hohe Leukozytenzahl haben unter rezidivierenden bakteriellen Infekten (Etzioni u. Jonas 1997).

2.4.3 Immunglobulinsuperfamilie

Innerhalb der Ig-Superfamilie werden 5 Mitglieder durch Endothelzellen exprimiert, die an der Leukozytenadhäsion beteiligt sind. Dazu gehören das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1), das platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) und mucosal addressin (Carlos u. Harlan 1994). Die Mitglieder der Ig-Superfamilie sind transmembrane Glykoproteine, die eine Ca²⁺-unabhängige Adhäsion

vermitteln (Sluiter et al. 1993; Springer 1994). Die Mitglieder der Ig-Superfamilien zeichnen sich durch eine oder mehrere extrazelluläre Domänen aus, die den Domänen der Immunglobuline ähneln. Immunglobulinartige Domänen bestehen aus etwa 100 Aminosäuren und sind im Wesentlichen aus zwei β -Faltblattstrukturen aufgebaut. Diese werden durch eine Disulfidbrücke stabilisiert (Abbas et al. 1996).

2.4.4 ICAM-1

Das Adhäsionsmolekül ICAM-1 wird auf einer Vielzahl von hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen Zellen, einschließlich Fibroblasten, Leukozyten, Endothelzellen, Epithelzellen und vielen Tumorzellen exprimiert (Abbas et al. 1996; Gearing u. Newman 1993; Van de Stolpe u. Van der Saag 1996). ICAM-1 ist ein 80-140 kD schweres Membranglykoprotein. Es besteht aus fünf extrazellulären, immunglobulinähnlichen Proteindomänen, einer transmembranösen und einer intrazellulären Domäne (Abbas et al. 1996) (siehe Abb. 6).

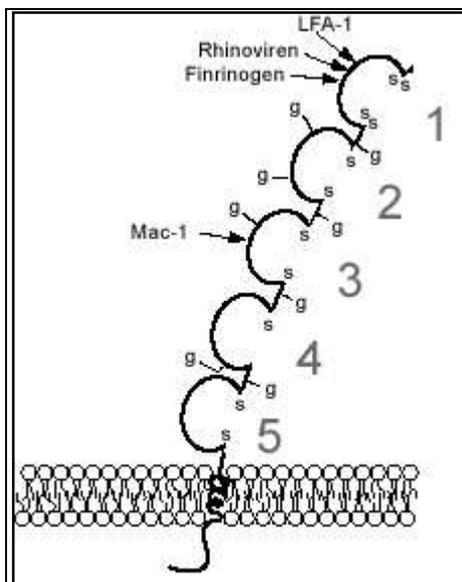


Abb. 6: ICAM-1 besteht aus 5 Immunglobulinartigen Domänen (grau nummeriert), einer hydrophoben transmembranösen und einer kurzen intrazellulären, C-terminalen Domäne. Jede Domäne enthält etwa 90-100 Aminosäuren, die aus zwei antiparallelen β -Ketten bestehen. Alle Domänen (mit Ausnahme der vierten) werden durch Disulfidverbindungen hochkonservierter Cysteine gebildet (mit S symbolisiert). Glykosylierungsstellen sind mit g bezeichnet, die Bindungsstellen für die wichtigsten Liganden sind mit Pfeilen markiert.

Leukozyten und Endothelzellen weisen eine geringe, basale Expression von ICAM-1 auf, die jedoch durch bestimmte Mediatoren (z.B. Zytokine) hochreguliert werden kann

(Dustin et al. 1986; Rothlein et al. 1988). Die rasche Induktion von ICAM-1 während entzündlicher Vorgänge ist ein wichtiges Regulativ, da viele Zellarten erst durch die Induktion von ICAM-1 für die Immunüberwachung zugänglich werden. Zu den induzierenden Faktoren gehören Mediatoren wie $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, $\text{TNF}\beta$, IL-1, aber auch exogene Stimuli wie Phorbol ester und UVB-Strahlung (Dustin et al. 1986; Rothlein et al. 1988; Barker et al. 1991, Krutmann et al. 1990; Griffiths et al. 1990). Der zeitliche Ablauf der ICAM-1 Expression wird mit 4 h nach Stimulierung bis zu 24 h angegeben (Panes et al. 1995). Als Liganden sind sowohl β_2 -Integrine (LFA-1; Mac-1) auf Leukozyten (Rothlein et al. 1986; Staunton et al. 1988), als auch Rhinoviren (Abbas et al. 1996; Staunton et al. 1988; Greve et al. 1989) und Plasmodium falciparum-infizierte Erythrozyten beschrieben worden (Hynes 1992; Hynes u. Lander 1992; Ockenhouse et al. 1992a u. 1992b). Das Ablösen des membranständigen Moleküls ICAM-1 von der Zelloberfläche, ausgelöst durch proinflammatorische Mediatoren (de Caterina et al. 1994; Silvestro et al. 1994), geschieht durch Proteolyse (del Pozo et al. 1994). Diese löslichen rekombinanten Formen von ICAM-1 können die TCR-Komplex-vermittelte Aktivierung von T-Zellen erhöhen, was darauf hindeutet, dass LFA-1 ein kostimulatorisches Signal an T-Zellen vermitteln könnte (Abbas et al. 1996).

2.4.5 VCAM-1

Das zelluläre Adhäsionsmolekül VCAM-1 hat eine Masse von 90-110 kD. Es wurde zum ersten Mal von Osborn et al. (1989) beschrieben.

VCAM-1 kommt auf endothelialen, epithelialen, dendritischen Zellen und Makrophagen vor (Gearing u. Newman 1993). VCAM-1 weist sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen sieben Immunglobulin-artige Domänen auf (Osborn et al. 1989; Cybulsky et al. 1991a u. 1991b). Im menschlichen Organismus existiert zusätzlich eine alternative Form mit sechs Domänen (Cybulsky et al. 1991a). Die Hauptliganden von VCAM-1 sind VLA-4 (Sluiter et al. 1993; Peter et al. 1999). Die Adhäsion erfolgt über die erste und vierte Ig-artige Domäne (Osborn et al. 1992 u. 1994; Vonderheide et al. 1994).

VCAM-1 wird von Endothelzellen nur nach Stimulation (durch z.B. Zytokine) exprimiert und kommt am unstimulierten Endothel praktisch nicht vor (Mutin et al. 1997). Nach der Stimulation von Endothelzellen ist die Zahl der exprimierten vaskulären

Adhäsionsmoleküle 2-3 h nach Stimulation am höchsten und sinkt im Laufe der folgenden Stunden wieder ab (Böcker et al. 2001).

Auch bei VCAM-1 kommt es durch proinflammatorische Mediatoren zur proteolytischen Abspaltung des membrangebundenen Moleküls (Terry et al. 1993).

2.5 Allgemeine Grundlagen der interzellulären Signalübertragung

2.5.1 Wachstumshormon (GH), IGF-1

Komplexe Organismen wie z.B. Säugetiere benutzen vornehmlich das Nervensystem und das endokrine System zur internen Informationsübertragung. Die zentrale Region des vegetativen Nervensystems ist der Hypothalamus. Durch die Verbindungen des Hypothalamus zur Hypophyse werden auch das endokrin-vaskuläre System beeinflusst und koordiniert. Dem Hypothalamus ist die Adenohypophyse nachgeordnet. Sie steuert mit ihren glandotropen Hormonen die meisten peripheren Drüsen. Ein unter dem Einfluss von Somatostatin und Somatoliberin gebildetes Produkt der azidophilen Zellen des Vorderlappens ist das Somatotrope Hormon (STH) oder Growth Hormone (GH). Das Growth Hormon besitzt eine in hohem Maße artspezifische Sequenz von Aminosäuren und vermittelt seine Effekte auf eine Vielzahl von Zielzellen, hauptsächlich durch Somatomedine (Devlin 2002). Somatomedine werden unter STH-Einfluss in der Leber synthetisiert und wegen ihrer 50%-igen Strukturhomologie zum Insulin auch Insulin-like Growth Factors (IGFs) genannt.

Das humane Wachstumshormon ist ein Peptidhormon, das in den somatotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens produziert und sezerniert wird (Wallis et al. 1985). Das menschliche Wachstumshormon ist ein nicht-glykosyliertes Proteohormon mit einer Kettenlänge von 191 Aminosäuren und einer molekularen Masse von ca. 22 KD. Die Tertiärstruktur des Proteins wird durch zwei Disulfidbrücken stabilisiert (Ranke et al. 1989 u. 1993). Die Synthese und Sekretion vom Wachstumshormon wird durch die Balance zwischen growth hormone releasing hormone (GHRH) und growth hormone release inhibiting hormone (GHRH, Synonym: Somatostatin) gesteuert (Lang 1990). Die humane growth Hormone Sekretion erfolgt pulsatil mit 9-10 GHRH gesteuerten Maxima innerhalb von 24 Stunden (Van Dessel et al. 1996; Yu et al. 1999a).

Der Alterungsprozess geht mit einer deutlichen Verminderung der humane GH-Sekretion einher. Für diesen Prozess wurde der Begriff der Somatopause geprägt. Bereits ab dem 20. Lebensjahr fallen die Konzentrationen von hGH/IGF kontinuierlich (1-2 % pro Jahr) ab und gehen bei einem 50-jährigen auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes zurück (Van Dessel et al. 1996; Yu et al. 1999a).

2.5.2 Das IGF1-System

Die Polypeptide Insulin-Like Growth Faktor 1 und Insulin-Like Growth Faktor 2 wurden 1978 isoliert und sequenziert (Rinderknecht u. Humbel 1978a u. 1978b). Sie erhielten den Namen aufgrund der Ähnlichkeit zum Insulinmolekül.

Die teilweise Strukturhomologie zwischen IGF und Insulin befähigt IGF1 zwar mit deutlich niedrigerer Affinität aber doch an den Insulinrezeptor zu binden. Während Insulin primär in der Leber, im Muskel und im Fettgewebe agiert (Kahn 1985), sind die insulinähnlichen Wachstumsfaktoren bedeutend für die Funktion fast jeden Organs im Körper (Danghaday u. Rotwein 1989).

Das IGF-System zählt zur Familie der Wachstumsfaktoren und ist ein integraler Bestandteil der Regulierung des Wachstums in allen Organen (Le Roith 2003). Die Bestimmungen von IGF-1 und deren Bindungsproteinen (IGFBP-3) werden derzeit als die effektivste Methode zur Abklärung von Störungen der Wachstumshormonfunktion wie Gigantismus, Minderwuchs oder Akromegalie in der Klinik angewendet.

In der Regel wirken Wachstumsfaktoren spezifisch auf bestimmte Zell- oder Gewebetypen, die einen entsprechenden Rezeptor auf der Zelloberfläche anbieten. Sie gehören zur Gruppe der Zytokine und sind multifunktionale Botenstoffe, die die Kommunikation zwischen Zellsystemen regeln, die Zellproliferation und Differenzierung durch Bindung an spezifische Rezeptoren fördern und eine stimulierende Wirkung auf die DNS-Synthese besitzen (Alberts et al. 2002). Man unterscheidet Wachstumsfaktoren, die mit spezifischen Zelloberflächenrezeptoren interagieren (z.B. GH), Zelloberflächen- Hormonrezeptoren (z.B. Protein-Tyrosin-Kinasen), intrazelluläre Signaltransmitter (z.B. Proteinkinasen) und Transkriptionsfaktoren (z.B. Promoter). Die meisten Faktoren vermögen sowohl zu stimulieren als auch zu hemmen. Die Wirkungen von IGF können in Abhängigkeit vom Gewebetyp und vom physiologischen oder

pathologischen Zustand durch IGFBP entweder positiv oder negativ moduliert werden (Rajaram et al. 1997).

Das Vorhandensein von IGF1 und IGF2 ist essentiell für die embryonale Entwicklung (Baker et al. 1993; Le Roith 1997). IGF2 ist fast ausschließlich in embryonalen und neonatalen Geweben exprimiert. Nach der Geburt fällt der Pegel des nachweisbaren IGF2 signifikant ab, weshalb es als fetaler Wachstumsfaktor angesehen wird. Beide Hormone sind im nanomolaren Bereich im Blut bis in das Erwachsenenalter nachweisbar. IGF1 behält seine dominante Rolle für die postnatale Wachstumsregulation bei. Mutationen im IGF1R-Gen können intrauterin und postnatal zur Wachstumsretardierung führen (Abuzzahab et al. 2003).

Änderungen, welche das Gleichgewicht zwischen der IGF / IGF1R-Aktivität und der Funktion der IGFBP verschieben, können am Entstehen und Fortschreiten einer Neoplasie in verschiedenen Zelltypen beteiligt sein (Grimberg et al. 1996). Eine reduzierte Bioaktivität von IGFBP kann zur Karzinogenese beitragen, weil dadurch die IGF-unabhängigen Effekte auf Wachstum und Apoptose abnehmen.

2.5.3 IGF1 Ligand

Der Insulin-like Growth Faktor I, auch als Somatomedin C bezeichnet, gehört zur Klasse der Wachstumsfaktoren und ist an der Regulation von Zellproliferation, Zelldifferenzierung und -transformation beteiligt (Benito et al. 1996). Der Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) ist ein Polypeptid mit einer Größe von 7 kDa, dessen Struktur Ähnlichkeiten mit dem Proinsulin aufweist (Rosen 1999).

Das IGF-1 ist das wichtigste an der Zellantwort auf GH beteiligte Protein und Teil der GH-IGF-1 Achse, auf welcher GH die Synthese von IGF-1 in verschiedenen Organen im Sinne eines negativen feedback-Mechanismus stimuliert. Das IGF-1 induziert die meisten anabolen Zellaktivitäten des zirkulierenden GH auf parakrinem, autokrinem und endokrinem Wege. Es beeinflusst insbesondere das Wachstum von Skelettgewebe, der Organe und von Körpergewebe wie z.B. Zellen des Immunsystems z.B. Lymphozyten (Devlin 2002). Wie vorab schon erwähnt, wird IGF als Antwort auf eine Wachstumshormonstimulation in den Leberzellen produziert (Olivecrona et al. 1999).

Die Serumkonzentrationen von IGF1 und GH verlaufen parallel (Le Roith 1997), die Serumkonzentrationen von freiem und gebundenem IGF nehmen im Laufe des Lebens kontinuierlich ab (Gomez et al. 2003). Zirkulierendes, freies IGF1 ist im Wesentlichen an

der negativen Rückkopplung auf die GH-Sekretion beteiligt (Muller et al. 2001). Die mit GH assoziierten genetischen Defekte, gehen mit intrauteriner und postnataler Wachstumsretardierung sowie Taubheit und geistiger Behinderung einher. Die Strukturhomologie von IGF1 und IGF2 beträgt etwa 70%. Ca. 1% des IGF1 zirkuliert in freier, bioaktiver Form im Serum. Insgesamt sind 99% des IGF im Blutkreislauf und im Extrazellulärraum an IGFBP3 gebunden (Gomez et al. 2003). Dieser Dimer aus IGF-1-IGFBP3 bildet einen Komplex mit einer weiteren sauren Protein-Untereinheit (ALS, Acid-labile Subunit) und formt einen 150 kD großen Trimer-Komplex (Baxter 1994). Die Komplexierung bewirkt eine Regulation der biologischen Wirkung und vermeidet pulsatile Schwankungen. Wird IGF1 aus diesem Komplex entlassen, gelangt es an die Zielrezeptoren.

IGF entfaltet mitogene, lebensverlängernde und insulinähnliche Effekte auf Zellen (Holzenberger et al. 2003), welche unabdingbar für die Embryogenese und die postnatale Wachstumsphysiologie sind. Die IGFs sind Überlebens- und Differenzierungsfaktoren für verschiedene Typen von Progenitorzellen (Rao u. Mattson 2001). Sie beeinflussen mitotische Zellteilungen beim Übergang von der G1- zur S-Phase (Alberts et al. 2002). IGF1 stimuliert die Proliferation immunkompetenter Zellen (Auernhammer u. Strasburger 1995). Monozyten aus dem peripheren Blut können mindestens drei verschiedene IGFBPs sezernieren (Auernhammer u. Strasburger 2002).

2.5.4 IGF-1- Rezeptor

Der IGF1-Rezeptor gehört wie auch der Insulinrezeptor zu der Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren. Das Gen des IGF-I-Rezeptors ist auf dem Chromosom 15 lokalisiert. Er ähnelt dem Insulinrezeptor und ist das komplementäre Rezeptorprotein für IGF1 (Frattali et al. 1992). Der IGF-IR ist ein glykosyliertes heterotetrameres Molekül, das aus zwei extrazellulären α -Untereinheiten und zwei transmembranen β -Untereinheiten besteht, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die transmembranösen β -Peptide tragen die Kinase, die extrazellulären α -Peptide enthalten die Bindungsstellen für den Liganden. Nach Ligandenbindung erfolgen Autophosphorylierung und die Phosphorylierung des Rezeptor-Substrats. Dieses

phosphorylierte Protein stellt den Kontakt zu Proteinen mit SH2-Domäne her. Auf diese Art vermittelt der IGF1-Rezeptor die Proliferativen Wirkungen von IGF1 und IGF2 (Ulrich et al. 1986).

Der IGF1-Rezeptor spielt eine wichtige Rolle bei der normalen Proliferation und Transformation der Zelle. Die Transkription des IGF-I-Rezeptor Gens ist durch eine Anzahl von Tumorsuppressorgenen kontrolliert. In bösartigen Geweben wirkt es antiapoptotisch durch Verstärkung von verschiedenen Überlebensmechanismen der Tumorzellen. Der IGF1-Rezeptor ermöglicht die Signaltransduktion in das Innere der Zelle und erfüllt drei Hauptfunktionen. Er stimuliert die Mitogenese in vielen verschiedenen Zelltypen, eine Funktion, die auf die C-terminale Domäne der β -Untereinheit zurückzuführen ist (Esposito et al. 1997). Er schützt weiterhin Zellen vor Apoptose, eine Eigenschaft, die wiederum an andere Domänen auf der β -Untereinheit gebunden ist (O'Connor et al. 1997). Der IGF1-Rezeptor besitzt außerdem eine wichtige Funktion bei der zellulären Transformation durch Umbau des Zytoskeletts (Blakesley et al. 1998).

2.5.5 Staphylokokken Superantigene (SEB)

Die Staphylokokken Enterotoxine (SE) sind Exotoxine (Superantigene) des grampositiven Bakteriums *Staphylococcus aureus*. Die immunologische Bedeutung der Superantigene besteht in ihrer Fähigkeit, viele T-Lymphozyten oligoklonal aktivieren zu können. Bei der Stimulation mit dem Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) ist eine Vernetzung des MHC Klassen II Moleküls auf Antigen-präsentierenden Zellen mit dem T-Zell-Rezeptor durch das Superantigen notwendig (Abbas et al. 1996). Das Enterotoxin bindet nicht an die für die Antigenbindung vorgesehene Peptidbindungsstelle, sondern mit einer hohen Affinität an die Außenseite des MHC Moleküls (Abbas et al. 1996; Labrecque et al. 1993). Dieser gebildete Komplex bindet an die V β - Kette des T-Zell- Rezeptors (TCR) und löst eine Reaktion aus, ohne dass der komplette TCR benötigt wird (Labrecque et al 1993; Gascoigne u. Ames 1991; Hauser u. Orbea 1993; Kappler et al. 1989; White et al 1998). Da die relative Häufigkeit von T-Lymphozyten, die mit Enterotoxinen reagieren, viel höher ist als diejenige von Zellen mit Spezifität für konventionelle Antigene, werden die Enterotoxine Superantigene genannt. Durch die Superantigene können bis zu 20 % der T-Zellen aktiviert werden, während

durch die konventionelle Antigenstimulation nur etwa 0,1 % aktiviert werden (Skov u. Baadsgrad 1995; Abbas et al. 1996). Für die T-Zell Aktivierung reichen schon geringe Mengen aus, um eine große Zahl von T-Zellen zu aktivieren. Da nur T-Zellen mit bestimmter TCR-Konfiguration einzelne Enterotoxine erkennen und mit diesen reagieren, werden die SE als Antigene und nicht als polyklonale Mitogene bezeichnet (Abbas et al. 1996).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel

human sE-Selektin	R&D Systems, Minneapolis, USA
human sICAM-1	R&D Systems, Minneapolis, USA
human sVCAM-1	R&D Systems, Minneapolis, USA
OCTEIA IGF-1	DS, Boldon, UK
hGH ELISA	IBL, Hamburg, Deutschland
Anti-CD3-FITC, IgG1	Becton & Dickinson, Heidelberg
Anti-CD28-PE, IgG1	Becton & Dickinson, Heidelberg
Anti-CLA-FITC, IgM	PharMingen, San Diego, CA, USA
Anti-IgG1-IZ-Isotyp-PE	Becton & Dickinson, Heidelberg
Maus-anti-human-IgG-1-PE, Isotyp	Becton & Dickinson, Heidelberg
Anti-IgG1-Isotyp-FITC	Becton & Dickinson, Heidelberg
Anti-IgM-Isotyp-FITC	PharMingen, San Diego, CA, USA
(Ratte-anti-human-IGM-FITC-Isotyp	PharMingen, Ort, Land, Kat.Nr.555951)
Anti-human-IGF-1R-PE, IgG-1	R&D Systems, Minneapolis, USA
RPMI 1640 mit L-Glutamin	Gibco, Pasley, GB
Hepes Puffer	Gibco, Pasley, GB
Penicillin 10000µg/ml	Gibco, Pasley, GB
Streptomycin 10000 µg/ml	Gibco, Pasley, GB
Fetales Kälber Serum (FCS)	Boehringer, Mannheim
Staphylokokken Enterotoxin B	Sigma, München
Recombinant Human IGF-I	R&D Systems, Minneapolis, USA
Lymphoprep TM	Nycomed Pharma, Oslo, Norwegen
Trypanblau 0,5%	Seromed Biochrom, Berlin

3.1.1 Verwendete Pufferlösungen

PBS (phosphate buffered saline)-Puffer

NaCl	137,0	mM	
Na ₄ HPO ₄	8,0	mM	
KH ₂	1,5	mM	
KCL	3,0	mM	pH 7,4

HEPES-Puffer

HEPES [1M]	25,0	ml	
Albumin	10,0	g	
CaCl	0,294	g	
MgCl	0,203	g	
NaCl (0,9 %)	11,0	ml	pH 7,4

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Butterfly-Venensystem, steril	Dipsomed, Gelnhausen
Monovetten	Starstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, gelb	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen, blau	Eppendorf, Hamburg
Polypropylenröhrchen 15 ml	Becton & Dickinson, Heidelberg
Polypropylenröhrchen 50 ml	Becton & Dickinson, Heidelberg
Polystyrolröhrchen 12x75mm	Becton & Dickinson, Heidelberg
Sterile Einmalpipette(1-10ml)	Becton & Dickinson, Heidelberg
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim/Main

3.1.3 Geräte

MR 5000/7000 Platten-Lesegerät	Dynatech, Denkendorf
Brutschrank	Heraeus, Hanau
FACScan Durchflußzytometer	Becton & Dickinson, Heidelberg
Lichtmikroskop	Leitz, Wetzlar
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim/Main
Pipettierhilfe	Hirschmann, Deutschland
Pipetten (0,5-1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Probenmixer, Ceromat MV	B.Braun, Melsungen
Vakuumpumpe	Millipore, Bedford, MA,USA
Werkbank, steril	Ceag Scirp, Selm-Bork
Zentrifuge, Megafuge 1,0R	Heraeus, Hanau

3.2 Blutspenderkollektive

Als Kontrollen dienten freiwillige Blutspender, die eigenanamnestisch zum Zeitpunkt der Blutabnahme vollkommen gesund waren.

3.2.1 Blutspenderkollektive zur Bestimmung der Adhäsionsmoleküle mittels ELISA

Das untersuchte Blutspenderkollektiv bestand aus insgesamt 71 Probanden (30 [21,3%] Männer und 51 [36,2%] Frauen). Das mediane Alter der Gruppe betrug 52 Jahre. In der Gruppe der 20-40jährigen wurden 20 Personen untersucht, in der der 40-60jährigen ebenfalls 20 Probanden, in der Gruppe der 60-80jährigen auch 20 Personen und die Gruppe der über 80 jährigen bestand aus 11 Blutspendern.

3.2.2 Blutspenderkollektive zur Isolierung von peripheren mononukleären Zellen

Für die Stimulationsexperimente wurde 12 Probanden Blut entnommen. Davon waren 6 Probanden jünger als 40 Jahre, das mediane Alter der Gruppe lag bei 25 Jahren. Die 6 älteren Probanden waren älter als 60 Jahre und das mediane Alter der Gruppe lag bei 63 Jahren.

3.3 Der Enzymimmunoassay

Die Bestimmung der Adhäsionsmoleküle sE-Selectin, sICAM-1, sVCAM und der Wachstumshormone IGF-1 und hGH erfolgte mittels Enzymimmunoassay (ELISA).

3.3.1 Prinzip des Enzymimmunoassays

Eine Mikrotiterplatte ist mit einem Antikörper gegen die zu untersuchende Substanz (z.B. sE-Selectin, sICAM-1, sVCAM-1, IGF-1 oder hGH) beschichtet (1. Antikörper). Zuerst werden die Standards, die Proben (z.B. sE-Selektin), oder Kontrolllösungen in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert. Diese reagieren dann mit dem ersten Antikörper. Nach Abschluss der Reaktion werden überschüssige Bestandteile der Proben durch Waschvorgänge entfernt. Nach Zugabe von Meerrettich-Peroxidase (HRP) markierten polyklonalen Antikörpern (zweites Antikörper) kann sich während der anschließenden Inkubation ein Sandwich-Komplex aus dem ersten Antikörper, der zu untersuchenden Substanz in der Probe und dem enzymmarkierten Antikörper (zweites Antikörper) bilden. Überschüssiger enzymmarkierter Antikörper wird durch einen Waschvorgang entfernt. Mit Zugabe der chromogenen Lösung (Tetramethylbenzin=TMB) beginnt die Bildung eines farbigen Produktes, wobei die Farbintensität der Menge der zu untersuchenden Substanz in der Probe oder im Standard proportional ist. Durch Zugabe einer Säurelösung wird die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt. Anschließend wird die Absorption des farbigen Endproduktes bei 450 nm mit einem Mikroplatten-Reader gemessen. Anhand einer zu erstellenden Standardkurve werden die Antigen-Konzentrationen berechnet (siehe Abb.7).

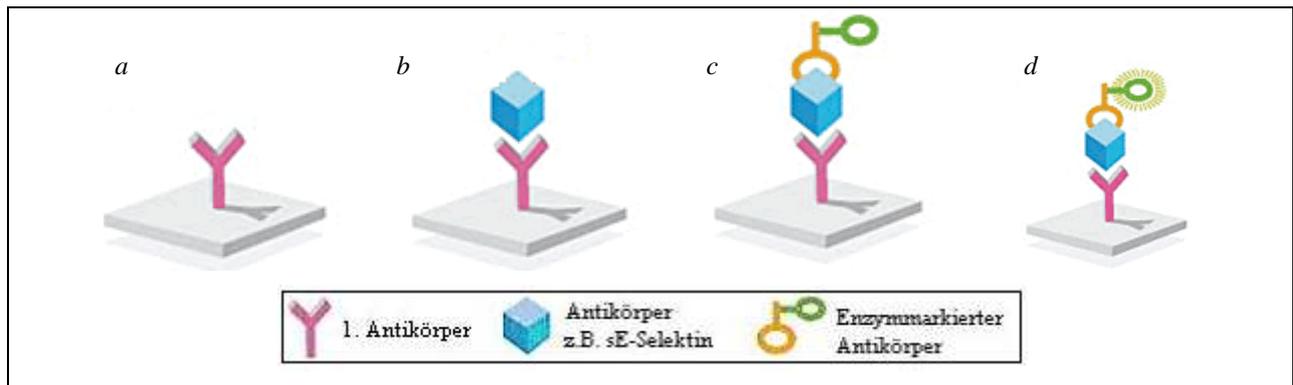


Abb. 7: (a) Antikörper beschichtete Platte gegen das Antigen, (b) Antigen-Antikörperreaktion, (c) Sandwichkomplex (Antikörper-Antigen-Enzymmarkierter Antikörper), und (d) Bildung des Farbkomplexes

3.3.2 Die Bestimmung von sE-Selectin im Plasma

Die Bestimmung des löslichen E-Selectins im Plasma erfolgte mittels des sE-Selektin-Parameter[®]-Testkits (R&D Systems, Minneapolis, MN USA). Die ELISAs wurden nach den Vorschriften der Hersteller durchgeführt. Das Prinzip des ELISAs ist unter 2.3.1 erklärt. Der Mittelwert des im Serum vorkommenden sE-Selektin liegt bei 46,3 ng/ml. Die Spannweite für sE-Selektin im Plasma wird mit 29,1 – 63,4 ng/ml angegeben und die Empfindlichkeit des Tests beträgt < 0,1 ng/ml.

3.3.3 Die Bestimmung von sICAM-1 im Plasma

Zur Bestimmung des sICAM-1 wurde ein kompetitiver Enzymimmunoassay (s-ICAM-1-Parameter[®]-Testkits, R&D Systems, MN USA) verwendet. Die ELISAs wurden nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Das Prinzip des ELISAs ist unter 2.3.1 erklärt. Der Hersteller gibt einen Mittelwert des im Plasma vorkommenden sICAM-1 von 211 ng/ml an. Die Spannweite des im Serum vorkommenden sICAM-1 liegt zwischen 115-306 ng/ml. Die Sensitivität des Tests beträgt < 0,35 ng/ml.

3.3.4 Die Bestimmung von sVCAM-1 im Plasma

Die Bestimmung des löslichen VCAM-1 im Plasma erfolgte mit dem sVCAM-1-Parameter[®]-Testkits (R&D Systems, Minniapolis, MN USA). Auch hier wurden die ELISAs nach dem gleichen Prinzip wie unter 2.3.1. beschrieben durchgeführt. Der Hersteller gibt den Mittelwert für das im Plasma vorkommende sVCAM-1 mit 553 ng/ml an. Die Spannweite des im Plasma vorkommenden sVCAM-1 liegt zwischen 395-714 ng/ml und die Sensitivität des Tests beträgt < 2,0 ng/ml.

3.3.5 Die Bestimmung von IGF-1 im Plasma

Zur quantitativen Bestimmung des IGF-1 im Serum wurde ein Enzymimmunoassays (OCTEIA IGF-1-Testkits der Immunodiagnostic Systems Limited (IDS), Boldon, UK) verwendet. Die ELISA`s wurden nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Im OCTEIA[®] IGF-1-ELISA wurden die Polystyrolmikrotiterplatten mit polyklonalen Antikörpern gegen IGF-1 beschichtet. Die verdünnte Probe wurde dann zusammen mit Meerrettich-Peroxidase-beladenen monoklonalen Antikörpern gegen IGF-1 in den Antikörper-beschichteten Vertiefungen für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die überschüssigen enzymmarkierten Antikörper durch den Waschvorgang entfernt. Nach Zugabe des Substrats (TMB) kam es zur Farbentwicklung. Nach Zugabe der Stopplösung wurde die entstehende Adsorption in einem Mikroplatten-Lesegerät abgelesen. Die Empfindlichkeit des Tests liegt bei 1,9 µg/L.

Die Normalwerte, die mit dem OCTEIA[®] IGF-Kit bestimmt wurden und vom Hersteller als Richtlinie aufgeführt sind, betragen für das im Plasma vorkommende IGF-1 zwischen 12 - 221 µg/L. Bei Kindern liegt der Wert zwischen 12 - 163 µg/L, bei Erwachsenen liegt der Wert zwischen 82 - 221 µg/L und der Wert bei akromegalischen Kindern liegt zwischen 352 – 627 µg/L.

3.3.6 Die Bestimmung von hGH im Plasma

Die Bestimmung des hGH im Serum erfolgte mit den hGH-ELISA-Testkits (IBL-, Hamburg, Deutschland). Bei dem Test handelt es sich ebenfalls um einen Enzymimmunoassay. Der Test wurde nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Die von Hersteller angegebenen Tagwerte des im Plasma vorhandenen hGH liegen bei $< 0,2 \pm 10 \mu\text{U/ml}$. In der Schlafphase nimmt die Konzentration konstant ($\pm 30 \mu\text{U/ml}$) zu. Die Sensitivität des Tests beträgt $0,11 \mu\text{U/ml}$.

3.4 Präparation von Zellen aus humanem Vollblut

3.4.1 Präparation von mononukleären Blutzellen

Die Gewinnung von mononukleären Blutzellen (PBMC) erfolgte durch Anwendung einer Dichte-Gradienten-Zentrifugation mit Lymphoprep (1,077 g/ml).

Bei der Zentrifugation von über Lymphoprep geschichtetem Blut können die Erythrozyten das dichtere Lymphoprep durchdringen, wogegen die restlichen Blutbestandteile (Thrombozyten, Lymphozyten und Granulozyten) in den Schichten im oder über dem Lymphoprep zurückbleiben.

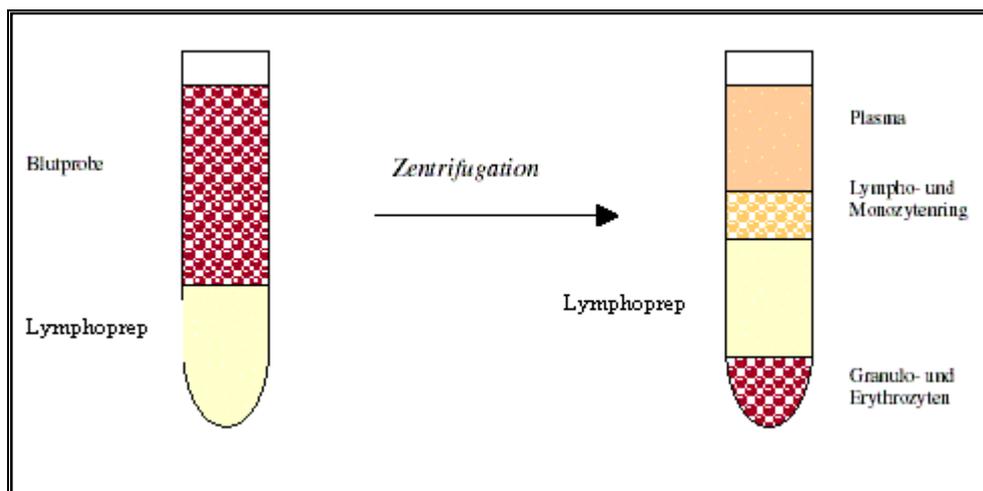


Abb. 8: Darstellung der Isolierung von PBMCs aus Vollblut über einen Lymphoprep-Gradienten: Nach Übersichtung von Lymphoprep mit der Blutprobe und Zentrifugation kann der weißlich erscheinende Ring (Interphase) aus Lymphozyten / Monozyten abpipetiert werden.

Die Auftrennung der PBMCs aus den Blutproben erfolgte unter sterilen Bedingungen, um die Lebens- und Vermehrungsfähigkeit der Zellen zu erhalten. Zur Isolierung der Lymphozyten wurden zunächst 7 ml Lymphoprep in ein 15 ml-Röhrchen pipettiert, dann mit 5 ml Heparinblut vorsichtig überschichtet, ohne das sich Blut und Gradient vermischten. Die überschichteten Lymphoprep-Röhrchen wurden anschließend für 30 min bei 2000 rpm bei Raumtemperatur (RT) ohne Bremse zentrifugiert. Die Gewinnung der PBMC aus der Interphase erfolgte durch steriles Abpipettieren des deutlich sichtbaren Zellrings zwischen Serum und Lyphoprep und Überführung in ein neues 15 ml-Röhrchen. Das Röhrchen wurde mit RPMI (oder PBS-steril) aufgefüllt. Nach Schütteln wurden die Röhrchen erneut für 10 min. bei 1300 rpm und RT zentrifugiert. Danach zeigten sich eine weiße Schicht (Lymphozyten) und ein roter Ring (Erythrozyten) am Boden der Röhrchen. Der Überstand wurde abpipettiert und es schloss sich ein erneuter Waschvorgang an. Dieser Vorgang wurde 3-mal wiederholt. Nach dem letzten Waschvorgang wurde der Überstand entfernt und die am Röhrchenboden verbliebenen Zellen mit 1 ml Kulturmedium (RPMI mit 10% FCS) je Röhrchen resuspendiert.

3.4.2 Zellzählung

Die Quantifizierung der Zellzahl innerhalb der präparierten Zellsuspension erfolgte nach einer 1:10 Verdünnung der Zellen. Hierzu wurden 10 µl Zellsuspension mit 90 µl Trypan-Blau-Lösung gemischt. Die Zellzahl wurde dann mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Vergrößerung: 400 x) bestimmt. Unter dem Mikroskop wurden nur die vitalen Lymphozyten gezählt, die sich als gleichförmige runde Zellen mit hellem Hof darstellen.

Die Unterscheidung zwischen toten und lebendigen Zellen wurde durch die Färbung mit dem 0,2 %igen Trypanblau ermöglicht. Die intakte Zellmembran kann durch diesen Farbstoff nicht durchdrungen werden, so dass geschädigte oder tote Zellen durch einen intensiven blauen Farbton erkennbar sind.

Die Zellzahl wurde nach der folgenden Formel errechnet:

$$\text{Anzahl Zellen / Eckquadrat} \times 10 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 10^4 = \text{Gesamtzahl / ml}$$

Die präparierte Zellsuspension wurde durch Zugabe von RPMI + 10% FCS auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt.

3.5 Stimulation von PBMC mit SEB und IGF-1

Als Stimuli wurden Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) und IGF-1 verwendet. Für die Zellkulturexperimente wurden 1 mg SEB in 2 ml sterilem PBS verdünnt und Aliquots der Stammlösung bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Es wurden $50 \mu\text{g}$ IGF-1 in 1ml sterilem PBS gelöst ($=50 \mu\text{g/ml}$) und die Aliquots der Stammlösung wurden bei -20°C tiefgefroren bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für die Stimulation wurde die IGF-1 Stocklösung 1:125 mit sterilem PBS verdünnt. Die Endkonzentration vom IGF-1 lag bei 4 ng/ml . Der Stimulationsversuch fand unter sterilen Bedingungen statt. Zuerst wurden 4 Polystyrol-Falcon-Röhrchen (15ml) beschriftet. In alle vier Röhrchen wurde jeweils 1ml von der eingestellten Zellsuspension pipettiert.

Das erste Röhrchen war die Leerwertkontrolle, in dieses Röhrchen wurden $10 \mu\text{l}$ RPMI + 10% FCS pipettiert, in Röhrchen 2 wurden $10 \mu\text{l}$ SEB (Endkonzentration von $5 \mu\text{g/ml}$), in Röhrchen 3, $10 \mu\text{l}$ IGF-1 und in Röhrchen 4 SEB und IGF-1 als Stimuli hinzugefügt und vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurden die Röhrchen mit einer fast waagerechten- 5° -Neigung in einen Ständer gestellt. Alle Inkubationsansätze wurden als Doppelbestimmungen in sterilen 15-ml Polystyrolröhrchen durchgeführt. Die Inkubation der Versuche erfolgte für 48 h bei 37°C im Brutschrank mit 5% CO_2 .

3.6 Durchflußzytometrie

3.6.1 Grundlagen der Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Das Prinzip der Durchflußzytometrie ist die simultane Messung verschiedener physikalischer und chemischer Eigenschaften einzelner Zellen oder Partikel, wobei sie hintereinander in einem Flüssigkeitsstrom angeordnet sind, aber einzeln untersucht werden.

Voraussetzung für eine durchflußzytometrische Analyse sind Zellen in Suspension und spezielle Fluoreszenzfarbstoffe, die mit einem Argonlaser bei 450 nm Wellenlänge angeregt werden. Das Emissionslicht für Fluoreszenzfarbstoffe kann gemessen werden. Das Gerät besteht aus einem Flusssystem, dem optischen System und dem Detektionssystem. Zur Analyse wird die in einem Probenröhrchen vorgegebene Zellsuspension über eine Stahlkapillare durch Überdruck in die Meßküvette eingeführt. Beim Eintreten in die Messkammer werden die Zellen durch die umgebende Trägerflüssigkeit stark beschleunigt, wodurch sich Aggregate auftrennen und die Zellen aneinandergereiht wie Perlen auf einer Schnur sequentiell den Analysenpunkt erreichen. Dieser Vorgang wird auch als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet.

Der Analysepunkt ist der Ort, an dem der Lichtstrahl (Laser) die Zellen im Bruchteil einer Sekunde erfasst, analysiert und klassifiziert.

Der anregende Teil besteht aus einem Argon-Laser, der blaues Licht der Wellenlänge 488 nm emittiert. Durch Linsen wird dieses Licht gebündelt und fällt exakt zentriert durch die Meßküvette. Hier trifft er auf die durchfließenden Partikel und regt die entsprechenden Flurochrome (Tabelle 1) an, welche dadurch Licht ihrer charakteristischen Wellenlänge emittieren. Das emittierte Licht wird durch ein System aus optischen Linsen, Filtern und Spiegeln so aufgetrennt, das letztlich 5 verschiedene Parameter detektiert werden können: Vorwärtsstreulicht (FSC = forward light scatter) als Maß für die Größe des Partikels, Seitwärtsstreulicht (SSC = side light scatter) als Maß für die Granularität (Granula, Membranen). Weiterhin werden bis zu 3 verschiedene Fluoreszenzbereiche für Grünfluoreszenz (FL1 530 nm), Orangefluoreszenz (FL2: 585 nm) und für Rotfluoreszenz (FL3: \pm 650nm) als Maß für die markierten Eigenschaften detektiert. (siehe Abb.9)

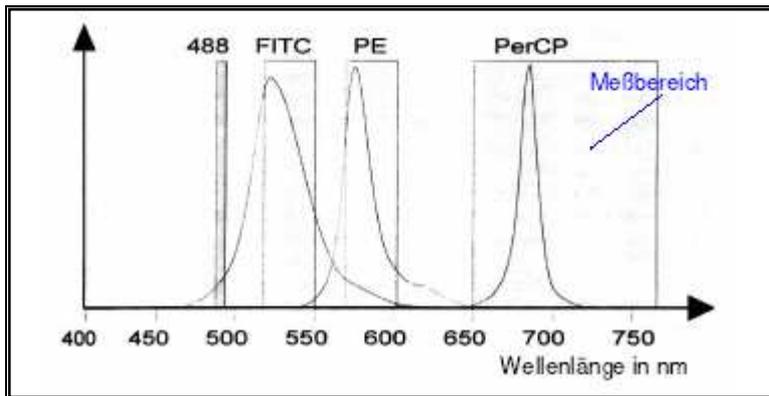


Abb. 9 : Emissionsspektrum der Fluoreszenzfarbstoffe FITC, PE und PerCP bei Anregung mit dem Argonlaser (Wellenlänge: 488nm).

Tab. 3: Angabe der Wellenlängen der Fluorochrome FITC, PE und TC

Fluorochrom	Max. Exzitation	Max. Emission	Farbe
Fluorescein (FITC)	488nm	520nm	Grün
Phycoerythrin (PE)	488nm	575nm	rot-orange
Tricolor (TC)	488nm	667nm	Dunkelrot

Das Vorwärtsstreulicht (Haupttrichtung des Laserstrahlers) ist am stärksten und wird über eine Photodiode gemessen. Die weiteren Parameter werden aus seitwärts abgelenkten Lichtanteilen gemessen, was in sog. Photomultiplier-Röhren (PMTs) erfolgt. In den nachgeschalteten elektronischen Komponenten erfolgt eine Verstärkung sowie eine Umwandlung des analogen Signals in ein digitales Messsignal (Analog-Digital-Konverter), woraus letztlich eine Auflösung der Signalintensität in 1024 verschiedene Kanäle (channel values) resultiert. Werden gleichzeitig 2 bzw. 3 Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt und gemessen, muß berücksichtigt werden, dass sich die Emissionsspektren der Fluorochrome teilweise überlappen, d.h. dass z.B. der Farbstoff FITC, der im Bereich für Fluoreszenz 1 gemessen wird, auch etwas in den Nachbarmessbereich für Fluoreszenz 2 hineinstrahlt und dort zum Messsignal beiträgt. Dies muß bei der Mehrfarbenmessung elektronisch „kompensiert“ werden, d.h. bei jedem Messsignal wird der Intensitätsanteil aus den Nachbarkanälen abgezogen (Raffael 1994).

3.6.2 Färbung der Oberflächenmarker an isolierten PBMC

Die Bestimmung des Phänotyps und Prozentanteils der isolierten T-Lymphozyten erfolgte mittels Markierung von verschiedenen Lymphozytenantigenen mit FITC- oder PE-markierten monoklonalen Antikörpern. Anschließend wurden die Zellen mit dem Durchflußzytometer analysiert. Zur Bestimmung der Hintergrundfärbung wurden Färbungen mit dem jeweiligen Antikörper-Isotyp als Kontrolle durchgeführt.

Von der Zellsuspension, die für die Stimulation vorgesehen waren, wurde 1 ml abgenommen und in ein Röhrchen pipettiert. Das Röhrchen wurde dann für 10 min bei 1400 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dann in ca. 500-1000 µl PBS resuspendiert. Danach wurden 6 FACS - Röhrchen vorbereitet und beschriftet. Von der Zellsuspension wurden dann in jedes Röhrchen 100 µl pipettiert.

In das erste Röhrchen der Isotypkontrolle wurden jeweils 10µl Maus-IgG1-AK (FITC) und 10 µl Maus-IgG1-AK (PE) hinzupipettiert. In das zweite Röhrchen wurden 10 µl anti-CD3-AK (FITC) und 10 µl anti-CD28-AK (PE) hinzupipettiert. In das Röhrchen Nr. 3 wurde 10 µl anti-CD3-AK (FITC) und 10 µl anti-IGF-1 R-AK (PE) hinzupipettiert. Als zweite Isotypkontrolle wurden in das vierte Röhrchen 10 µl Ratte-IgM-AK (FITC) und 10 µl Maus-IgG1-AK(PE) zur Zellsuspension hinzupipettiert. Weiterhin wurden in das fünfte Röhrchen jeweils 10 µl anti-CLA-AK(FITC) und 10 µl anti-CD28-AK(PE) hinzugegeben. In das letzte Röhrchen wurden 10 µl anti-CLA-AK(FITC) und 10 µl anti-IGF-1 R(PE) hinzupipettiert. Danach wurde jedes Röhrchen geschüttelt und dann für 20-30 min. zur Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert. Nach der Inkubationszeit wurde in jedes Röhrchen 2 ml Waschpuffer (CellWash) pipettiert und noch mal für 10 min. bei 1300-1400 rpm und RT zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde dieser Waschschrift anschließend noch einmal wiederholt. Im letzten Schritt wurden nach der Zentrifugation der Überstand verworfen und das Sediment in 0,5 ml Puffer aufgenommen und im FACS Durchflußzytometer gemessen.

3.6.3 Färbung der Oberflächenmarker (an stimulierten PBMC)

Die aus dem Brutschrank entnommenen Röhrrchen wurden zunächst bei 1400 rpm für 10 min. zentrifugiert. Die Überstände wurden abpipetiert und das Sediment wurde mit 1000 µl PBS resuspendiert. Für jedes Stimulationsröhrrchen wurden 6 FACS-Röhrrchen vorbereitet und in jedes Röhrrchen wurden 100 µl von der stimulierten Zellsuspension hineinpipettiert. Die Markierung der stimulierten PBMC erfolgte ebenfalls mit an die Fluoreszenzfarbstoffe FITC und PE gekoppelten monoklonalen Antikörper wie unter 2.6.2. beschrieben und anschließend mit dem Durchflußzytometer gemessen.

3.6.4 Messung mit dem Durchflußzytometer

Bevor eine Messung am Durchflußzytometer durchgeführt werden konnte, mußte eine Vorbereitung sowie entsprechende Einstellungen des Gerätes erfolgen (= Instrument Settings). Der Laser musste aufgewärmt, die Flüssigkeitsbehälter des Flusssystems mussten überprüft und dann entsprechend aufgefüllt werden. Weiterhin musste eine softwaregesteuerte Gerätekalibrierung, die Einrichtung des Messbildschirms und die Überprüfung bzw. Nachjustierung der Einstellungen anhand der „Null-Probe“ erfolgen.

Die Messung einer Probenreihe erfolgte direkt hintereinander, wobei die Datenaquisition am Messbildschirm mitverfolgt wurde. Die Geräteeinstellungen wurden fortlaufend kontrolliert. Während der Messung wurde eine vorher gewählte Anzahl von Ereignissen in einer elektronischen Datei auf der Festplatte des PCs gespeichert. Nach Erreichen der gewünschten Zellzahl (20.000 gezählte Zellen) wurde die Messung automatisch beendet. Die auf die Festplatte gespeicherten Dateien (sog. Listmode-Dateien) werden durch eine spezielle Auswerte-Software (CellQuest, BD, Heidelberg) analysiert.

Die Einzelparameter wurden zur Auswertung in Diagrammen dargestellt, wie dies auch für den Aufbau des Messfensters zur Live-Darstellung während der Datenaquisition erfolgte.

3.7 Statistische Analyse

Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm SPSS 11.5 durchgeführt. Zur Prüfung der Unterschiede zweier unabhängiger Stichproben aus derselben Grundgesamtheit wurde der parameterfreie Mann-Whitney-Test durchgeführt. Der Wilcoxon-Test wurde für verbundene Stichproben angewendet. Hier handelt es sich auch um einen nicht-parametrischen Test, der nicht voraussetzt, dass die Messgrößen normal verteilt sind. Die Korrelationen wurden mit dem Kendall-Tau-b Test berechnet.

4. ERGEBNISSE

4.1 Ergebnisse der Mediatorbestimmung im Plasma

4.1.1 Plasmaspiegel von sE-Selektin

Die sE-Selektin-Spiegel im Serum zeigten bei Männern keine lineare Beziehung zum Alter. Die Serumkonzentrationen wiesen allerdings eine Tendenz zur Abnahme mit zunehmendem Alter ($r = -0,144$; $p = 0,276$) auf (siehe Abb. 10).

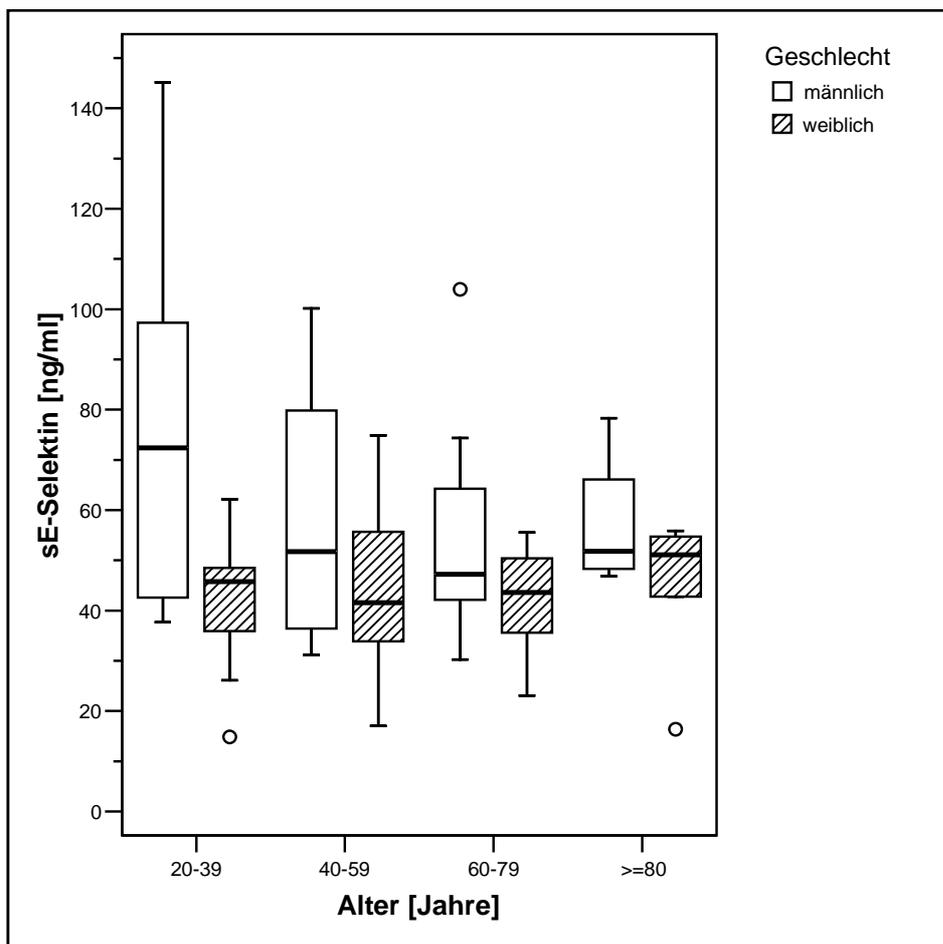


Abb. 10: Boxplot für die Abhängigkeit des sE-Selektin vom Alter: Die weißen Kästen repräsentieren die Werte der männlichen Probanden und die gestreiften die der weiblichen Probanden.

Auch bei den Frauen zeigte der sE-Selektinspiegel keine signifikante Korrelation zum Alter. Hier lag der Korrelationskoeffizient bei 0,028 ($p = 0,796$). Der Median der sE-Selektinwerte bei männlichen Probanden sank von 72,32 ng/ml bis auf 51,83 ng/ml mit zunehmendem Alter ab. Der Median bei den Frauen zeigt im Alter eine eher ansteigende Tendenz von 45,78 ng/ml auf bis zu 51,10 ng/ml. Der mediane sE-Selektin

Wert zeigte bei den jungen Probanden einen deutlichen Unterschied zwischen Männern und Frauen. Bei den älteren Probanden hingegen bestand kein geschlechtsspezifischer Unterschied mehr. Im Alter von über 80 Jahren lag der Median bei den männlichen Probanden bei 51,83 ng/ml und bei den weiblichen Probanden bei 51,10 ng/ml.

4.1.2 Plasmaspiegel von sICAM-1

Die Plasmaspiegel des löslichen Adhäsionsmoleküls sICAM zeigten sowohl bei den Männern als auch bei den Frauen eine schwach positive, jedoch nicht signifikante Korrelation mit dem Alter. Die sICAM-Spiegel aller Gruppen sind vergleichend in Abbildung 11 dargestellt.

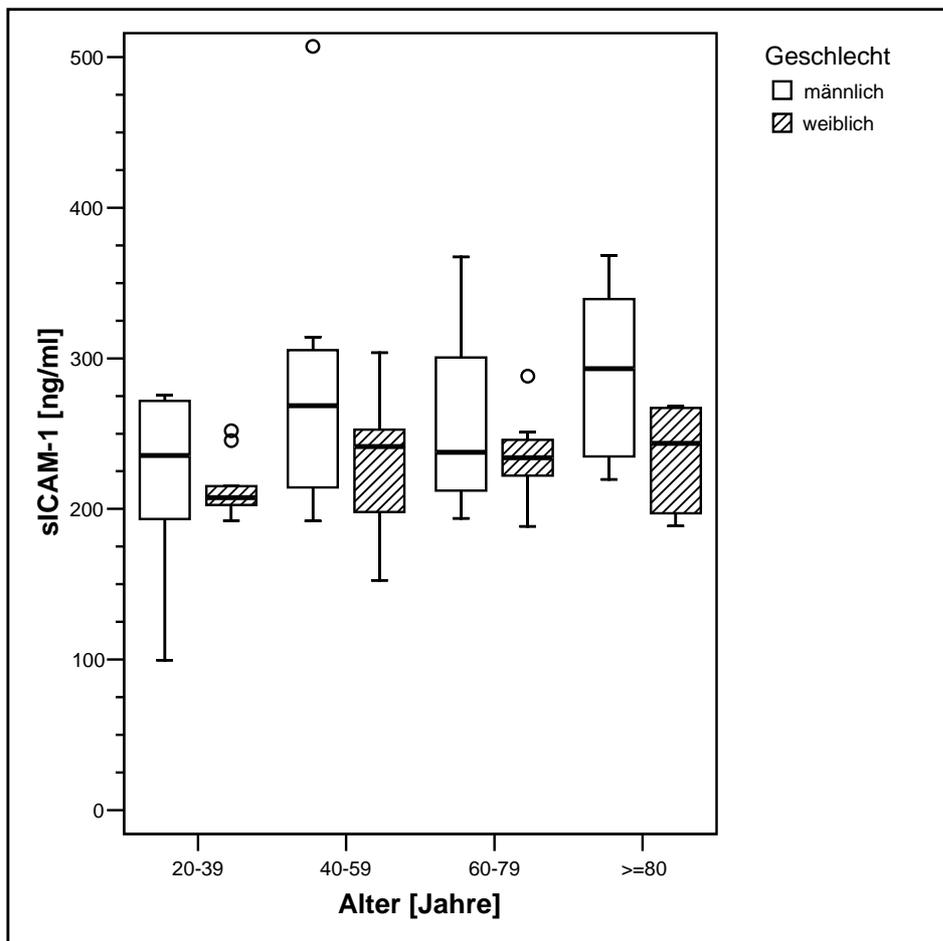


Abb. 11 : Boxplot für die Abhängigkeit des sICAM-1 vom Alter

Der Korrelationskoeffizient lag bei den Männern bei 0,193 ($p=0,138$), bei den Frauen bei 0,122 ($p=0,266$). Der Median des ICAM-1 der männlichen Probanden stieg von 235,47 ng/ml bis auf 293,04 ng/ml mit zunehmendem Alter der Probanden an. Der mediane sICAM-1 Wert bei alten Probanden zeigte keinen geschlechtsspezifischen Unterschied. Nur die über 80 jährigen zeigten einen größeren, aber auch nichtsignifikanten geschlechtsspezifischen Unterschied. Bei den männlichen Probanden lag der Median bei 293,04 ng/ml und bei den weiblichen Probanden bei 243,63 ng/ml.

4.1.3 Plasmaspiegel von sVCAM-1

Die sVCAM-1 Spiegel aller Gruppen sind vergleichend in der Abbildung 12 dargestellt. Bei dem löslichen Adhäsionsmolekül sVCAM-1 zeigte sich bei den männlichen und bei den weiblichen Probanden eine schwach positive und signifikante Korrelation in Abhängigkeit zum Alter. Das heißt je älter die Menschen werden, desto mehr stieg der sVCAM-1 Spiegel an.

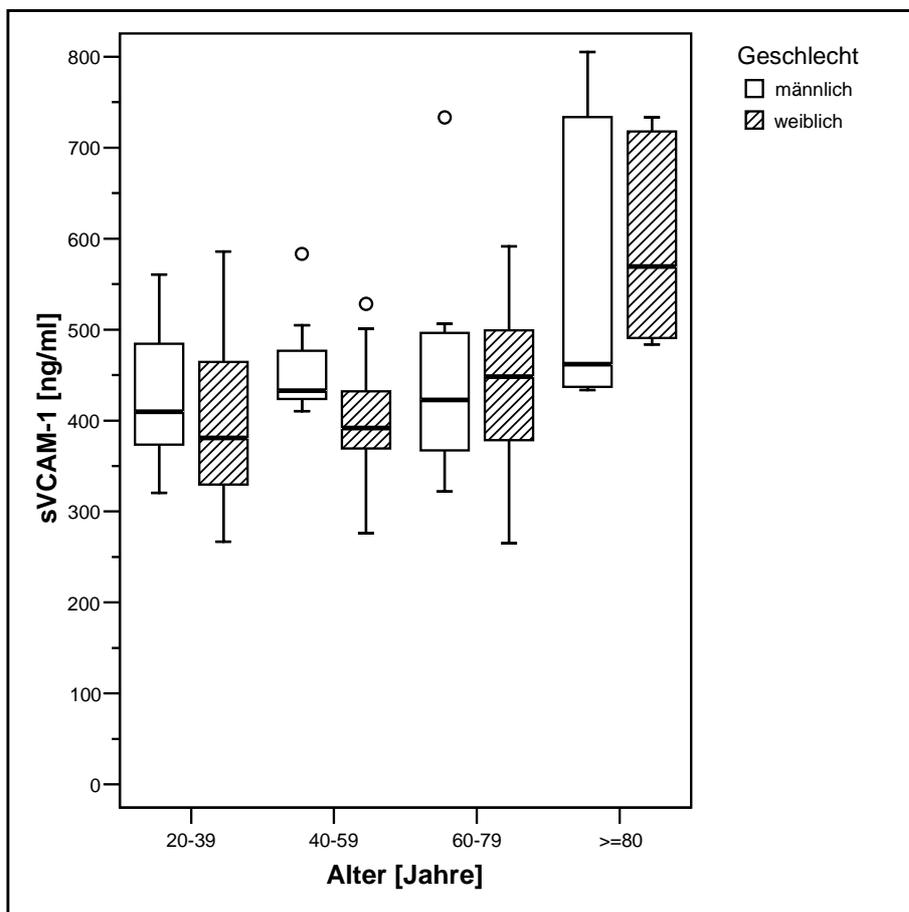


Abb. 12 : Boxplot für die Abhängigkeit des sVCAM-1 vom Alter

Der Korrelationskoeffizient lag bei den männlichen Probanden bei 0,248 ($p=0,056$). Bei den weiblichen Probanden lag der Korrelationskoeffizient bei 0,370 ($p=0,001$). Der Median des sVCAMs stieg von 409,78 ng/ml bis auf 461,95 ng/ml mit zunehmendem Alter an. Die Medianwerte des sVCAMs der weiblichen Probanden stiegen von 380,78 ng/ml bis auf 569,42 ng/ml mit zunehmendem Alter an. Im Alter von über 80 Jahren zeigte sich der größte geschlechtsspezifische Unterschied hinsichtlich des Medianwertes.

4.1.4 Plasmaspiegel von IGF-1

Die IGF-1-Konzentrationen im Serum sanken bei beiden Geschlechtern mit zunehmendem Alter ab. Die IGF-1 Spiegel aller Gruppen sind in der Abbildung 13 dargestellt.

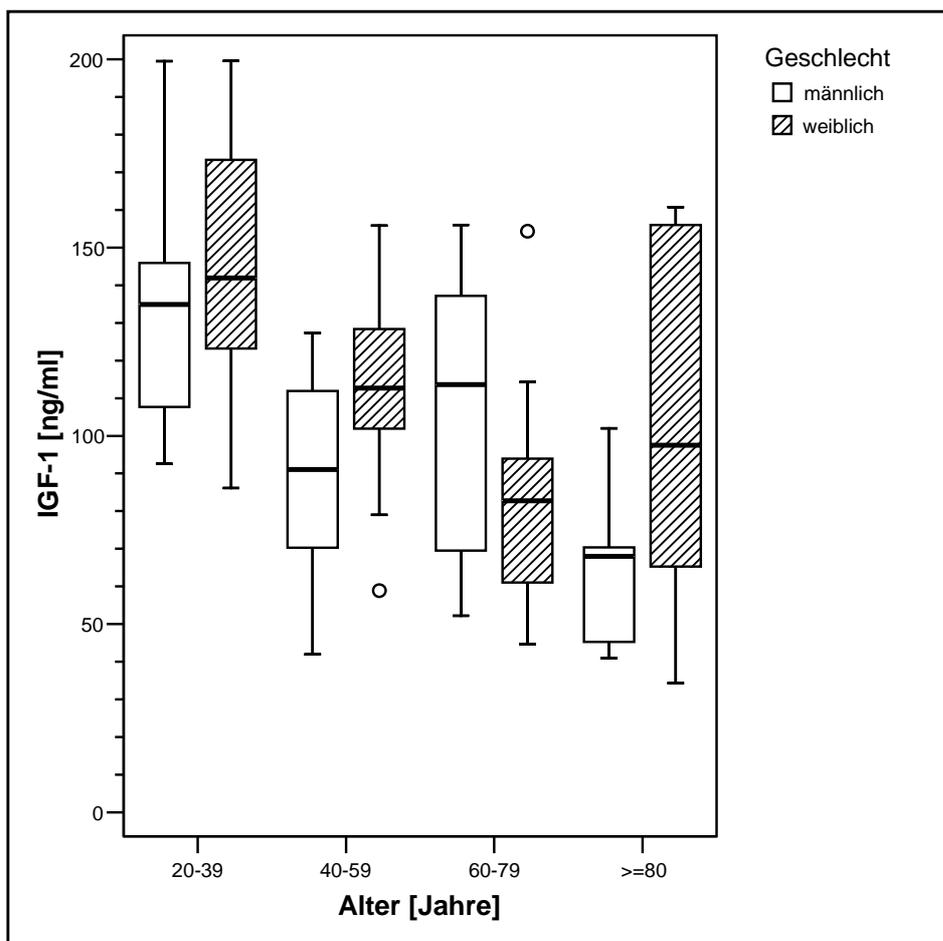


Abb. 13 : Boxplot für die Abhängigkeit des IGF-1 vom Alter

Der Korrelationskoeffizient der männlichen Probanden lag bei -0,39 ($p=0,003$), während er bei den weiblichen Probanden bei -0,39 ($p<0,0001$) lag. Der Median der IGF-1-Konzentration nahm mit zunehmendem Alter von 134,89 $\mu\text{g/L}$ bis auf 68,02 $\mu\text{g/L}$ ab. Bei den Frauen lag der Median bei den jüngeren Probanden bei 141,91 $\mu\text{g/L}$ und sank bei den Alten bis auf 97,48 $\mu\text{g/L}$ ab.

4.1.5 Plasmaspiegel von hGH

Bei den hGH-Konzentrationen zeigten sich zwischen den männlichen und weiblichen Probanden erhebliche Unterschiede.

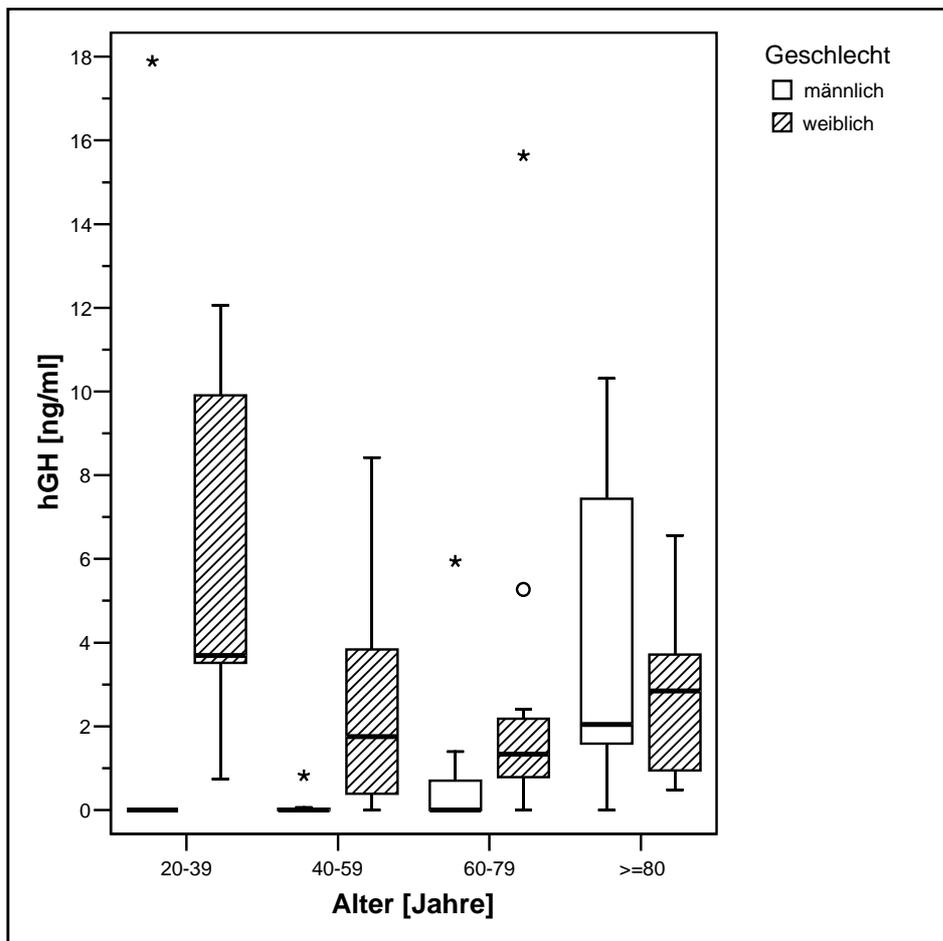


Abb. 14 : Boxplot für die Abhängigkeit des hGH vom Alter

Bei den männlichen Probanden zeigte sich eine positiv signifikante Korrelation zum Alter. Der Korrelationskoeffizient lag bei 0,348 ($p= 0,017$). Bei den weiblichen

Probanden zeigte sich eine gegenläufige, aber nicht signifikante, Korrelation der hGH-Konzentration mit zunehmendem Alter. Der Korrelationskoeffizient lag bei -0,212 ($p=0,057$). Die hGH-Spiegel aller Gruppen sind vergleichend in der Abbildung 14 dargestellt.

Bei den Frauen lag der Median der hGH-Konzentration bei 3,692 $\mu\text{U/ml}$ und sank mit zunehmendem Alter bis auf 2,846 $\mu\text{U/ml}$ ab. Bei den jungen männlichen Probanden lag der Median bei 0 $\mu\text{U/ml}$ und stieg im Alter bis auf 2,046 $\mu\text{U/ml}$ an.

4.2 Veränderung der Oberflächenmarker bei stimulierten PBMC

In Abbildung 15 sind die Anteile der Oberflächenrezeptoren bei den unstimulierten PBMC dargestellt. Es zeigte sich, dass sowohl bei den jungen als auch bei den älteren Patienten der Anteil der CD3+CD28+ T-Zellen prozentual am höchsten war. Die jüngeren Probanden zeigten einen etwas größeren Anteil als die > 60-jährigen.

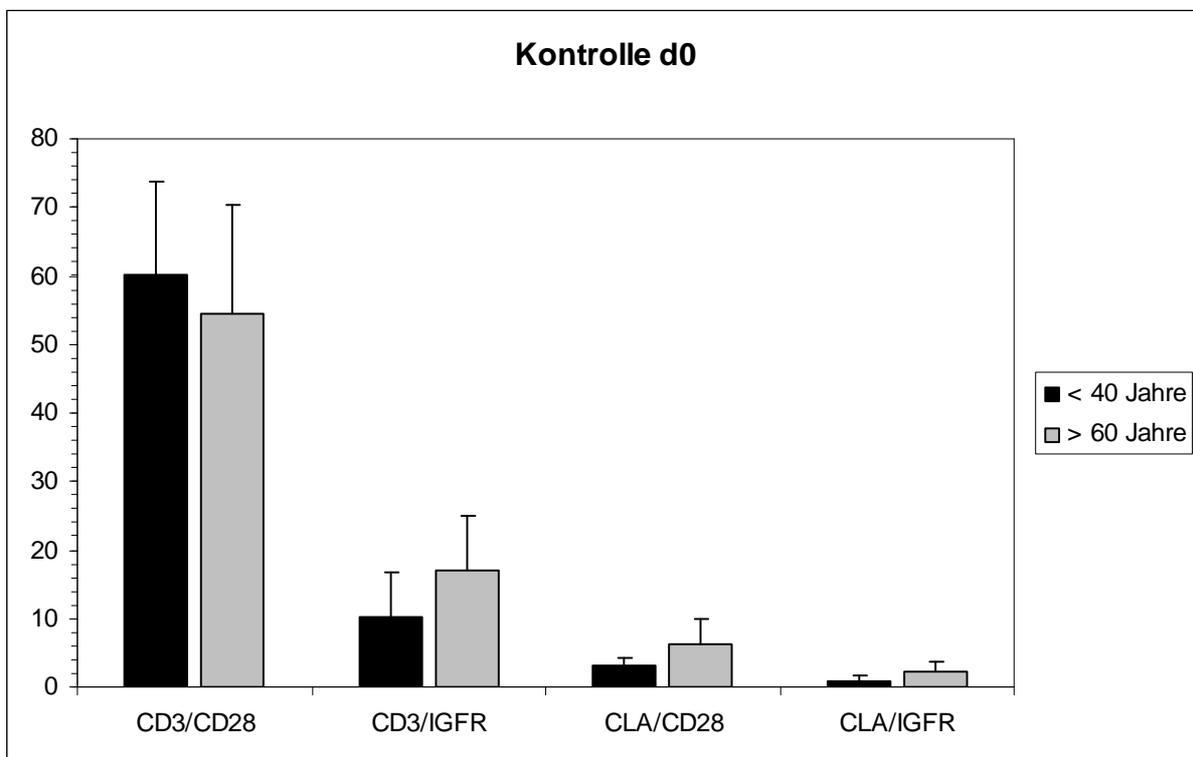


Abb. 15: Anteil der Oberflächenrezeptoren an Nicht-Stimulierten PBMC. Die Graphik zeigt die Ergebnisse aller gesunden Patienten im Alter von < 30 Jahre und > 60 Jahren.

Den zweithöchsten Anteil der T-Lymphozyten zeigten die CD3+IGF-R+ markierten Zellen, wobei in diesem Fall die jüngeren einen niedrigeren Anteil als die älteren

Probanden aufwiesen. Die CLA+CD28+ T-Lymphozyten zeigten eine etwas höhere Quote als die CLA+IGF-R+ T-Lymphozyten. In beiden Fällen zeigte sich bei den älteren Probanden ein etwas höherer Anteil als bei den jüngeren Probanden.

4.2.1 Veränderung der Oberflächenmarker CD3/CD28 durch Stimulation

In den folgenden Experimenten wurden periphere Blutlymphozyten (PBMC) durch unterschiedliche Stimulationsfaktoren wie SEB, IGF-1 und SEB+IGF-1 stimuliert, um Einflüsse von Stimulationsfaktoren auf die zelluläre Immunität zu untersuchen.

Die Konzentrationen der CD3/CD28-positiven T-Lymphozyten aller Gruppen sind vergleichend in der Abbildung 16 dargestellt. Es zeigte sich, dass es in beiden Populationen nach einer Stimulation durch SEB, IGF-1 und SEB+IGF-1 zu einer Vermehrung der CD3/CD28-markierten T-Lymphozyten kam.

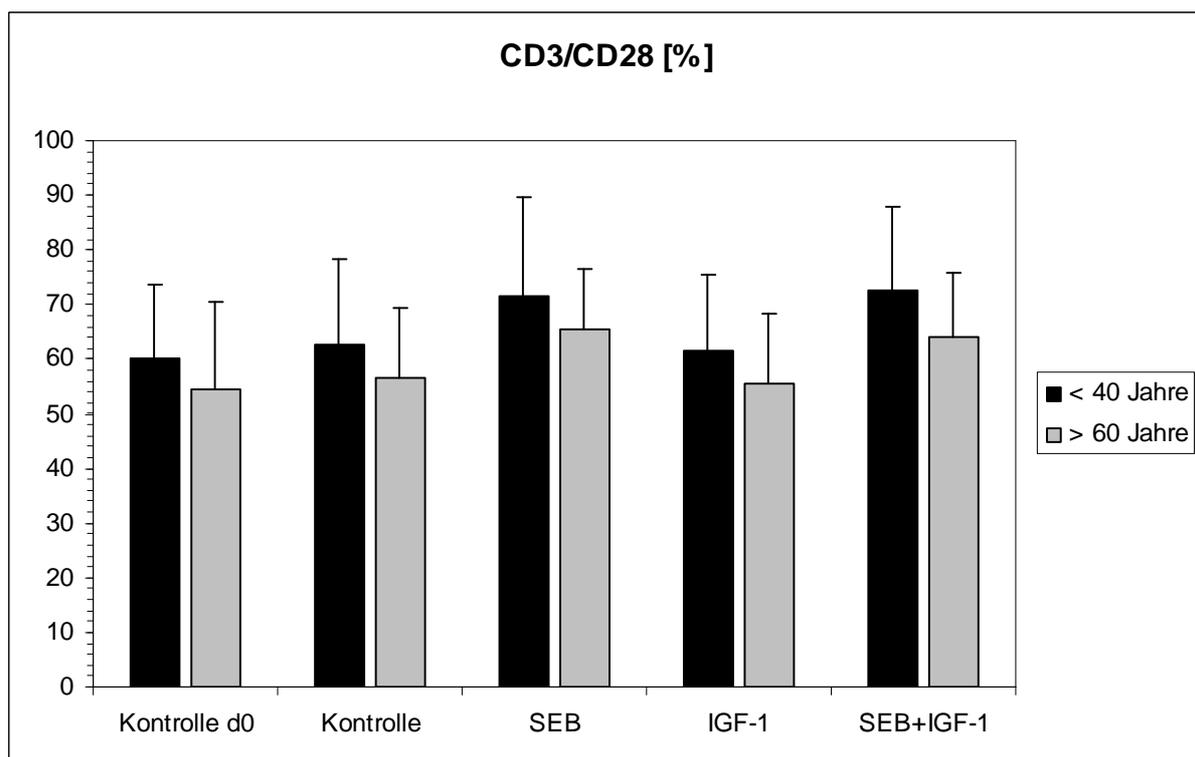


Abb. 16 : Anteil der CD3/CD28 T-Zellen vor und nach der Stimulation

Die älteren Probanden hatten insgesamt weniger CD3/CD28-positiv T-Lymphozyten als die jüngeren Probanden. Es fiel auf, dass in beiden Gruppen die Stimulation mit SEB und SEB+IGF-1 effektiver war, als nur mit IGF-1. Durch die Stimulation mit SEB

kam es bei den jungen Testpersonen zu einer Vermehrung des Mittelwerteswertes von insgesamt 61,59 % auf 78,49 % ($p= 0,028$), bei den älteren Probanden zu einer Vermehrung des Mittelwerteswertes von 53,00 % auf 61,15 % ($p= 0,028$). Bei der Stimulation mit SEB+IGF-1 zeigten sich, im Vergleich zu der Stimulation nur mit SEB, geringe Unterschiede. Bei den jungen Probanden kam es zu einem Anstieg des Mittelwerteswertes von 61,59 % auf 77,65 % ($p= 0,028$) und bei den älteren Probanden von 53,00 % auf 59,37 % ($p= 0,028$). Die Stimulation mit IGF-1 brachte nur geringe Veränderungen der CD3+CD28+ markierten T-Zellen. Bei den jungen Probanden stiegen die Mittelwerte von 61,59 % auf 66,01 % ($p= 0,92$) und bei den älteren Probanden von 53,00 % auf 56,73 % ($p= 0,917$).

4.2.2 Veränderung der Oberflächenmarker CD3/IGF-R durch Stimulation

Bei den CD3+IGFR+ positiven T-Lymphozyten fiel auf, dass der Anteil der unstimulierten Zellen bei den älteren Testpersonen größer war als bei den jüngeren.

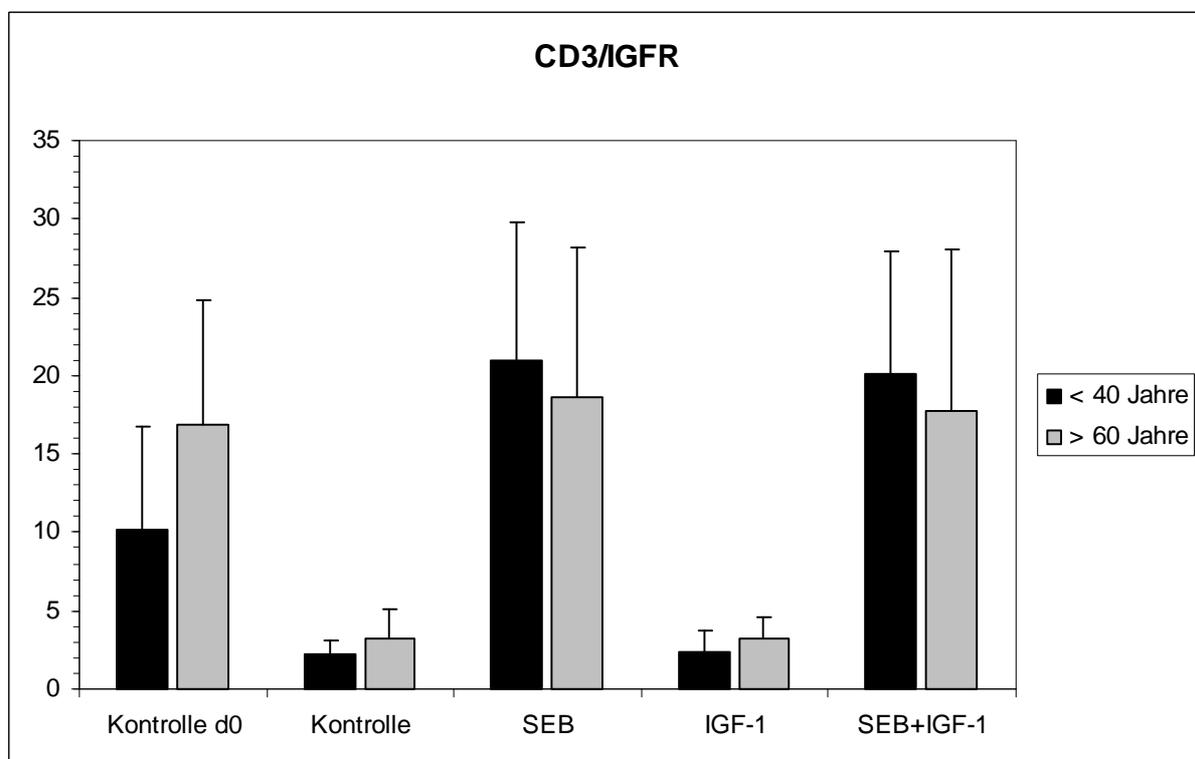


Abb. 17 : Säulendiagramm: Anteil der CD3/IGF-R T-Zellen vor und nach der Stimulation

Die Stimulation dieser Zellen führte bei allen drei Stimulationsversuchen dazu, dass der

Anteil der Zellen bei den jüngeren Probanden höher lag als bei den älteren Probanden. Die CD3/IGFR Spiegel aller Gruppen sind vergleichend in der Abbildung 17 dargestellt. Die Stimulation mit SEB und SEB+IGF-1 zeigte eine Vermehrung der CD3+IGFR T-Lymphozyten, wobei die Stimulation der jüngeren Testpersonen zu einer stärkeren Vermehrung der Zellen führte als bei den älteren. Der Mittelwertwert erhöhte sich bei den Jüngeren unter der Stimulation mit SEB von 10,16 % auf 17,88 % ($p= 0,028$), bei den älteren Probanden von 14,68 % auf 21,18 % ($p= 0,75$).

Nach der Stimulation mit SEB+IGF-1 kam es zu einem Anstieg bei den jüngeren Probanden von 10,16 % auf 20,97 % ($p= 0,075$), bei den älteren Probanden von 14,68% auf 23,36 % ($p= 0,917$).

Unter der Stimulation mit IGF-1 verminderte sich der Mittelwertwert, genauso wie bei den unstimulierten Zellen nach der Inkubation (Kontrolle). Er sank bei den jüngeren von 10,16 % auf 2,54 % ($p= 0,045$), bei den älteren Probanden von 14,68 % auf 2,86 % ($p= 0,917$).

4.2.3 Veränderung der Oberflächenmarker CLA/CD28 durch Stimulation

Die Analyse der CLA+CD28+ T-Lymphozyten zeigte bei den unstimulierten Proben der älteren Probanden einen insgesamt größeren Anteil als bei den jüngeren Individuen.

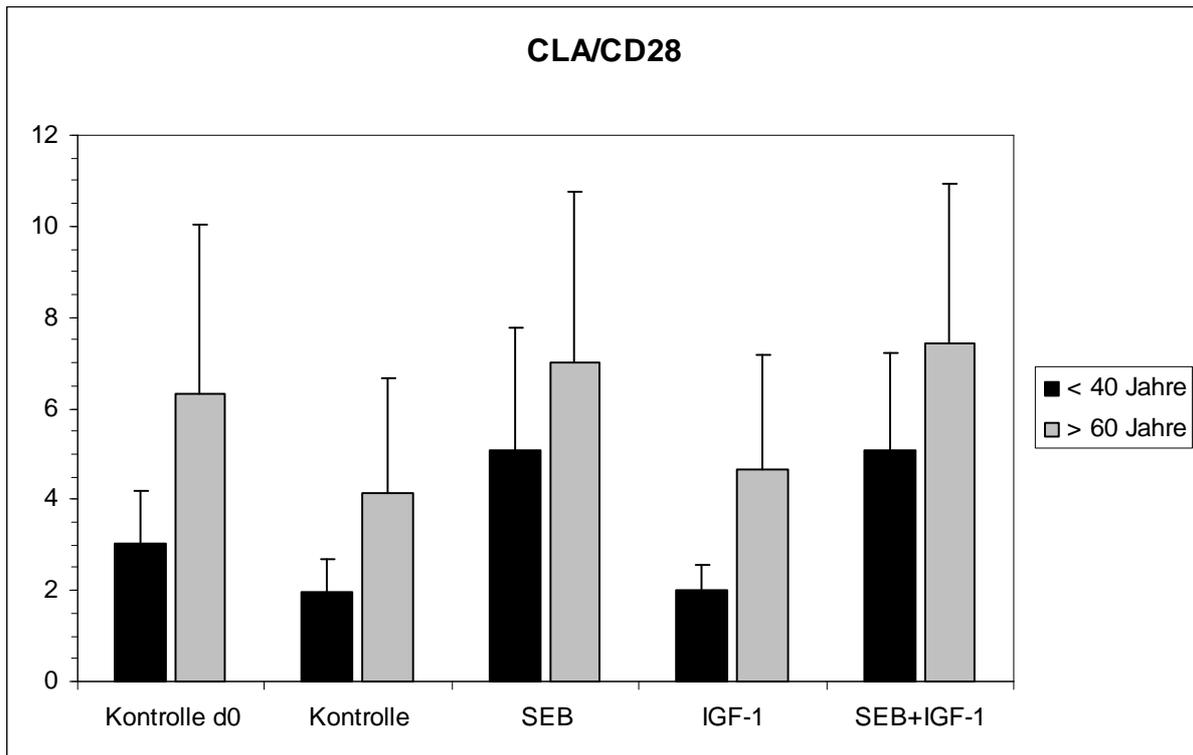


Abb. 18 : Säulendiagramm: Anteil der CLA/CD28 T-Zellen vor und nach der Stimulation

Die Stimulation der Proben mit SEB und mit SEB+IGF-1 führte zu einem Anstieg der Zellpopulationen bei den jüngeren und auch bei den älteren Patienten. Auch hier war die Stimulation der CLA+CD28+ T-Lymphozyten mit IGF-1 nicht effektiv, denn die Zellzahl lag unterhalb der Werte der Kontrollprobe. Unter der Stimulation mit SEB zeigte sich ein Anstieg bei den jüngeren Probanden von 3,04 % auf 4,27 % ($p= 0,046$) und bei den älteren Probanden von 6,98 % auf 7,06 % ($p= 0,207$). Die Stimulation mit SEB+IGF-1 führte zu einem Anstieg der Zellen bei den jüngeren von 3,04 % auf 4,61 % ($p= 0,046$) und bei den älteren Probanden von 6,98 % auf 7,90 % ($p= 0,116$).

Durch die Stimulation mit IGF-1 kam es zu einer Verminderung der Zellen bei den jüngeren von 3,04 % auf 1,93 % ($p= 0,075$) und bei den älteren von 6,98 % auf 5,25 % ($p= 0,028$).

4.2.4 Veränderung der Oberflächenmarker CLA/IGF-R durch Stimulation

Bei der Analyse der CLA+IGFR T-Lymphozyten zeigte sich bei den unstimulierten Zellen ein größerer Anteil bei den älteren Patienten im Vergleich zu den jüngeren Patienten.

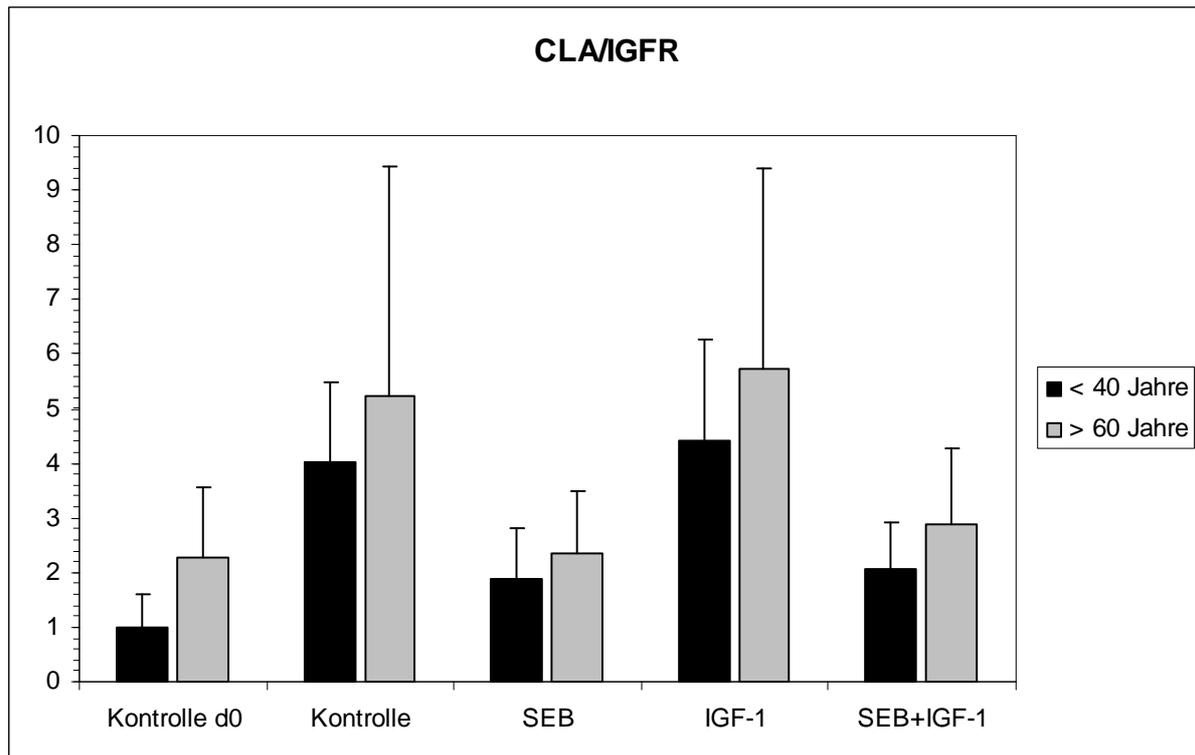


Abb. 19 : Säulendiagramm: Anteil der CLA/IGFR T-Zellen vor und nach der Stimulation

Aufgefallen ist, dass es in diesem Versuchsteil zu einem geringen Anstieg der Zellen unter der Stimulation mit SEB und SEB+IGF-1 kam, wohingegen die Stimulation mit IGF-1 zu einer stärkeren Vermehrung der Zellen führte. Auch die nicht-stimulierten Zellen proliferierten nach der Inkubation. Bei der Stimulation durch SEB stieg der Mittelwert nicht signifikant bei den jüngeren Probanden von 1,00 % auf 1,73 % an ($p=0,116$) und bei den älteren von 2,15 % auf 2,70 % ($p=0,917$).

Die Stimulation durch SEB+IGF-1 zeigte einen Anstieg des Mittelwertes bei den jüngeren von 1,00 % auf 1,92 % ($p=0,046$) und bei den älteren Testpersonen von 2,15 % auf 2,99 % ($p=0,093$).

Durch IGF-1 kam es zu einem Anstieg bei den jüngeren von 1,00 % auf 3,99 % ($p=0,028$) und bei den älteren Probanden von 2,15 % auf 5,40 % ($p=0,046$).

5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden die Veränderungen der T-Lymphozyten in Abhängigkeit vom Alter untersucht. In der Literatur werden sowohl altersabhängige Veränderungen der Zusammensetzung der T-Zellen-Population als auch der Funktion der T-Lymphozyten beschrieben (Abbas et al. 1996). Damit werden die höhere Anfälligkeit von älteren Menschen für Infekte, Autoimmunreaktionen und Karzinomen begründet (Castle et al. 2000).

Im ersten Teil der Arbeit wurden mit einem Enzymimmunoassay die Konzentrationen verschiedener löslicher Adhäsionsmoleküle und von Wachstumshormonen (humanes GH, IGF-1) im Serum in Abhängigkeit vom Alter der Probanden untersucht. Im zweiten Teil der Arbeit wurden mit der Durchflußzytometrie und mit monoklonalen Antikörpern die Expression von unterschiedlichen Oberflächenrezeptoren auf Lymphozyten vor und nach Stimulation mit IGF-1 und SEB, ebenfalls in Abhängigkeit vom Alter, untersucht. Ziel der Arbeit war es, mögliche Unterschiede zwischen kutanen (CLA+) und zirkulierenden (CLA-) T-Lymphozyten herauszuarbeiten.

5.1 Die Expression der Adhäsionsmoleküle im Alter

Die wichtigsten Adhäsionsmoleküle, die bei der Migration der Lymphozyten aus dem Blut in das geschädigte Gewebe eine wichtige Rolle spielen, sind E-Selektin, ICAM-1 und das V-CAM-1 (Springer 1990; Carlos u. Harlan 1994). Nach Anbindung des E-Selektins wandert die T-Zelle im Rahmen der Zelladhäsionskaskade durch das Endothel der peripheren Gefäße in die Haut oder in ein anderes perivaskuläres Gewebe. Zu einer erhöhten Konzentration dieser Moleküle kommt es hauptsächlich durch proinflammatorische Zytokine wie $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, $TNF\beta$ und IL-1, die dann die Zelladhäsionskaskade aktivieren (Springer 1990; Carlos u. Harlan 1994; Richter et al. 2003). Die löslichen Adhäsionsmoleküle entstehen durch Spaltung aus membranständigen Vorstufen, sowohl an Endothelzellen als auch auf der Oberfläche von Leukozyten. Die Spaltung der löslichen Adhäsionsmoleküle geschieht durch Proteolyse (del Pozo et al. 1994).

Erhöhte Konzentrationen der löslichen Adhäsionsmoleküle sind bei zahlreichen Erkrankungen wie Infektionen, systemischen Vaskulitiden, Neoplasien und nach Transplantationen nachgewiesen worden (Gearing u. Newman 1993). Physiologische Veränderungen bei gesunden Menschen sind wenig untersucht.

In einer Studie von Richter et al. (2003) wurden diese Adhäsionsmoleküle bei gesunden Patienten und bei Patienten mit unterschiedlichem Gefäßprofil in Abhängigkeit zum Alter bestimmt. Der Hintergrund dieser Studie war, dass man in vorherigen Studien erhöhte Konzentrationen von VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin bei Individuen mit erhöhtem Risikoprofil für Atherosklerose und periphere arterielle Verschlusskrankheit gefunden hatte. Das Ziel war es herauszufinden ob Adhäsionsmoleküle als Parameter des Alterns oder sogar als Markerproteine für bestimmte Erkrankungen in Frage kommen.

Das Altern selber ist mit einigen strukturellen und funktionellen Veränderungen der endothelialen Gefäßwand vergesellschaftet, wobei diese Veränderungen zu einer erhöhten Anfälligkeit für atherosklerotische Erkrankungen beitragen können. Die genauen Mechanismen und Veränderungen in Abhängigkeit zum Alter sind im genauen jedoch noch unklar.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten eine Zunahme von VCAM-1 und ICAM-1 in Abhängigkeit vom Alter, wobei sich nur bei VCAM-1 auch eine Zunahme der Serumkonzentration bei den Probanden mit erhöhtem kardiovaskulärem Risikoprofil (Patienten mit KHK und pAVK) zeigten. Es kam auch bei den Probanden mit gutem kardiovaskulärem Gefäßprofil (Vegetarier) zu einem Anstieg des VCAM-1. Also scheint das VCAM-1 ein altersabhängiger Parameter zu sein, der unabhängig vom kardiovaskulären Gefäßprofil vermehrt im Alter synthetisiert oder abgespalten wird. Geschlechtsspezifische Unterschiede wurden in dieser Studie nicht erhoben (Richter et al. 2003). Die Serumkonzentrationen des Adhäsionsmoleküls E-Selektin zeigten keine Veränderungen im Alter.

VCAM-1 wird vom unstimuliertem Endothel praktisch nicht exprimiert. Erst die Stimulation durch proinflammatorische Zytokine führt zum Anstieg der VCAM-1 Konzentration (Mutin et al. 1997).

Der Anstieg des sVCAM-1 und des sICAM-1 im Alter könnte daher mit einer veränderten Zytokinproduktion im Alter zusammenhängen. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Leukozyten älterer Individuen nach Stimulation mit

Lipopolysacchariden höhere Mengen an Zytokinen wie IL1 und IL6 sowie TNF-alpha ausschütten als Leukozyten jüngerer Individuen (Rink et al. 1998). Im Rahmen einer anderen Studie ließ sich bei Rhesusaffen ebenfalls eine altersabhängige Zunahme der IL-6 Konzentration durch stimulierte Leukozyten nachweisen (Mascaruccil et al. 2001). Die ansteigenden VCAM-1 Konzentrationen im Alter könnten auch eine mögliche Erklärung für die zunehmende entzündliche Aktivität sein. Das Altern scheint nämlich mit einer erhöhten entzündlichen Aktivität verbunden zu sein, die möglicherweise die beobachtete Zunahme der VCAM-1 Konzentrationen im Alter als Antwort auf eine entzündliche Reaktion reflektieren. Solch ein positiver Feedbackmechanismus könnte eine bedeutende Rolle im Rahmen der entzündlichen Reaktionen bei der Atherosklerose und auch bei anderen pathologischen Prozessen im Alter spielen. Die Daten der vorliegenden Untersuchung könnten also die Annahme unterstützen, dass, VCAM-1 auch ein Marker der Immunoseneszenz ist.

Unsere Versuche bestätigten die signifikante Zunahme der sVCAM-1 Konzentration im Alter. Geschlechtsspezifische Unterschiede ließen sich dabei nicht nachweisen. Eine Ursache der erhöhten VCAM-1 Synthese im Alter, könnte auf der Transkriptionsebene liegen. Die Expression der Gene für die Adhaesionsmoleküle wird durch den Transkriptionsfaktor NF κ B gesteuert. Die Aktivierung des NF κ B Gens führt zur Synthese von Mediatoren wie IL-1 und IFN γ und im weiteren Verlauf zur Induktion der VCAM-1 Synthese. In Studien wurde belegt dass dieses Gen durch Oxydantien aktiviert werden kann. Antioxydantien haben eine eher hemmende Wirkung auf das Gen. Da es im Alter zur Vermehrung von Oxydantien kommt, könnte dies auch ein Grund für die erhöhten VCAM-1 Konzentrationen im Alter sein (Richter et al. 2003).

Im Gegensatz zu VCAM-1 zeigten die Serumkonzentrationen von sICAM-1 eine leicht positive, jedoch nicht signifikante Korrelation mit dem Alter. Die sE-Selektin Konzentrationen zeigten auch bei unseren Versuchen keine Abhängigkeit vom Alter. Die sE-Selektinwerte der Männer waren eher ansteigend und die der Frauen zeigten eine sinkende Tendenz mit zunehmendem Alter.

Zusammenfassend konnten wir eine signifikante Korrelation des sVCAM mit zunehmendem Alter nachweisen. Weiterhin ließ sich eine schwach positive, jedoch nicht signifikante Korrelation der sICAM-Konzentration nachweisen. Bei der sE-Selektinbestimmung zeigte sich keinerlei Abhängigkeit vom Alter.

Über die funktionelle Bedeutung der altersabhängigen Zunahme des sVCAM und des s-ICAM lassen sich nur Vermutungen anstellen. Weitere Studien sind erforderlich, um diese Fragen zu beantworten.

5.2 IGF-1 und hGH Konzentrationen in Abhängigkeit vom Alter

Es ist bekannt, dass der Alterungsprozess mit einer deutlichen Verminderung der hGH-Sekretion einhergeht. Hierfür wurde der Begriff der Somatopause geprägt. Schon ab dem 20. Lebensjahr fallen die Konzentrationen von hGH/IGF kontinuierlich um ca. 1-2% pro Jahr ab, und gehen bei einem 50-jährigen auf etwa die Hälfte der Ausgangswerte zurück. Da die Sekretion des hGH sehr stark pulsatil erfolgt, ist die direkte Bestimmung von hGH wenig sinnvoll. Einzelwerte sind nicht wirklich repräsentativ für die mittlere Sekretion von hGH. Es hat sich vielmehr etabliert, die unter hGH-Einwirkung gebildeten IGF's zu messen, wobei vor allem das in der Leber synthetisierte IGF-I zur Diagnostik herangezogen wird, da es das im Tagesprofil verfügbare hGH reflektiert (Van Dessel et al. 1996; Yu et al. 1999a). In unseren Versuchen haben wir dennoch beide Hormone in Abhängigkeit zum Alter bestimmt, allerdings wurden die Blutabnahmen bei allen Probanden vormittags zwischen 8:00 und 9:00 Uhr durchgeführt.

IGF-I wird im Gegensatz zu hGH, welches nur in der Hypophyse gebildet wird, zum größten Teil in der Leber synthetisiert. Zusätzlich wird es lokal in Niere, Herz, Lunge, Fettgewebe, Skelettmuskel und Knorpel gebildet (Jones u. Clemmons 1995). Die wachstumsbezogenen Effekte des GH werden hauptsächlich über die Produktion von IGF-1 in der Leber vermittelt. Die insulinähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF I+II = insulin like growth faktor I+II) und die IGF-Rezeptoren (IGF I+II-Rez.) sind an der Regulation von Wachstum und Proliferation der Zellen *in vivo* und *in vitro* beteiligt. Im Gegensatz zu Insulin werden sie von fast allen Geweben produziert (Devlin 2002). Dadurch wirken sie endo- sowie auto- und/oder parakrin. Es handelt sich um potente, mitogene Substanzen und Ihre Wirkung wird durch die Verfügbarkeit von freiem IGF, das an IGF-Rezeptoren binden kann, reguliert.

Die Spiegel von freiem IGF werden durch die Menge an produziertem IGF, dem Abbau sowie dem Bindungsgrad an IGFBP beeinflusst. Einer der Hauptregulatoren von IGF-1

ist GH. IGF-II ist im Gegensatz dazu weitgehend von GH unabhängig (Talwar et al 1975).

IGF's sind nicht nur Wachstumsfaktoren, sondern auch Apoptose-Hemmer. Es konnten in Studien Erhöhungen der IGF-Konzentrationen bei verschiedenen Tumorerkrankungen nachgewiesen werden. Hohe IGF-I Konzentrationen korrelieren mit einem erhöhten Risiko für Mammakarzinom (Harkinson et al. 1998), Prostatakarzinom (Chan et al. 1998 u. 2002), Lungenkarzinom (Yu et al. 1999b) und das kolorektalen Karzinoms (Giovannucci et al. 2000), wobei niedrige IGF-I-Konzentrationen auf eine verminderte Sekretion von hGH hinweisen, können erhöhte Konzentrationen hinweisend auf eine konsumierende Erkrankung sein.

In unseren Versuchen kam es zu einer signifikanten Abnahme der IGF-1 Serumkonzentration in Abhängigkeit vom Alter. Die abnehmenden IGF-I Konzentrationen im Alter sprechen auch für eine abnehmende mittlere Sekretion des hGH s im Alter.

In der Studie von Krishnaraj et al. (1998) wurde die Beziehung des humanen GH und des IGF-I sowie die Immunität im Alter untersucht. Hier konnte nachgewiesen werden, dass es zu einer Abnahme der Serumkonzentration von hGH und IGF-1 im Alter kommt. Diese Veränderungen waren auch mit einer verminderten Immunfunktion assoziiert. Der Mangel von hGH und IGF-I im Alter oder auch durch Tumorerkrankungen (z.B. Hypophysenadenom) führte zu einer schlechteren Abwehrlage (Krishnaraj et al. 1998, Velkeniers et al. 1998).

Die Wachstumshormone (hGH und IGF-I) beeinflussen auch das lymphatische System. In Tierversuchen konnte man bei hypophysektomierten Ratten eine Verminderung der T- und B-Zell Funktion nachweisen (Talwar et al.1975). Bei exogener Zufuhr vom humanen growth Hormon kam es zu einer bedeutenden Verbesserung der Zellzahl und der Funktionsqualität des Immunsystems (B-LZ, T-LZ und NK-Zellen) (Krishnaraj et al. 1998, Velkeniers et al. 1998; Kelly 1989; Kelley et al. 1986). Velkeniers et al. (1998) konnten bei weiblichen Affen eine verbesserte Immunantwort infolge der effektiveren Stimulation/Proliferation nach hGH- und IGF-1- Substitution nachweisen.

IGF-I stimuliert *in vitro* die Synthese von Thymulin, einem Hormon, das immunmodulatorische Eigenschaften hat und die T-Zell Differenzierung beeinflusst (Timsit et al. 1992). Die Injektion von rekombinantem humanem IGF-I führt zu einer Gewichtszunahme des Thymus und der Milz bei gesunden Ratten. Weiterhin kommt es

nach einer Substitution von IGF-I zu Rückbildung einer Thymusatrophie bei Ratten mit Diabetes (Krishnaraj et al. 1998). Diese Ergebnisse sprechen für die immunmodulatorische Funktion von IGF-I. IGF-I beeinflusst hauptsächlich die T-Lymphozytenproliferation. Eine Abhängigkeit zwischen der IGF-I Konzentration im Plasma und der B-Lymphozyten Funktion konnte bisher nicht belegt werden.

Typischerweise kommt es bei einem hGH- und IGF-1-Mangel zu Veränderungen wichtiger Stoffwechselforgänge. Es ist bekannt, dass das hGH nicht nur eine maßgebliche Rolle für das lineare Wachstum besitzt, sondern auch in anderen Organsystemen einen bedeutenden positiven Effekt zeigt. Bei Patienten mit einem Pan- oder Hypopituitarismus kommt es nach vorliegenden Daten, zu einer im Vergleich zur Normalbevölkerung verkürzten Lebenserwartung. Dieses ist auch der Fall, wenn die Ausfälle der corticotropen, thyreotropen und glandotropen Partialfunktionen durch Substitution ersetzt werden. Es wurde die Vermutung aufgestellt, dass dieses Phänomen durch den Wachstumshormonmangel hervorgerufen wird, jedoch konnte dies noch nicht bewiesen werden.

Beim Erwachsenen wird ein Wachstumshormonmangel auch als growth hormone deficiency (GHD) oder auch als Syndrom des Wachstumshormonmangels bezeichnet. Dieses umfasst im Wesentlichen die Beeinträchtigungen von Vitalität und Energie und geht außerdem mit charakteristischen Veränderungen des Fettstoffwechsels einher (Mönig u. Ziegler 2001). Bei diesen Patienten kommt zu einem verstärkten Abbau von Muskeleiweiß und zur Zunahme des Fettgewebes. Typischerweise nimmt die Knochendichte ab und das Risiko einen Herzinfarkt oder Schlaganfall zu erleiden nimmt zu (Krishnaraj et al. 1998, Velkeniers et al. 1998; Jorgenson 1991; Rudman 1985; Mönig u. Ziegler 2001).

In Therapiestudien an Patienten mit einem Syndrom des GH-Mangels im Erwachsenenalter, zeigte sich, dass die entsprechenden Symptome und Funktionsstörungen unter einer Substitutionstherapie rückläufig waren. Bei einem der Patienten kam es nach Absetzen der GH-Substitutionstherapie sogar zu einer lebensbedrohlichen Dekompensationen (Mönig u. Ziegler 2001). Diese Resultate gelten nur für Patienten mit nachgewiesenem Wachstumshormonmangel, z.B. nach einer ausgedehnten Hypophysenoperation. Die Substitution von hGH bei Erwachsenen ohne nachgewiesenen GH-Mangel ist dagegen nicht indiziert. Der mögliche Einsatz einer Substitution für GH wird derzeit bei Herzinsuffizienz, katabolen Zuständen und

Osteoporose diskutiert; die Datenlage lässt Empfehlungen in diesen Bereich jedoch noch nicht zu (Mönig u. Ziegler 2001).

5.3 Expression von Oberflächenmolekülen an PBMC des kutanen und des zirkulierenden Immunsystems im Alter nach Stimulation

5.3.1 Expression von CD28 im zirkulierenden und kutanen Immunsystem in Abhängigkeit vom Alter

Der CD28 Oberflächenrezeptor gilt als valider Biomarker der Immunoseneszenz von T-Lymphozyten. In vielen Studien wurde belegt, dass es sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu einer Verminderung dieser Rezeptoren mit zunehmendem Alter kommt (Boucher et al. 1998). In unseren Versuchen kam es ebenfalls zu einem Abfall der unstimulierten zirkulierenden CD3+CD28+ T-Lymphozyten. Interessanterweise kam es bei den unstimulierten CLA+ CD28+ (hautspezifischen) T-Lymphozyten zu einer Zunahme in Abhängigkeit vom Alter.

CD28 ist ein Korezeptor, der sich auf naiven T-Lymphozyten befindet. Neben der antigenspezifischen Stimulation über den TCR benötigen die T-Lymphozyten eine weitere antigenunabhängige Stimulation durch kostimulatorischen Rezeptoren, deren Aktivierung wichtige funktionelle Konsequenzen hat. Einer dieser Korezeptoren ist CD28. Die Stimulation des CD28 Korezeptors führt nach Interaktion mit CD80/86, einem weiteren Korezeptor auf antigenpräsentierenden Zellen, in Verbindung mit dem aktivierten TCR/CD3-Komplex zur Bildung positiver Signale, die die Proliferation der T-Lymphozyten aktivieren (Boucher et al. 1998; Neuber et al. 2003).

Der altersbedingte Abfall dieser CD3+CD28+ T-Lymphozyten korreliert mit einer verminderten Proliferationsfähigkeit der T-Zelle im Alter (Adibizadeh et al. 1995). Bei unseren Untersuchungen konnten wir dies bestätigen. Die Tatsache, dass es im Alter zu einer Abnahme von CD3+CD28- T-Zellen kommt erklärt, warum es nach Stimulation der Zellen von älteren Probanden mit SEB oder IGF-1, zu einer verminderten Proliferation im Vergleich zu jüngeren Probanden kommt. Wäre die Zahl der CD3+CD28+ T-Zellen unverändert und nur deren Proliferation eingeschränkt, ließen sich andere Gründe für diesen Zustand liefern. So wäre es möglich, dass es zu altersbedingten Veränderungen von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) kommt wie

zum Beispiel einer verminderten Expression von CD 80/86 und somit zu einer verminderten Stimulation der T-Lymphozyten.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass es im Alter zu einer Hochregulation von CD 152 kommt, einem inhibitorischen Rezeptor, die zu einem „off-Signal“ führen würde, selbst wenn CD3+CD28+ normal funktionieren.

Bei unseren Versuchen konnten wir feststellen, dass nicht nur der Anteil von CLA+CD28+ T-Zellen im Alter ansteigt, sondern auch, dass deren funktionelle Kapazität erhalten blieb. Dies zeigte sich in der weiterhin vorhandenen Proliferationsantwort nach Stimulation mit SEB. Warum es zu einer Zunahme der CLA+CD28+ T-Lymphozyten kommt, ist bisher noch unbekannt. Der Anstieg von CLA+CD28+ T-Zellen, könnte eine Erklärung für die altersunabhängige Aktivität bestimmter T-Zell vermittelter inflammatorischer Hauterkrankungen sein.

Bei den Stimulationsversuchen zeigte sich, dass die Proliferation von älteren T-Zellen im Vergleich zu jüngeren T-Zellen eingeschränkt ist.

IGF- I scheint eine sehr wichtige immunmodulatorische Rolle zu spielen. Wie schon oben erwähnt, wurden in verschiedenen Studien Beziehungen zwischen der IGF-I Serumkonzentration und der T-Zell Funktion beschrieben (Krishnaraj et al. 1998). Aufgrund dieser Tatsache haben wir in unseren Versuchen die kutanen und zirkulierenden T-Lymphozyten mit IGF-I stimuliert. Insulin like growth Faktor I wirkt durch Bindung an den IGF-I Rezeptor und vermittelt auf diese Weise die wachstumsfördernden Wirkungen.

Nach Stimulation mit SEB kam es in unseren Versuchen zu einer Proliferation der T-Zellen des zirkulierenden und des kutanen Immunsystems. Insgesamt war hier die Stimulation bei den jüngeren Probanden effektiver als bei den älteren Probanden. Interessant war es, dass die Stimulation mit IGF-I bei den CLA-T-Zellen unterschiedliche Ergebnisse zeigte.

Die Stimulation der CD3+/CD28+ T-Zellen mit IGF-1 führte zur Proliferation der T-Zellen, wobei auch hier die Proliferation bei den jüngeren stärker ausgeprägt war als bei den alten Probanden. Bei den CLA+/CD28+ T-Zellen kam es nach der Stimulation mit IGF-I zu keiner Proliferation der T-Zellen. Hier kam es wie auch in der Kontrollgruppe zu einer Abnahme der T-Zell-Zahl.

Die verminderte Proliferation der T-Zellen im Alter könnte verschiedene Ursachen haben. Durch Veränderungen der durch den T-Zellrezeptor induzierten Signaltransduktionskaskaden könnte es zu einer gestörten Aktivierung der T-Zellen kommen. Auch Veränderungen der Expression von kostimulatorischen Rezeptoren oder Veränderungen in der Produktion von Wachstumsfaktoren können zu einer gestörten Aktivierung führen. Die Ursachen der eingeschränkten Proliferation sind also auf verschiedenen Ebenen der Signaltransduktion zu suchen.

Verschiedene Studien unterstützen diese Vermutungen, denn nach der T-Zellaktivierung kommt es auch im Alter weiterhin zur Phosphorylierung von Thyrosinkinase, der Grad der Phosphorylierung nimmt aber ab (Garcia u. Miller 1997; Whisler et al. 1998). Weitere Untersuchungen in diesem Bereich zeigen einen Zusammenhang zwischen der T-Zell-Proliferation mit der enzymatischen Aktivität der TCR-assoziierten Proteine p59fyn (Whisler et al. 1997) und p56lck (Tinkle et al 1998), die im Alter eingeschränkt war.

Auch eine verminderte Synthese der „second messenger“, wie IP3 und DAG, könnten eine Ursache der verminderten Proliferation sein. Eine verminderte Synthese dieser second messenger wurde in Mausversuchen bestätigt (Utsuyama et al. 1993).

Weiterhin kann die selektive Verminderung einer Isoform der Proteinkinase C in einer eingeschränkten T-Zellproliferation resultieren (Whisler et al. 1995). Auch eine Erhöhung von Phosphatasen würde bei gleich bleibender Proteinkinaseaktivität den gleichen Effekt haben. Bisher weiß man nicht, welcher dieser Mechanismen im Alter zu einer eingeschränkten Tyrosinphosphorylierung führt.

Es ist auch bekannt, dass im Alter der Kalziumeinstrom in die Zelle vermindert ist und frühe aktivierungsassoziierte Zelloberflächenmarker wie CD69 und CD71 vermindert exprimiert werden (Gupta 1989; Whisler et al. 1991). Insgesamt lässt sich also vermuten, dass die für die frühe T-Zellaktivierung erforderlichen Signaltransduktionsmechanismen im Alter beeinträchtigt sind.

Die fehlende Proliferationsantwort nach Stimulation mit IGF- I der CLA+CD28+ T-Zellen könnte darauf zurückgeführt werden, dass beispielsweise erhöhte Konzentrationen von IGF – Bindungsproteinen zu einer verminderten Proliferationsantwort führen. Die IGF-Bindungsproteine haben einen wachstumshemmenden Effekt, da sie IGFs kompetitiv binden und somit verhindern, dass durch Rezeptorbindung eine intrazelluläre Phosphorylationskaskade ausgelöst wird (Grimberg u. Cohen 2000). Freies IGF wird

von sechs verschiedenen Bindungsproteinen reguliert. Diese werden, wie IGF selbst, primär in der Leber synthetisiert. Sie sorgen für eine Bindung und damit ubiquitäre Verteilung über das Serum. Eine verminderte Bioaktivität der Bindungsproteine kann auch die Karzinogenese fördern, da deren IGF-unabhängige Wirkungen auf die Proliferation und Apoptose schwinden.

Die IGF-I-Rezeptoren bewirken das Zustandekommen der Zellantwort, indem sie die Informationsübertragung durch die Lipidmembran ermöglichen. Änderungen, die das Gleichgewicht zwischen IGF/IGF-I-R-Aktivität und der Funktion der IGFBPs verschieben, könnten eine verminderte Informationsübertragung verursachen (Grimberg et al. 1996).

Auch eine Funktionsstörung des IGF-I-Rezeptors könnte zu einer verminderten Proliferationsantwort führen. Der IGF-I Rezeptor spielt eine zentrale Rolle bei der normalen Proliferation der Zelle. Eine Ursache der verminderten Proliferation könnte durch Störungen auf der Transkriptionsebene begründet sein. Die verstärkte Aktivität von Tumorsuppressorgenen auf das Gen, das für die IGF-I-Rezeptor-Synthese wichtig ist, könnte dazu führen. Eine gestörte Bindung des IGF-I-Moleküls an seinem Rezeptor kann auch zu einer verminderten Aktivierung der intrazellulären Kinase-Domäne führen. Durch die Stimulation mit IGF-I könnte es zu einem negativen Feedback Mechanismus kommen, der zu einer verminderten IGF-I-R Expression führt. Was bei unseren Versuchen die Ursache dieser Verminderten Proliferation nach IGF-1-Stimulation war, muss in weiteren Experimenten geklärt werden.

5.3.2 IGF-1-R Expression im zirkulierenden und kutanen Immunsystem in Abhängigkeit vom Alter

Die durch IGF-1 induzierten mitogenen und anabolen Effekte, werden über den IGF-IR vermittelt (Butt et al. 1999). Er ist dem Insulin-Rezeptor sehr ähnlich und ist wie dieser ein $\alpha\beta_2$ -transmembranöses Glykoprotein. Die β -Untereinheit besitzt Thyrosinkinaseaktivität, die α -Untereinheit bindet das IGF I-Molekül. Seine Affinität zu IGF-I ist ungefähr 10 bis 15-fach so groß wie die zu IGF-II (Germain-Lee et al. 1992) Die Bindung eines Liganden führt zur Dimerisierung des vorher monomeren Rezeptors. Durch diese Konformationsänderung kommt es zu einer Autophosphorylierung der zytoplasmatischen Domänen und der Phosphorylierung verschiedener

zytoplasmatischer Proteine (Frattali u. Pessin 1993). Die Signale werden durch bestimmte Signalkaskaden von intrazellulären Faktoren, z.B. dem Insulin-Rezeptor-Substrat (IRS)-1, SHC („*SH containing*“), ras („*rat sarcoma*“), Raf-1 (Serin/Threonin-spezifische-Proteinkinase) oder der MAP (Mitogen-Aktiviertes-Protein)-Kinase weiter übertragen (LeRoith et al. 1995 u. 2003). Die Substanzen, die im Verlauf der Signalkaskade gebildet werden, sind für Apoptose oder veränderte Zellmobilität verantwortlich und greifen ebenfalls in die Regulierung des Zellzyklus sowie der Genexpression ein (De Meyts 1994). Dem IGF-IR kommt durch diese Funktion eine Schlüsselrolle in der Kanzerogenese zu, die nicht nur mitogene, sondern auch antiapoptotische, transformierende und wachstumsstimulierende Eigenschaften beinhaltet (Baserga et al. 1997a u. 1997b; Butt et al. 1999; Grothey et al. 1999).

Die Ergebnisse unserer Experimente zeigten eine Zunahme der unstimulierten IGF-R+ T-Zellen des zirkulierenden und des kutanen Systems in Abhängigkeit vom Alter. Dies könnte auch die Erklärung für das erhöhte Risiko sein, im Alter an Krebs zu erkranken. Warum es zu dieser vermehrten Expression im Alter kommt ist noch unklar. Der Anstieg der IGF-I-R Expression könnte auch durch einen Feedbackmechanismus begründet sein. Die altersbedingte physiologisch abnehmende IGF-I Konzentration im Serum könnte zu einer Stimulation der IGF-I-R-Expression in der Peripherie führen.

Nach Stimulation mit SEB kam es in unseren Versuchen zur Proliferation sowohl der CD3+/IGF-I-R+ T-Zellen als auch der CLA+/IGF-I-R+ T-Zellen. Im zirkulierenden sowie im kutanen System war die Proliferationsantwort im Alter nicht eingeschränkt, was darauf hindeutet, dass die Aktivierung über den T-Zell Rezeptor in beiden Gruppen auch im Alter intakt ist. Sowohl die Bindungsstelle im Bereich des MCH II Moleküls auf den APZ sowie die V β -Kette des TCR müssen demnach normal exprimiert werden.

Die CD3+/IGF1R+ T-Zellen ließen sich nicht mit IGF-1 stimulieren. Nach der Stimulatuion mit IGF-1 blieb die erwartete Proliferation der T-Zellen aus. Es kam wie in der Kontrollprobe zu einer Abnahme der Zahl CD3+/IGFR+ T-Zellen. Der Grund für die ausbleibende Proliferation, könnte ein negativer Feedbackmechanismus auf die IGF1R+T-Zellen durch die angestiegene IGF-1 Konzentration sein. Eine andere Ursache könnte eine erhöhte Konzentration von IGFBP sein, die zu einer verminderten Konzentration des aktiven IGF-1 führen könnte.

Die CLA+/IGF-1R+ T-Zellen zeigten nach Stimulation mit IGF-1 eine uneingeschränkte Proliferation sowohl bei den jungen als auch bei den alten Individuen.

Überraschenderweise war die Stimulation der CLA+/IGF-1R+ T-Zellen mit IGF-1 noch effektiver als die mit SEB.

Warum es gerade bei den CLA+ der IGF-I-R exprimierenden T-Zellen zu einer besseren Stimulierbarkeit kommt ist noch unklar. Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass bei den CLA+ Zellen nicht in jedem Fall eine alterbedingte Einschränkung der Proliferation nachweisbar war. Dies spricht dafür, dass es im Alter bei den CLA+ T-Zellen nicht zu den typischen Veränderungen der Immunoseneszenz kommt. Die Hypothese, dass die Immunoseneszenz von zirkulierenden T-Zellen, T-Zellen der Haut und anderen Kompartimenten direkt miteinander vergleichbar ist, muß demnach korrigiert werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß des Alters auf verschiedene Funktionen des Immunsystems untersucht.

Im ersten Versuchsteil wurden die Konzentrationen verschiedener löslicher Adhäsionsmoleküle (sVCAM-1, sICAM-1 und sE-Selektin) im Serum in Abhängigkeit vom Alter untersucht.

Hierzu wurde den Probanden (n = 71, 30 Männer und 51 Frauen) zunächst Blut abgenommen und im Anschluß mit der Enzymimmunoassay Technik die Konzentrationen der Adhäsionsmoleküle bestimmt. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der sVCAM-1 Konzentration im Alter. Hier ließen sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede nachweisen. Die Konzentrationen des sICAM-1 zeigte dagegen nur eine leicht positive, jedoch nicht signifikante Korrelation in Abhängigkeit vom Alter. Beim sE-Selektin konnten wir keine Abhängigkeit vom Alter nachweisen.

Im zweiten Versuchsteil der Arbeit wurden Oberflächenmoleküle (CD28 und IGF-1-R) an unstimulierten und stimulierten T-Lymphozyten im zirkulierenden und kutanen Immunsystem in Abhängigkeit vom Alter untersucht und miteinander verglichen.

Hierzu wurde den gesunden Probanden (n= 12) zunächst Blut entnommen und die Bestimmung der Oberflächenmarker (CD3, CLA, CD28, IGF-1-R) an den unstimulierten Zellen durchgeführt. Es zeigte sich bei den unstimulierten CD3+CD28+ T-Lymphozyten im Alter eine deutliche Abnahme der Gesamtzellzahl. Bei den unstimulierten CLA+CD28+ (Hautspezifischen) T-Lymphozyten kam es dagegen zu einer Zunahme im Alter. Interessanterweise kam es bei den unstimulierten CLA+IGFR+ T-Zellen und auch bei den CD3+IGFR+ T-Zellen zu einer Zunahme der Zellzahl in Abhängigkeit vom Alter.

In einem weiteren Schritt wurden aus dem Blut der Probanden, die PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert und *in vitro* mit SEB und IGF-1 stimuliert.

Nach Stimulation mit SEB kam es zu einer Zunahme der CD3+/CD28-, CD3+/IGF-1R- und der CLA+/CD28+ T-Lymphozyten, wobei die Zellen bei den jüngeren Probanden stärker proliferierten als bei den älteren.

Bei den CLA+/IGFR-1+ T-Lymphozyten kam es nach Stimulation mit SEB ebenfalls zu einer Zunahme der Zellzahl, wobei hier die Stimulierbarkeit der Zellen im Alter nicht eingeschränkt war.

Die Stimulation der PBMC mit IGF-1 zeigte unterschiedliche Effekte. Bei den CD3+/IGF-1R+ T-Zellen und auch bei den CLA+/CD28+ T-Zellen zeigte IGF-1 keine stimulatorischen Effekte. Bei den CD3+/CD28+ T-Zellen kam es zu einer Zunahme der Zellen nach Stimulation mit IGF-1, wobei auch hier die Stimulierbarkeit im Alter eingeschränkt war. Erstaunlicherweise kam es nach Stimulation mit IGF-1 bei den CLA+/IGF-1-R+-Lymphozyten zu einer Zunahme der Zellproliferation, die auch im Alter nicht eingeschränkt war.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Auswirkungen der Immunoseneszenz auf zirkulierende CLA- T-Zellen nicht ohne Weiteres auf die hautspezifischen CLA+ T-Zellen übertragbar ist.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (1996) Immunologie. Verlag Hans Huber, Bern
2. Abuzzahab MJ, Schneider A, Goddard A, Grigorescu F, Lautier C, Keller E, Kiess W, Klammt J, Kratzsch J, Osgood D, Pfaffle R, Raile K, Seidel B, Smith RJ, Chernausek SD (2003) Intrauterine Growth Retardation (IUGR) Study Group. IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. *N Engl J Med.* 349(23):2211-2222
3. Adibzadeh M, Pohla H, Rehbein A, Pawelec G (1995) Long-term culture of monoclonal Human T lymphocytes: models for immunosenescence? *Mech Ageing Dev.* 83: 171-183
4. Albelda SM, Smith CW, Ward PA (1994) Adhesions molecules and iflammatory injury, *FASEB J.* 8(8): 504-512
5. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4. Auflage, Garland Science, New York
6. Auernhammer CJ, Strasburger CJ (1995) Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on the immune system. *Eur J Endocrinol.* 133(6):635-645
7. Barker JN, Mitra RS, Griffiths CE, Dixit VM, Nickoloff BJ (1991) Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet.* 337(8735): 211-214
8. Baserga R, Hongo A, Rubini M, Prisco M, Valentinis B (1997a) The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 1332(3):F105-F126
9. Baserga R, Resnicoff M, D'Ambrosio C, Valentinis B (1997b) The role of the IGF-I receptor in apoptosis. *Vitam Horm.* 53:65-98
10. Baxter RC (1994) Insulin-like growth factor binding proteins in the human circulation: a review. *Horm Res.* 42(4-5):140-144
11. Bentley GA, Mariuzza RA (1996) The structure of the T cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol.* 14:563-590

12. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA Jr, Seed B (1989) Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: An inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 243(4895):1160-1165
13. Bevilacqua MP (1993a) Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol.* 11:767-804
14. Bevilacqua MP, Nelson RM (1993b) Selectins. *J. Clin. Invest.* 91(2):379-387
15. Blakesley VA, Koval AP, Stannard BS, Scrimgeour A, LeRoith D (1998) Replacement of tyrosine 1251 in the carboxyl terminus of the insulin-like growth factor-I receptor disrupts the actin cytoskeleton and inhibits proliferation and anchorage-independent growth. *J Biol Chem.* 273 (29):18411-18422
16. Böcker W, Denk H, Heitz PhU (2001) *Pathologie*, 2. Auflage, Urban&Fischer Verlag, München Jena
17. Boise LH, Noel PJ, Thompson CB (1995) CD28 and apoptosis. *Curr Opin Immunol.* 7(5): 620-625
18. Bos JD, de Boer OJ, Tibosch E, Das PK, Pals ST (1993) Skin-homing T lymphocytes: detection of cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) by HECA-452 in normal human skin. *Arch Dermatol Res.* 285(4):179-183
19. Boucher N, Duchesne TD, Vicaut E, Farge D, Effros RB, Schachter F (1998) CD 28 expression in T cell aging and human longevity, *J Exp Gerontol.*33:267
20. Brenner B, Gulbins E, Schlottmann K, Koppenhoefer U, Busch GL, Walzog B, Steinhausen M, Coggeshall KM, Linderkamp O, Lang F (1996) L-selectin activates the Ras pathway via the tyrosine kinase p56lck. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(26):15376-15381
21. Bucher O, Wartenberg H (1997) *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*, 12. Auflage, Verlag Hans Huber, Bern Göttingen Toronto Seattle
22. Butt AJ, Firth SM, Baxter RC (1999) The IGF axis and programmed cell death. *Immunol Cell Biol.* 77(3):256-262
23. Cambier JC (1995) Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosinebased activation motif (ITAM). *J Immunol.* 155(7):3281-3285
24. Carlos TM, Harlan JM (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood.* 84(7):2068-2101

25. Castle SC (2000) Impact of age-related immune dysfunction on risk of infections. *Z Gerontol Geriatr.* 33(5):341-349
26. Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Gann PH, MaJ, Wilkinson P, Hennekens CH (1998) Plasma insulin-like growth factor I and prostata cancer risk: a prospektive study. *Science* 279(5350):563-566
27. Chan JM, Stampfer MJ, MaJ, Gann P, Gaziano JM, Pollak M, Giovannucci E (2002) Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding protein-3 as predictors of advanced-stage prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 94(14):1099-1106
28. Chien YH, Jores R, Crowley MP (1996) Recognition by gamma/delta T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 14:511-532
29. Cowley HC, Heney D, Gearing AJ, Hemingway I, Webster NR (1994) Increased circulating adhesion molecule concentrations in patients with systemic inflammatory response syndrom: A prospective cohort study, *Crit Care Med.* 22(4):651-657
30. Cybulsky MI, Fries JW, Williams AJ, Sultan P, Eddy R, Byers M, Shows T, Gimbrone MA Jr, Collins T (1991a) Gene structure, chromosomal location, and basis for alternative mRNA splicing of the human VCAM1 gene, *Proc Natl Acad Sci USA.* 88(17):7859-7863
31. Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr (1991b) Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 251(4995):788-791
32. Danghaday WH, Rotwein P (1989) Insulin-like growth factors I and II. Peptide messenger ribonucleic acid and gene structures. *Endocr. Rev.* 10(1):68-91
33. De Caterina R, Cybulsky MI, Clinton SK, Gimbrone MA Jr, Libby P (1994) The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells, *Arterioscler Thromb.* 14(11):1829-1836
34. De Meyts P (1994) The structural basis of insulin and insulin-like growth factor-I receptor binding and negative co-operativity, and its relevance to mitogenic versus metabolic signalling. *Diabetologia.* 37 Suppl 2:135-148
35. del Pozo MA, Pulido R, Munoz C, Alvarez V, Humbria A, Campanero MR, Sanchez-Madrid F (1994) Regulation of ICAM-3 (CD50) membrane expression on human neutrophils through a proteolytic shedding mechanism, *Eur J Immunol.* 24(11):2586-2594

36. Devlin TM (2002) Textbook of biochemistry with clinical correlations, 5.Auflage, Wiley-Liss
37. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA (1986) Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1), *J. Immunol.* 137(1):245-254
38. Effors RB, Boucher N, Porter V, Zhu X, Spaulding C, Walford RL, Kronenberg M, Cohen D, Schachter F (1994) Decline in CD28+ T cells in centenarians and in long-term T cell cultures: a possible cause for both in vivo and in vitro immunosenescence, *Exp Gerontol.* 29(6):601-609
39. Engelberts I, Moller A, Leeuwenberg JF, van der Linden CJ, Buurman WA (1992) Administration of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) inhibitors after exposure to TNFa prevents development of the maximal biological effect: An argument for clinical treatment with TNFalpha inhibitors, *J Surg Res.* 53(5):510-514
40. Esposito DL, Blakesley VA, Koval AP, Scrimgeour AG, LeRoith D (1997) Tyrosine residues in the C-terminal domain of the insulin-like growth factor-I receptor mediate mitogenic and tumorigenic signals, *Endocr.* 138(7):2979-88
41. Etzioni A, Jonas P (1997) The in vivo role of Selectins-Lessons from Leukocyte Adhesion Deficiency (LAD) II. In: *The Selectins*. Ed. Vestweber D, Harwood Academic Publishers, Amsterdam 117-125
42. Fagnoni FF, Vescovini R, Mazzola M, Bologna G, Nigro E, Lavagetto G, Franceschi C, Passeri M, Sansoni P (1996) Expansion of cytotoxic CD8+CD28-Tcells in healthy aging people, including centenarians, *J Immunology* 88(4):501-507
43. Franceschi C, Doria G (1998) Immunität, Altern und Langlebigkeit, Department of Biomedical Sciences, University of Modena, Italy; Department of Gerontological Research, INRCA, Ancona, Italy; Department of Biology, University of Rome, "Tor Vergata"
44. Frattali AL, Pessin JE (1993) Molecular defects of insulin/IGF-1 receptor transmembrane signalling, *Ann N Y Acad Sci.* 687:77-89
45. Fremont DH, Rees WA, Kozono H (1996) Biophysical studies of T-cell receptors and their ligands, *Curr Opin Immunol.* 8(1):93-100
46. Fries JW, Williams AJ, Atkins RC, Newman W, Lipscomb MF, Collins T (1993) Expression of VCAM-1 and E-selectin in an in vivo model of endothelial activation, *Am J Pathol* 143(3):725-737

47. Froese S, Shephard E, Adams S, Robson S, Kirsch R (1994) Integrins, selectins and CAMs-the glue of life, *South African Medical Journal* 84(11):759-764
48. Garcia GG, Miller RA (1997) Differential tyrosine phosphorylation of eta chain dimers in mouse CD4 T-Lymphocytes: Effects of age, *Cell Immunol.* 175(1):51-57
49. Gascoigne NR, Ames KT (1991) Direct binding of secreted T-cell receptor beta chain to superantigen associated with class II major histocompatibility complex protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88(2): 613-616
50. Gearing AJ, Newman W (1993) Circulating adhaesion molecules in disease. *Immunol Today* 14(10):506-512
51. Germain-Lee EL, Janicot M, Lammers R, Ulrich A, Casella SJ (1992) Expression of a type I insulin like growth factor receptor with low affinity for insulin-like growth factor II, *Biochem J.* 281: 413-417
52. Giovannucci E, Pollak MN, Platz EA, Willett WC, Stampfer MJ, Majeed N, Colditz GA, Speizer FE, Hankinson SE (2000) A prospective study of plasma insulin-like growth factor-1 and binding protein-3 and risk of colorectal neoplasia in women, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 9:345-349
53. Gomez JM, Maravall FJ, Gomez N, Navarro MA, Casamitjana R, Soler J (2003) Interactions between serum leptin, the insulin-like growth factor-I system, and sex, age, anthropometric and body composition variables in a healthy population randomly selected, *Clin Endocr. (Oxf)* 58(2):213-219
54. Gosset P, Tillie-Leblond I, Janin A, Marquette CH, Copin MC, Wallaert B, Tonnel AB (1995) Expression of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 on bronchial biopsies from allergic and non-allergic asthmatic patients, *Int Arch Allergy Immunol.* 106(1): 69-77
55. Greten H, Schettler G (2001) *Innere Medizin*, 10. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, New York
56. Greve JM, Davis G, Meyer AM, Forte CP, Yost SC, Marlor CW, Kamarck ME, McClelland A (1989) The major human rhinovirus receptor is ICAM-1, *Cell.* 56(5):839-847
57. Griffiths CE, Esmann J, Fisher GJ, Voorhees JJ, Nickoloff BJ (1990) Differential modulation of keratinocyte intercellular adhesion molecule-1 expression by gamma interferon and phorbol ester: evidence for involvement of protein kinase C signal transduction, *Br J Dermatol.* 122(3):333-342

58. Grimberg A, Rajah R, Zhao H, Cohen P (1996) The prostatic IGF system: new levels of complexity. In: Takano K, Hizuka N, Takahashi SI (editors). Molecular mechanisms to regulate the activities of insulin-like growth factors. Amsterdam: Elsevier Science, B.V.p 205-213
59. Grimberg A, Cohen P. (2000) Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis. *J Cell Physiol.*, 183(1):1-9
60. Grothey A, Voigt W, Schober C, Muller T, Dempke W, Schmoll HJ (1999) The role of insulin-like growth factor I and its receptor in cell growth, transformation, apoptosis, and chemoresistance in solid tumors, *J Cancer Res Clin Oncol.* 125(3-4):166-173
61. Gupta S (1989) Membrane signal transduction in T cells in aging humans, *Ann NY Acad Sci.* 568:277-282
62. Harkinson SE, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Michaud DS, Deroo B, Rosner B, Speizer FE, PollakM (1998) Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer, *Lancet* 351:1393-1396
63. Hauser C, Orbea HA (1993) Superantigens and their role in immun-mediated disease, *J Invest Dermatol* 101(4):503-505
64. Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Geloën A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y (2003) IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice, *Nature* 421(6919):182-187
65. Hoshino T, Yamada A, Honda J, Imai Y, Nakao M, Inoune M, Sagawa K, Yokoyama MM, Oizumi K, Itoh K (1993) Tissue-Specific Distribution and Age-Dependent Increase of Human CD 11b+ T-Cells. *J Immunol* 151:2237
66. Hynes RO (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion, *Cell.* 69(1):11-25
67. Hynes RO and Lander AD (1992) Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons, *Cell* 68(2):303-322
68. Jefferson LS, Robertson JW, Tolman EL (1972) Effects of hypophysectomy on protein and carbohydrate metabolism in the perfused rat liver. In: *Growth and Growth Hormone* (eds. Pecile A, Müller EE) 106-123. Excerpta Medica, Amsterdam

69. Jones JI, Clemmons DR (1995) Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological Actions. *Endocrine Reviews* 16(1):3-34
70. Jorgenson JOL (1991) Human growth hormone replacement therapie: Pharmacological and chemical aspects. *Endocrinol. Rev.* 12:189-207
71. Kahn CR (1985) The molecular mechanism of insulin action. *Annu Rev Med.* 36:429-451
72. Kansas GS (1996) Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood.* 88(9):3259-87
73. Kappler J, Kozin B, Herron L, Gelfand EW, Bigler RD, Boylston A, Carrel S, Posnett DN, Choi Y, Marrack P (1989) Vbeta-specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. *Science* 244(4906):811
74. Kersh EN, Shaw AS, Allen PM (1998) Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor zeta phosphorylation. *Science* 281(5376):572-575
75. Klinmann NR, Kline GH (1997) The B-cell Biology of aging. *Immunol Rev.* 160:103-114
76. Koolman J, Röhm KH (1998) Taschenatlas der Biochemie, 2. Auflage, Thieme Verlag, New York
77. Krishnaraj R, Zaks A, Unterman T (1998) Related Articles, Relationship between plasma IGF-I levels, in vitro correlates of immunity, and human senescence. *Clin Immunol Immunopathol.* 88(3):264-70
78. Krutmann J, Kock A, Schauer E, Parlow F, Moller A, Kapp A, Forster E, Schopf E, Luger TA (1990) Tumor necrosis factor beta and ultraviolet radiation are potent regulators of human keratinocyte ICAM-1 expression. *J. Invest. Dermatol.* 95:127-131
79. Labrecque N, Thibodeau J, Sekaly RP (1993) Interactions between staphylococcal superantigens and MHC class II molecules. *Semin Immunol.* 5(1):23-32
80. Laffon A, Gonzalez-Amaro R (1995) Cell adhesion molecules: An overview. *Br J of Rheumatol.* 34(12):1101-1102
81. Lang F (1990) Pathophysiologie Pathobiochemie, 4.Auflage, Enke Verlag, Stuttgart

82. Lasky LA (1995) Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annu Rev Biochem.* 64:113-139
83. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT Jr (1995) Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev.* 16(2):143-163
84. Le Roith D (1997) Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Insulin-like growth factors. *N Engl J Med.* 336(9):633-640
85. Le Roith D (2003) The insulin-like growth factor system. *Exp Diabetes Res.* 4(4):205-12
86. LeRoith D, Roberts CT Jr (2003) The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett.* 195(2):127-137
87. Lis H, Sharon N (1998) Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition *Chem, Rev.* 98(2):637-674
88. Liu Y, Janeway CA Jr (1992) Cells that present both specific ligand and costimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 Tcells, *Proc Natl Acad Sci USA.* 89(9):3845-3849
89. Lo SK, Golenbock DT, Sass PM, Maskati A, Xu H, Silverstein RL (1997) Engagement of the Lewis X antigen (CD15) results in monocyte activation. *Blood* 89(1):307-314
90. Lobb R, Chi-Rosso G, Leone DR, Rosa MD, Bixler S, Newmann BM, Luhowskyj S, Benjamin CD, Douglas IG, Goelz SE (1991) Expression and functional characterization of a soluble form of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 *J Immunol* 147:124-129
91. Löffler G, Petrides PE (1998) *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer , New York
92. Malissen B, Malissen M (1996) Funktions of TCR and pre-TCR subunits: lessons from gene ablation, *Curr Opin Immunol.* 8(3):383-393
93. Marrak P, Blackman M, Kushnir E, Kappler J (1990) The toxicity of staphylococcal enterotoxin B in mice is mediated by T cells. *J Exp Med.* 171(2):455-464
94. Mascaruccil P, Taub D, Sacconi S, Paloma MA, Dawson H, Roth GS, Ingram DK, Lane MA (2001) Age-related changes in cytokine production by leukocytes in rhesus monkeys. *Aging (Milano)* 13(2):85-94

95. McEver RP (1997) Regulation of expression of E-Selectin and P-Selectin. In „The Selectins“. Vestweber, D. (Ed.) Harwood Academic Publishers, Amsterdam 31-47
96. Mönig H, Ziegler A (2001) Hormonsubstitution beim älteren Menschen – ein Weg zum „erfolgreichen Altern“?, Schleswig – Holsteinisches Ärzteblatt 41-50
97. Muller AF, Janssen JA, Lamberts SW, Bidlingmaier M, Strasburger CJ, Hofland L, van der Lely AJ (2001) Effects of fasting and pegvisomant on the GH-releasing hormone and GH-releasing peptide-6 stimulated growth hormone secretion. Clin Endocrinol (Oxf) 55(4):461-467
98. Munro JM, Pober JS, Cotran RS (1991) Recruitment of neutrophils in the local endotoxin response: association with de novo endothelial expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1, Lab Invest 64(2):295-299
99. Mutin M, Dignat-George F, Sampol J (1997) Immunologic phenotype of cultured endothelial cells: quantitative analysis of cell surface molecules, Tissue Antigens 50(5):449-458
100. Neuber K, Schmidt S, Mensch A (2003) Telomere length measurement and determination of immunosenescence-related markers (CD28, CD45RO, CD45RA, interferon-gamma and interleukin-4) in skin-homing T cells expressing the cutaneous lymphocyte antigen: indication of a non-ageing T-cell subset, Immunology. 109(1):24-31
101. Ockenhouse CF, Tegoshi T, Maeno Y, Benjamin C, Ho M, Kan KE, Thway Y, Win K, Aikawa M, Lobb RR (1992a) Human vascular endothelial cell adhesion receptors for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1, J Exp Med., 176(4):1183-1189
102. Ockenhouse CF, Betageri R, Springer TA, Staunton DE (1992b) Plasmodium falciparum-infected erythrocytes bind ICAM-1 at a site distinct from LFA-1, Mac-1, and human rhinovirus, Cell 68(5):63-69
103. O'Connor R, Kauffmann-Zeh A, Liu Y, Lehar S, Evan GI, Baserga R, Blattler WA (1997) Identification of domains of the insulin-like growth factor I receptor that are required for protection from apoptosis, Mol Cell Biol. 17(1):427-435

104. Ohkawara Y, Yamauchi K, Maruyama N, Hoshi H, Ohno I, Honma M, Tanno Y, Tamura G, Shirato K, Ohtani H (1995) "In situ expression of the cell adhesion molecules in bronchial tissues from asthmatics with air flow limitation: in vivo evidence of VCAM-1/VLA-4 interaction in selective eosinophil infiltration", *Am J Respir Cell Mol Biol* 12(1):4-12
105. Olivecrona H, Hilding A, Ekstrom C, Barle H, Nyberg B, Moller C, Delhanty PJ, Baxter RC, Angelin B, Ekstrom TJ, Tally M (1999) Acute and short-term effects of growth hormone on insulin-like growth factors and their binding proteins: serum levels and hepatic messenger ribonucleic acid responses in humans, *J Clin Endocrinol Metab.* 84(2):553-60
106. Olson TS, Ley K (2002) Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 283(1): R7-28
107. Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Luhowskyi S, Chi-Rosso G, Lobb R (1989) Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule-1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes, *Cell* 59(6):1203-1211
108. Osborn L, Vassallo C, Benjamin CD (1992) Activated endothelium binds lymphocytes through a novel binding site in the alternately spliced domain of vascular cell adhesion molecule-1, *J Exp Med.* 176(1):99-107
109. Osborn L, Vassallo C, Browning BG, Tizard R, Haskard DO, Benjamin CD, Douglas I, Kirchhausen T (1994) Arrangement of domains, and amino acid residues required for binding of vascular cell adhesion molecule-1 to its counter-receptor VLA-4 (alpha 4 beta 1), *J Cell Biol.* 124(4):601-608
110. Palluy O, Morliere L, Gris JC, Bonne C, Modat G (1992) Hypoxia/reoxygenation stimulates endothelium to promote neutrophil adhesion *Free Rad Biol Med* 13:21-30
111. Panés J, Perry MA, Anderson DC (1995) Regional differences in constitutive and induced ICAM-1 expression in vivo. *Am J Physiol* 269:1955-1964
112. Pawelec G, Solana R (1997) Immunosenescence, *Immunol Today* 18:514
113. Pawelec G, Remarque ED, Barnett Y, Solana R (1998) T-Cells and Aging, *Frontiers in Bioscience* 3:d59-99
114. Peter K, Weirich U, Nordt T, Ruef J, Bode C (1999) Soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) as a potential marker of atherosclerosis, *Thromb. Hemost.* 82:38-43

115. Picker LJ, Michie SA, Rott LS, Butcher EC (1990) A unique phenotype of skin associated lymphocytes in humans: preferential expression of the HECA-452 epitope by benign and malignant T-cells at cutaneous sites, *Am J Pathol.* 136:1053-1061
116. Picker LJ, Treer JR, Ferguson-Darnell B, Collins PA, Bergstresser BR, Terstappen LW (1993) Control of lymphocyte recirculation in man. II. Differential regulation of the cutaneous lymphocyte-associated antigen, a tissue-selective homing receptor for skin-homing T cells, *J Immunol* 150:1122–1136
117. Raffael A (1988) Grundlagen der analytischen Durchflußzytometrie, *GIT Labormedizin* 3:89-97
118. Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S (1997) Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions, *Endocr Rev.*18(6):801-831
119. Ranke MB (1989) Das diagnostische Vorgehen bei proportioniertem Kleinwuchs. Eine praktisch orientierte Strategie, *Endokrinologische Einzelzeitschriften, Heft 1, Walltor-Verlag, Gießen*
120. Ranke MB, Haber P (1993) Wachstumshormonstimulationstests (70-86) in: *Endokrinologische Funktionsdiagnostik im Kindes- und Jugendalter* (Hrsg. Ranke MB), J&J Verlag, Mannheim
121. Rao MS, Mattson MP (2001) Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mech Ageing Dev* 122(7):713-734
122. Richter V, Rassoul F, Purschwitz K, Hentschel B, Reuter W, Kuntze T (2003) Circulating vascular cell adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in dependence on aging, *Gerontology.* 49(5):293-300
123. Rinderknecht E, Humbel RE (1978a) The amino sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin, *J Biol Chem* 253(8):2769-2776
124. Rinderknecht E, Humbel RE (1978b) Primary structure of human insulin-like growth factor II, *FEBS Lett.* 89(2):283-286
125. Rink L, Cakman J, Kirchner H (1998) Altered cytokine production in the elderly, *Mech Ageing Dev* 199-209
126. Rosen CJ (1999) Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding proteins: Clinical implications, *Clin Chem.* 45(8 Pt 2):1384-1390

127. Rosen SD, Bertozzi CR (1994) The selectins and their ligands, *Curr Opin Cell Biol.* 6(5):663-673
128. Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD, Springer TA (1986) A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1, *J Immunol.* 137(4):1270-1274
129. Rothlein R, Czajkowski M, O'Neill MM, Marlin SD, Mainolfi E, Merluzzi VJ (1988) Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary and continuous cell lines by pro-inflammatory cytokines. Regulation by pharmacologic agents and neutralizing antibodies, *J. Immunol.* 141(5):1665-1669
130. Rotwein P, Pollock KM, Didier DK, Krivi GG (1986) Organization and sequence of the human insulin-like growth factor I gene. Alternative RNA processing produces two insulin-like growth factor I precursor peptides, *J Biol Chem.* 261(11):4828-4832
131. Rudd CE (1996) Upstream-downstream: CD28 cosignaling pathway and T cell function, *Immunity.* 4(6):527-534
132. Rudman D (1985) Growth hormone, body composition and aging, *J Am Geriatr Soc.* 33(11): 800-807
133. Sako D, Chang XJ, Barone KM, Vachino G, White HM, Shaw G, Veldman GM, Bean KM, Ahern TJ, Furie B (1993) Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin, *Cell* 75(6):1179-1186
134. Schindler U, Baichwal VR (1994) Three NF-kappa B binding sites in the human E-Selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression, *Mol Cell Biol.* 14(9):5820-5831
135. Silvestro L, Ruikun C, Sommer F, Duc TM, Biancone L, Montrucchio G, Camussi G (1994) Platelet-activating factor induced endothelial cell expression of adhesion molecules and modulation of surface glycocalyx, evaluated by electron spectroscopy chemical analysis, *Semin Thromb Hemost.* 20(2):214-222
136. Simanek EE, Mc Garvey GJ, Jabolonowski JA, Wong CH (1998) Selectinminus sign Carbohydrate Interactions: From Natural Ligands to Designed Mimics, *Chem Rev.* 98(2):833-862
137. Skov L, Baadsgard O (1995) Superantigens – do they have a role in skin diseases?, *Arch Dermatol* 131:829

138. Sluiter W, Pietersma A, Lamers JM, Koster JF (1993) Leukocyte adhesion molecules on the vascular endothelium: their role in the pathogenesis of cardiovascular disease and the mechanisms underlying their expression, *J Cardiovasc Pharmacol.* 22:37-44
139. Springer TA (1990) Adhesion receptors of the immune system, *Nature* 346:425-434
140. Springer TA (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm, *Cell* 76(2):301-314
141. Staunton DE, Marlin SD, Stratowa C, Dustin ML, Springer TA (1988) Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and supergene family, *Cell* 56:925-933
142. Steegmaier M, Levinovitz A, Isenmann S, Borges E, Lenter M, Kocher HP, Kleuser B, Vestweber D (1995) The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor, *Nature* 373(6515):615-620
143. Steinman RM (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity, *Annu Rev Immunol.* 9:271-296
144. Talwar GP, Pandian MR, Kumar N, Hanjan SNS, Saxena RK, Krishnaraj R, Gupta SL (1975) Mechanism of action of pituitary growth hormone, *Recent Prog Horm Res.* 31:141-174
145. Terry RW, Kwee L, Levine JF, Labow MA (1993) Cytokine induction of an alternatively spliced murine vascular cell adhesion molecule (VCAM) mRNA encoding a glycosylphosphatidylinositol-anchored VCAM protein, *Proc Natl Acad Sci USA.* 90(13):5919-5923
146. Timsit J, Savino W, Safieh B, Chanson P, Gagnerault M, Bach J, Dardenne M (1992) Growth hormone & insulin-like growth factor-I stimulate hormonal function and proliferation of thymic epithelial cells, *J Clin Endocrinol Metab.* 75:183-188
147. Tinkle CW, Lipschitz D, Ponnapan U (1998) Decreased association of p56 (lck) with CD4 may account for lowered tyrosine kinase activity in mitogen-activated human T lymphocytes during aging, *Cell Immunol* 186(2):154-160
148. Tonnesen MG (1989) Neutrophil-endothelial cell interactions: mechanism of neutrophil adherence to vascular endothelium, *J Invest Dermatol.* 93(2 Suppl):53s-58s

149. Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E (1986) Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity, *EMBO J* 5(10):2503-2512
150. Ulich TR, Howard SC, Remick DG, Yi ES, Collins T, Guo K, Yin S, Keene JL, Schmuke JJ, Steininger CN (1994) Intratracheale administration of endotoxin and cytokines. LPS induces E-selectin expression; anti-E-selectin and soluble E-selectin inhibits acute inflammation *Inflamm* 18(4):389-398
151. Utsuyama M, Varga Z, Fukami K, Homma Y, Takenawa T, Hirokawa K (1993) Influence of age on the signal transduction of T cells in mice, *Int Immunol* 5(9):1177-1187
152. Van de Stolpe A, van der Saag PT (1996) Intercellular adhesion molecule-1; *J Mol Med.* 74(1):13-33
153. Van Dessel HJ (1996) Serum and follicular fluid levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II and IGF-binding protein-1 and 3 during the normal menstrual cycle, *J Clin Endocrinol Metab.* 81:1224
154. Velkeniers B, Dogusan Z, Naessens F, Hooghe R, Hooghe-Peters EL (1998) Prolactin, growth hormone and the immune system in humans, *Cell Mol Life Sci.* 54(10):1102-1108
155. Vonderheide RH, Tedder TF, Springer TA, Staunton DE (1994) Residues within a conserved amino acid motif of domains 1 and 4 of VCAM-1 are required for binding VLA-4, *J Cell Biol.* 125:215-222
156. Wakikawa A, Utsuyama M, Hirokawa K (1997) Altered expression of various receptors on T cells in young and old mice after mitogenic stimulation: A flow cytometric analysis, *Mech Ageing Dev* 94:113
157. Wallis M, Howell SI, Taylor KW (1985) *The Biochemistry Polypeptide Hormones*, Wiley, Chichester
158. Wallis M (1988) Mechanism of action of growth hormone. In: *Hormones and their Actions, Part II (New Comprehensive Biochemistry ; eds. Cooke BA, King RJB, van der Molen HJ)*, Elsevier, Amsterdam
159. Walsh FS, Doherty P (1997) Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance, *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13:425-456

160. Wegner CD (1994) Adhesion molecules, The handbook of immunopharmacology, London, San Diego, New York
161. Westermann J, Pabst R (1990) Lymphocyte subsets in the blood: a diagnostic window on the lymphoid system?, Immunol. Today 11:406-410
162. Whisler RL, Newhouse YG, Donnerberg RL, Tobin CM (1991) Characterization of intracellular ionized calcium responsiveness and inositol phosphate production among resting and stimulated peripheral blood T cells from elderly humans, Aging: Immunology and Infectious Disease 3:27
163. Whisler RL, Newhouse YG, Grants IS, Hackshaw KV (1995) Differential expression of the alpha- and beta-isoforms of protein kinase C in peripheral blood T and B cells from young and elderly adults, Mech Aging Dev 77:197
164. Whisler RL, Bagenstose SE, Newhouse YG, Carle KW (1997) Expression and catalytic activities of protein tyrosine kinases (PTKs) Fyn and Lck in peripheral blood T cells from elderly humans stimulated through the T cell receptor (TCR)/CD3 complex. Mech Ageing Dev 98:57
165. Whisler RL, Karanfilov CI, Newhouse YG, Fox CC, Lakshmanan RR, Liu BQ (1998) Phosphorylation and coupling of zeta-chains to activated T-cell receptor (TCR)/CD3 complexes from peripheral blood T-cells of elderly humans, Mech Age 105:115
166. White J, Herman A, Pullen AM, Kubo R, Kappler JW, Marrek P (1989) The V α -specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. Cell 56:27
167. Yu H, Mistry J, Nicar MJ, Khosravi MJ, Diamandis A, van Doorn J, Juul A (1999a) Insulin-like growth factor (IGF-I, free IGF-I and IGF-II) and insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-6, and ALS) in blood circulation, J Clin Lab Anal 13(4):166-172
168. Yu H, Spitz MR, Mistry J, Gu J, Hong WK, Wu X (1999b) Plasma levels of insulin-like growth factor-I and lung cancer risk: a case control analysis, J Natl Cancer Inst. 91(2):151-156
169. Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM (1992) Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules, Immunol. Today 13:93-100

8. DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei allen, die mit dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit in der hier vorliegenden Form verwirklicht werden konnte.

Herrn Prof. Dr. med. Neuber danke ich sehr herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und die intensive und anregende Betreuung. Auch für das immer vorhandene Interesse an dieser Arbeit sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen möchte ich mich bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Finger für die technische Unterstützung bei der Vorbereitung und Durchführung der immunhistochemischen Untersuchungen und für die überaus herzliche Aufnahme im Labor. Mein weiterer Dank gilt den Probanden der Studie und allen, die mir ihre Unterstützung zum Erlernen labortechnischer Fertigkeiten haben zukommen lassen.

Bei Frau Dr. Emine Cetin möchte ich mich für ihre jederzeit bereitgestellte Unterstützung und Hilfestellung, für viele Ihrer Ratschläge und wertvollen Diskussionen bedanken.

Zuletzt möchte ich mich bei denen bedanken, die in ihrer Bedeutung an erster Stelle stehen. Meinen Eltern danke ich für die grenzenlose Unterstützung und ihr Vertrauen an mich, meiner Schwester die immer für mich da war und natürlich gilt auch ein großer Teil meines dankes an meinem Bruder für seine wertvollen Tipps und Tricks am Computer und die liebevolle Unterstützung.

9. LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Hülya Acar

Geburtsdatum/-ort: 14. Mai 1979 in Hamburg

Adresse: Langenfelder Straße 110
22769 Hamburg

Familienstand: ledig

Nationalität: deutsch

Promotion „Bestimmung von Adhäsionsmolekülen (sE-Selektin, sICAM-1, sVCAM-1) und Wachstumsfaktoren (IGF-1, IGR-1R und hGH) und ihr Einfluß auf die Alterung des Immunsystems“

Schulabschluss 06/1998 Allgemeine Hochschulreife
Oberstufe der Gesamtschule Kirchdorf, Hamburg

Studium der Humanmedizin

08/1998-05/2005 Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg

03/2001 Physikum

11/2002 I. Staatsexamen

03/2004 II. Staatsexamen

04/2004-03/2005 Praktisches Jahr

Allgemeines Krankenhaus Altona, Hamburg (Chirurgie, Innere Medizin)

Universitätsklinik Cerrahpasa, Istanbul, Türkei (Chirurgie)

Albertinen Krankenhaus, Hamburg (Gynäkologie)

05/2005 III. Staatsexamen

Beruflicher Werdegang

seit 06/2005 Facharztausbildung in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe des Diakonie Klinikum Hamburg, Elim Krankenhaus, Chefarzt Prof. Dr. med. C. Lindner

10. ERKLÄRUNG

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, 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.