

Aus der
Heinrich Heine Universität Düsseldorf
Zentrum für Kinderheilkunde

Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. U. Göbel

**Regulation der Interleukin 2 induzierten Interleukin 5 und
Interleukin 13 Produktion durch mononukleäre Zellen
gesunder Blutspender**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jens Verheyen
2001

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Dekan Univ.-prof. Dr. med Häussinger

Referent: Prof.-Dr. Körholz

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Krutmann

Meinen Eltern,
und meinem Doktorvater
in Dankbarkeit gewidmet

Gliederung

1 Einleitung

1.1	Das Immunsystem – historischer Überblick	3
1.2	Modell der T-Zellaktivierung	4
1.3	Immuntherapie mit IL-2 zur Behandlung onkologischer Erkrankungen	6
1.4	Fragestellungen	9

2 Material und Methoden

2.1	Material.....	10
2.1.1	Chemikalien.....	10
2.1.2	Antikörper und Zytokine.....	10
2.1.3	ELISA	11
2.1.4	Kulturmedium	11
2.2	Methoden	12
2.2.1	Isolation mononukleärer Zellen	12
2.2.2	Stimulation mononukleärer Zellen.....	12
2.2.3	Durchflusszytometrische Analysen.....	12
2.2.4	Analyse der Zytokinproduktion mittels ELISA.....	14
2.2.5	Statistik	17

3 Resultate

3.1	Stimulation mononukleären Zellen mit unterschiedlichen IL-2 Konzentrationen	18
3.2	Kinetik der IL-2 induzierten Zytokinproduktion	18
3.3	Kinetik der IL-2 induzierten CD40L Expression	21
3.4	Wirkung von IL-12, IL-4 und IL-10 auf die IL-2 vermittelte CD40L Expression	21

3.5	Die Bedeutung der endogenen IL-10 und IL-12 Produktion für die IL-2 induzierten Zytokine	25
3.6	Wirkung von exogenem IL-12, IL-4 und IL-10 auf die IL-2 vermittelte Zytokinproduktion.....	25
3.7	Bedeutung des CD40L und exogenem IL-12 für die IL-2 vermittelte Zytokinproduktion.....	26
4	Diskussion	
4.1	IL-2 abhängige Zytokinproduktion in mononukleären Zellen – Dosisabhängigkeit und zeitliche Kinetik	30
4.2	Bedeutung der CD40L/CD40 Interaktion und des IL-12 für die Regulation der IL-2 vermittelten Zytokinproduktion.....	32
4.3	Die Rolle des IL-4 in der IL-2 induzierten Zytokinproduktion.....	35
4.4	Die Rolle des IL-10 in der IL-2 induzierten Zytokinproduktion	36
4.5	Biologische Bedeutung der Ergebnisse für die Behandlung mit IL-2	38
5	Abkürzungen.....	41
6	Literatur.....	42
7	Lebenslauf.....	53
8	Zusammenfassung.....	55

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem – historischer Überblick

Seit Ende des 18. Jahrhunderts wurden nach und nach einzelne Komponenten des Immunsystems identifiziert und deren Zusammenhänge aufgedeckt. Als erste Bestandteile des Immunsystems wurden Antikörper produzierende Lymphozyten entdeckt, die nach dem Areal der bursa fabricii bei Vögeln benannt wurden (B-Lymphozyten) (Glick et al., 1956, Pauling et al., 1940). Mit der Entdeckung der monoklonalen Antikörpertechnik durch Köhler et al. (1975) konnten weitere Zellpopulationen charakterisiert werden, wie Monozyten, Natürliche-Killer-(NK)-Zellen und Granulozyten. Ein weiterer wichtiger Schritt war die Differenzierung von T-Helferzellen und T-Suppressorzellen als Untergruppen der T-Zellen (Claman et al., 1966).

Während die Helferzellen (CD4(+)) im wesentlichen für die Regulation der humoralen Immunität und die Antikörperproduktion verantwortlich gemacht worden sind, wurden die Reaktionen der zellulären Immunität hauptsächlich den zytotoxischen/Suppressor T-Lymphozyten (CD8(+)) zugeschrieben (Evans et al., 1977). Neben den zellulären Komponenten des Immunsystems wurden nach und nach auch Botenstoffe des Immunsystems identifiziert (Interleukine), die die Proliferation und die Differenzierung der Zellen maßgeblich mitbeeinflussen. Eines der zuerst charakterisierten Interleukine war das Interleukin (IL-)2 (Morgan et al., 1976). Die Entdeckung weiterer Interleukine und deren Bedeutung im Immunsystem brachte einen wesentlichen Durchbruch für das Verständnis des Immunsystems. Es war nun möglich, Zellen über ihre Oberflächeneigenschaften (CD4 oder CD8 positiv) hinaus, nach funktionellen Gesichtspunkten zu unterteilen. Diese Einteilung geht auf Mosmann et al. (1986) zurück, die erstmals die unterschiedlichen T-Lymphozyten der Maus beschrieben. Dabei werden T1 Zellen, die IL-2 und IFN- γ produzieren und T2 Zellen, die IL-10, IL-4, IL-5 und IL-13 bilden, unterschieden. Während die T1 Zellen das zelluläre Immunsystem unterstützen, wirken die T2 Zellen besonders fördernd auf die humorale Immunantwort (Mosmann et al., 1989 und 1996). Im menschlichen Immunsystem ist die Zugehörigkeit der T-Zellen zu den Untergruppen nicht so strikt ausgeprägt wie in der Maus, jedoch konnten T1 und T2 Gewichtungen sowohl bei

CD4(+) als auch CD8(+) T-Zellen gefunden werden (Halverson et al., 1997). Die Unterscheidung in dieselben zwei Untergruppen kann darüber hinaus auch bei NK-Zellen vorgenommen werden (Perrit et al., 1998). Aktuell konzentriert sich die Forschung insbesondere auf die Regulation der T1 und T2 Differenzierung durch dendritische Zellen. Dabei kann gezeigt werden, dass die T1/T2 Zellen durch unterschiedliche DZ-Populationen, sog. DZ1 und DZ2, Zellen reguliert werden (Kadowski et al., 2001; Liu et al., 2000).

1.2 Modell der T-Zellaktivierung

Die Aktivierung von T-Zellen vollzieht sich durch das Zusammenspiel verschiedener exogener und endogener Faktoren und mündet in der Differenzierung der Zellen zu hochspezialisierten Effektorzellen. Zunächst wird von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) ein Peptidantigen an der Oberfläche präsentiert, an das der entsprechende T-Zell-Rezeptor bindet. Es wird angenommen, dass es im Menschen mehr als 10^6 unterschiedliche T-Zellrezeptorspezifitäten gibt, die jeweils für ein bestimmtes Antigen passend sind. Die Bindung des Peptids an den Rezeptor ist der Ausgangspunkt für die Aktivierung der T-Zellen. In-vitro kann dieser Schritt durch die Stimulation der T-Zellen über das CD3 Antigen simuliert werden (Tao et al., 1997).

Die alleinige Stimulation des TCR reicht allerdings nicht für eine ausreichende Aktivierung der T-Zellen aus. Zusätzlich werden sogenannte kostimulatorische Signale benötigt. Hierbei kommt es zu weiteren Interaktionen der aktivierten T-Zellen mit APZ. Darüber hinaus wird die T-Zellaktivierung durch Zytokine wie z.B. IL-2 und IL-12 verstärkt.

Eine wichtige Kostimulation für die T-Zellen ist die Interaktion von CD28 auf den T-Zellen mit den APZ-Epitopen CD80/CD86. Die Bedeutung dieser Kostimulation wird anschaulich durch Versuche mit CD28 Knock-out Mäusen. Hier zeigt sich eine normale Entwicklung der B- und T-Zellen, wobei die B-Zellen jedoch eine geringere Menge Immunglobuline produzieren, und die T-Zellen wesentlich schwächer auf verschiedene Stimulanzen reagieren (Heinly et al., 2001; Shahiniam et al., 1993). T-Zellen CD28-inkompetenter Mäuse weisen eine insuffiziente Stimulierbarkeit durch

Lectin auf. Dieses zeigt sich in einer verminderten IL-2 Produktion und IL-2R Expression. Zusätzlich sind die Mäuse vor dem Schock durch das Enterotoxin des *Staphylococcus aureus* geschützt, da eine Überaktivierung des Immunsystems ausbleibt.

Eine nachhaltige Hemmung der T-Zell Aktivierung konnte in in-vitro Experimenten von van Gool et al. (1999) durch die Blockade der CD28/CD80/86 Interaktion nachgewiesen werden. Eine Hemmung dieses Systems und zusätzliche Blockade der CD40L-CD40 Interaktion führt bei MNZ, die mit allogenen MNZ stimuliert werden, zu einer völligen Anergie. Die Zellen zeigen keine Proliferation, keine zytolytische Aktivität und keine Produktion von IL-2, IL-5 und IL-13 nach Stimulation, wohingegen IL-10 deutlich vermehrt vorgefunden wird. Die Zugabe von exogenem IL-2 kann diesen hemmenden Effekt teilweise überwinden.

Neben dem CD28-CD80/86 System ist somit ein weiteres kostimulatorisches Signal von großer Bedeutung, das CD40L/CD40 System. Die Rezeptoren des CD40/CD40L Systems gehören zu der Familie der TNF-Rezeptoren. Der ca. 35 kDa schwere CD40L befindet sich in erster Linie auf aktivierten T-Zellen und das ca. 50 kDa schwere CD40 auf B-Zellen, Monozyten und anderen APZ (Oppenheim et al., 2001). CD40L knock-out Mäuse zeigen neben einer stark gestörten humoralen Immunantwort mit alleiniger IgM Bildung auch eine gestörte zelluläre Reaktion auf verschiedene Infektionsreize (Grewal et al., 1995). Als Zeichen für diese zuletzt genannte Immunschwäche finden sich stark erniedrigte IFN- γ Werte in-vivo, wie auch nach Stimulation in-vitro (Grewal et al., 1996). Darüber hinaus wird das von Monozyten und anderen APZ gebildete IL-12 wesentlich verringert nachgewiesen. Da IL-12 ein wesentlicher Faktor bei der Induktion des IFN- γ ist, ist die verminderte IL-12 Produktion verantwortlich für die bei diesen Mäuse gestörte IFN- γ Produktion.

Als drittes Element bei der T-Zellaktivierung sind lösliche Zytokine von besonderer Bedeutung. Eine zentrale Rolle nimmt hierbei das IL-2 ein. Dieses Zytokin wurde Ende der 70er Jahre erstmals als T-Zell Wachstumsfaktor beschrieben, der von PHA stimulierten Lymphozyten ausgeschüttet wird (Kendall et al., 1984; Morgan et al., 1976). Das IL-2 ist ca. 15,5 kDa schwer, besteht aus 133 Aminosäuren und wird in erster Linie von T-Lymphozyten gebildet (Oppenheim et al., 2001). IL-2 kann seinen

eigenen, auf T-Zellen exprimierten Rezeptor induzieren und somit seine eigene Wirkung wesentlich verstärken (Minami et al., 1993).

Die Regulation der IL-2 vermittelten Zytokinproduktion sowie deren Aktivierungskaskaden ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen mit humanen T-Lymphozyten. IL-2 induziert zunächst über die Intensivierung der T-APC Interaktion die Bildung von IL-12. IL-12 kann dann seinerseits in den T-Zellen die Bildung von IFN- γ und IL-10 induzieren (Bönig et al., 1999; Körholz et al., 1997).

Das IL-10 führt über die Hemmung der IL-12 Produktion zu einer negativen Rückkopplung. Ein anderer Faktor, der in diesem System negativ regulatorische Wirkungen besitzt, ist das TGF- β . Durch TGF- β wird die Bildung von IL-12 (Körholz et al., 1997) aber auch die Expression des IL-12 Rezeptors moduliert (Kitani et al., 2000, Ludviksson et al., 2000). Hierdurch kann TGF- β die IL-2 induzierte IFN- γ und IL-10 Produktion herabregulieren. Durch die Substitution mit IL-12 kann die IL-10 vermittelte Inhibition der IL-2 induzierten Zytokinproduktion vollständig und die durch TGF- β induzierte Suppression partiell blockiert werden (Bönig et al., 1999; Körholz et al., 1997).

Neben IL-10 und TGF- β kann die IL-2 induzierte Zytokinproduktion auch durch IL-4 beeinflusst werden. Wie IL-10 hemmt IL-4 die IL-12 Produktion, und darüber hinaus verändert es die IL-12 Rezeptor-Expression, ähnlich dem TGF- β (Gallob et al., 1997; Wu et al., 1997). Besonders der High-Affinity Rezeptor für das IL-12, der vor allem auf aktivierten T-Zellen zu finden ist, wird durch das IL-4 beeinflusst. Die Regulation erfolgt über die verminderte Expression einer Komponente des zweiteiligen Rezeptors, wodurch das ohnehin supprimierte IL-12 zusätzlich weniger wirksam wird.

1.3 Immuntherapie mit IL-2 zur Behandlung onkologischer Erkrankungen

Die wachsende Erkenntnis über die IL-2 vermittelten immunstimulatorischen Qualitäten hat bereits 1985 zu ersten Therapieversuchen mit diesem Zytokin geführt (Rosenberger et al., 1985). Es soll bei Patienten eine Immunaktivierung initiieren, die bei der Bekämpfung der unterschiedlichen gut- und bösartigen Krankheiten hilfreich

sein soll. Das Hauptaugenmerk wird dabei auf die vermehrte zytolytische Aktivität der T-Zellen und der NK-Zellen gelegt. Daraus ergibt sich das vorrangige Ziel, den Körper zu befähigen, die entarteten Zellen zu eliminieren (Rosenberger et al., 1987). In der Onkologie werden insbesondere prognostisch ungünstige, schon metastasierte Nierenzellkarzinome und Melanome mit IL-2 therapiert (Rosenberger et al., 1994). Die Ergebnisse dieser Studien sind bisher jedoch eher enttäuschend, da die IL-2 induzierten Immunreaktionen nur bei maximal 15% der Patienten eine Wirkung zeigen und nur in 10% der Fälle zu einer Remission führen.

Mögliche Ursachen für das geringe Ansprechen könnten einerseits in der geringen Immunogenität bestimmter Tumoren bestehen, oder andererseits in den von verschiedenen Tumoren gebildeten immunsuppressiven Zytokinen. Von einer Reihe von Tumoren ist bekannt, dass sie IL-10 und TGF- β bilden. In Gliomzelllinien finden sich IL-10-mRNA Stränge, die eine eigene IL-10 Synthese nachweisen (Huettnier et al., 1997). In Magenkarzinomzellen können sowohl IL-10-mRNA Stränge als auch TGF- β -mRNA Stränge gefunden werden, wobei besonders in vielen wenig differenzierten Adenokarzinomen ein positiver Nachweis gelingt (Morisaki et al., 1996). Die Ausschüttung dieser beiden Zytokine könnte von entscheidender Bedeutung für die Unfähigkeit des Immunsystems sein, im ausreichenden Maße gegen diese Zellen vorzugehen (Bönig et al., 1999; Körholz et al., 1997). Das Verständnis der Art und Weise deren Einflussnahme auf die IL-2 regulierten Zytokinantworten kann helfen, durch Kombination mit anderen Zytokinen Escapemechanismen zu unterwandern.

Neben der eingeschränkten Wirksamkeit der IL-2 Therapie stehen vor allem die erheblichen Nebenwirkungen im Mittelpunkt des Interesses. Es werden vielfältige Symptome beschrieben, die in unterschiedlicher Ausprägung dosislimitierend sind, wie Fieber, Gerinnungsstörungen (Oleksowicz et al., 1994), das Kapillarleck-Syndrom mit peripheren und pulmonalen Ödemen, Hypotonie und akutes Nierenversagen (Shalmi et al., 1990). In Zusammenhang mit den IL-2 Gaben wird auch eine Eosinophilie beobachtet, für deren Entstehen das IL-5 von kausaler Bedeutung zu sein scheint (Schaafma et al., 1991; van Haelst et al., 1991).

IL-5 wurde 1985 von Sanderson et al. erstmals als ein Wachstumsfaktor beschrieben, der zu einer gesteigerten Bildung und Reifung von eosinophilen Granulozyten im Knochenmark führt. Darüber hinaus bewirkt es eine Aktivierung dieser Granulozyten eine gesteigerte Adhäsions- und Degranulationsfähigkeit mit gleichzeitig verlängerter Überlebenszeit (Weltman et al., 1998). IL-5 wird hauptsächlich in den CD4(+) T-Zellen (TH2) gebildet (Oppenheim et al., 2001; Till et al., 1995 und 1997a); aber zu einem geringeren Anteil auch in anderen Zellen z.B. NK-Zellen (Barata et al., 1998; Paul et al. 1990; Walker et al., 1998). Zur Bestimmung der biologischen Bedeutung dieses Zytokins bieten sich besonders Versuche mit IL-5 Knock-out Mäusen an. Bei diesen Mäusen wird auf der einen Seite die typische Eosinophilie bestimmter Erkrankungen nicht mehr beobachtet und andererseits führt die Exposition mit einem Antigen-Aerosol nicht mehr zu einem charakteristischen entzündlichen Infiltrat in der Lunge (Kopf et al., 1996; Matthaei et al., 1997; Wang et al., 1998). Dagegen ist die TH2 Entwicklung und Differenzierung der Lymphozyten nur unwesentlich beeinflusst. Dieses weist auf unabhängige Faktoren hin, die weitere Bereiche der allergischen Reaktionen kontrollieren. Die Rolle des IL-5 und die von ihm gesteuerten Eosinophilie für die Pathogenese allergischer Erkrankungen ist ausführlich untersucht worden (Morita et al., 1996; Sanderson et al., 1986). Bei Patienten mit entsprechenden Erkrankungen kann eine allgemeine TH2 Aktivierung nachgewiesen werden, zu der auch die vermehrte IL-5 Ausschüttung gehört. Auch die IL-5 abhängigen eosinophilen Granulozyten spielen eine wesentliche Rolle bei dem Entstehen und der Unterhaltung allergischer Entzündungsreaktionen. Die Bedeutung der IL-5/Eosinophilen Achse für die IL-2 Nebenwirkungen wird durch die erhöhten IL-5 Plasmaspiegel unter der Therapie unterstrichen (von Haelst et al., 1991; Bönig et al., 2000). In Analogie zu den vielfältigen Erscheinungsformen allergischer Erkrankungen lässt sich schlussfolgern, dass die IL-5 Induktion durch die IL-2 Therapie die allergieähnlichen Nebenwirkungen mitbedingt.

Die Experimente mit IL-5 knock-out Mäusen weisen auf weitere unabhängige Bestandteile der allergischen Reaktionen hin. Ein erst relativ spät in seiner Bedeutung für das TH2 System erkanntes Zytokin ist das IL-13. 1993 wurde es erstmals als ein in-vitro Aktivator von Mauslymphozyten beschrieben, der später IL-13 genannt wurde (McKenzie et al., 1993 und 1998a). Es besteht aus 132

Aminosäuren und wird ähnlich dem IL-5 hauptsächlich in T-Zellen und NK-Zellen produziert (Oppenheim et al., 2001). Von besonderer Bedeutung ist die durch IL-13 vermittelte Wirkung auf B-Zellen, die einen Antikörperklassenwechsel zur IgE Produktion vollziehen sowie bei gleichzeitiger CD40-Stimulation, mit der Proliferation beginnen (Punnonen et al., 1993). In IL-13 knock-out Mäusen zeigt sich, dass eine funktionelle TH2 Antwort von dem Vorhandensein des IL-13 abhängig ist. Diese Mäuse weisen ein basal erniedrigtes IgE auf und zeigen nur eine unvollständige TH2 Reaktion nach Kontakt mit einem hyperreagiblen Antigen (McKenzie et al., 1998b). Die IL-13 Wirkung kann unabhängig von IL-5 oder IL-4 nachgewiesen werden (Emson et al., 1998; Minty et al., 1997; Wills-Karp et al., 1998).

Das Modell des IL-2 induzierten Zytokinnetzwerkes soll nun um die beiden sich ergänzenden Zytokine IL-5 und IL-13 erweitert werden. Dabei sind deren Wechselwirkungen mit anderen Komponenten dieses Systems von besonderem Interesse, um theoretische Grundlagen zu erhalten, die eine Optimierung der IL-2 Therapie erlauben.

1.4 Fragestellungen

1. Unterscheidet sich die Kinetik der IL-2 induzierten IL-5 und IL-13 Produktion in MNZ von der Bildungskinetik des IL-12, IL-10 oder IFN- γ ?
2. Wie wird das IL-2-induzierte CD40L reguliert, welche Bedeutung besitzt CD40L für den IL-2 Effekt?
3. Wie wirken IL-10, IL-12 und IL-4 auf die IL-2 induzierte Bildung von IL-5 und IL-13?
4. Welche Bedeutung haben die endogen produzierten Zytokine IL-10 und IL-12 für die vom IL-2 induzierte Immunantwort?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Ammoniumchlorid (0,83%)	Apotheke der Heinrich-Heine Universität
Aqua pro injectione	Delta Pharma (Pfullingen)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma (Deisenhofen)
Ficoll	Pharmacia (Freiburg)
Fötales Kälberserum (FCS)	GIBCO (Karlsruhe)
L-Glutamin	GIBCO (Karlsruhe)
PBS	Serag Wiessner (Naila)
Penicillin	GIBCO (Karlsruhe)
RPMI-1640 Medium	GIBCO (Karlsruhe)
Streptomycin	GIBCO (Karlsruhe)
Tris/HCl	Merck (Darmstadt)

2.1.2 Antikörper und Zytokine

Anti-CD3 (Maus IgG2a, Klon X 35)	Coulter (Hamburg)
Anti-CD40L (Maus IgG1, Klon 24-31)	Calbiochem (Bad Soden)
Anti-CD40L-PE (Maus IgG1, Klon 24-31)	Calbiochem (Bad Soden)
Anti-IL-12 (Maus IgG1, Klon 24910.1)	R&D (Wiesbaden)
Anti-IL10R (Maus IgG1, Klon 37607.11)	R&D (Wiesbaden)
IgG1 (Maus IgG1, Klon 11711.11)	R&D (Wiesbaden)
IL- 2 (E.coli, $18 \cdot 10^6$ U/mg)	Euro-Cetus (Ratingen)
IL-10 (Sf21, Reinheit >97%, $>5 \cdot 10^5$ U/mg))	Biosource (Ratingen)
IL-12 (Sf21, Reinheit >95%, $1,24 \cdot 10^4$ U/mg))	R&D (Wiesbaden)
IL-4 (E.coli, Reinheit >97%, $2,9 \cdot 10^4$ U/mg)	R&D (Wiesbaden)

2.1.3 ELISA

IL-12-Elisa	Laboserv (Staufenberg)
IL-4-Elisa	Genzyme (Cambridge)
IL-10-Elisa Monoklonaler Antikörper : B-N10 Polyklonaler Antikörper : B-T10	Laboserv (Staufenberg)
IFN- γ -Elisa Monoklonaler Antikörper : M020308 Polyklonaler Antikörper : M020309	Pharmingen (Hamburg)
IL-5-Elisa Monoklonaler Antikörper : M029949 Polyklonaler Antikörper : M029950	Pharmingen (Hamburg)
IL-13-Elisa Monoklonaler Antikörper : RL01 Polyklonaler Antikörper : SY03	R&D (Wiesbaden)

2.1.4 Kulturmedium

Zellkulturmedium R-10	50 ml	FCS
	10 U/ml	Penicilin
	10 μ g/ml	Streptomycin
	2 mM	L-Glutamin
	450 ml	RPMI-1640

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation mononukleärer Zellen

Mononukleäre Zellen werden aus Buffy-Coat Präparationen gesunder Spender durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Nach 1:2 Verdünnung mit PBS wird das Blut auf Ficoll überschichtet und bei 600 x g und Raumtemperatur für 15 min zentrifugiert. Die in der Interphase befindlichen mononukleären Zellen werden in ein steriles Falcon-Röhrchen (Falcon, Heidelberg) überführt und mit PBS gewaschen (400 x g, 6 min, Raumtemperatur). Eventuell noch vorhandene Erythrozyten werden durch Inkubation mit Ammoniumchlorid (0,83%) (4 min, auf Eis) lysiert. Die löslichen Erythrozytenbestandteile werden durch 3-maliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend werden die Zellen mit Medium auf 1×10^6 /ml eingestellt.

2.2.2 Stimulation mononukleärer Zellen

Die mononukleären Zellen werden zur Stimulation mit anti-CD3 sedimentiert und nach Zugabe von 100 ng anti-CD3/ 10^6 für 20 min auf Eis inkubiert. Danach werden sie in Zellkulturmedium (10^6 Zellen/ml) aufgenommen und auf die Zellkulturplatten überführt (Costar, Bodenheim). Danach werden die jeweils beschriebenen Zytokine und/oder Antikörper hinzugegeben. Die Kulturvierung erfolgt in wasserdampfgesättigter Atmosphäre, bei 5%CO₂ und 37°C. Nach Ablauf der Inkubationszeit, werden die Zellen in Eppendorfgefäße überführt und 6 min bei 400 x g sedimentiert. Anschließend werden zellfreie Überstände zur Bestimmung der sezernierten Zytokine gewonnen und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

2.2.3 Durchflusszytometrische Analysen

Zur Bestimmung von Oberflächenantigenen auf den mononukleären Zellen, werden 2×10^5 Zellen in speziellen FACS-Röhrchen (Falcon, Heidelberg) sedimentiert, gefolgt von einem Waschschrift (PBS, 400 g, RT). Danach werden die Zellen mit 1 µg direkt-fluoreszenmarkierten Antikörpern für 20 min im Dunkeln inkubiert. Nach

dem Waschen mit PBS (400 x g, 6 min, RT) werden die Zellen in 200 µl PBS aufgenommen und mittels FACScan analysiert.

Mit Hilfe eines FACScan (Beston Dickinson) werden durchflusszytometrisch simultan bis zu 5 verschiedene Parameter einer Zelle (Tab.1) analysiert.

Tab. 1 Untersuchungsparameter bei der Durchflusszytometrie

Zelleigenschaft	FACScan Parameter
a) Größe	Vorwärtsstreulicht (FSC)
b) Granularität	Seitwärtsstreulicht (SSC)
c) Markierung durch <u>F</u> luorescein- <u>I</u> sothiocyanat (FITC)-gekoppelte Antikörper*	Fluoreszenz 1
d) Markierung durch <u>P</u> hycoerythrin (PE)- gekoppelte Antikörper*	Fluoreszenz 2
e) Markierung durch <u>P</u> eridin <u>ch</u> lorophyll (PerCP/5FU)-gekoppelte Antikörper*	Fluoreszenz 3

*FITC emittiert grünes (525 nm), PE rotes (578 nm), PerCP/5FU dunkelrotes (680 nm) Licht.

Zur Auswertung der Messergebnisse stehen die FACScan- und LYSIS II- Software zur Verfügung. Die Analyse der Lymphozytenpopulationen erfolgt in einem sogenannten Lymphozytenfenster, das durch die Parameter Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht definiert wird. Es werden 10^4 Zellen je Probe analysiert. Als Negativ-Kontrolle dienen mit nicht-reagiblen Isotypkontroll-Antikörpern inkubierte Zellen.

2.2.4 Analyse der Zytokinproduktion mittels Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Die Zytokinsekretion in den zellfreien Kulturüberständen wird mittels kommerziell erwerblicher *solid phase sandwich* ELISA bestimmt. Zur Bestimmung werden Microtiterplatten mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper beschichtet, der als capture Antikörper fungiert (Abb.1).

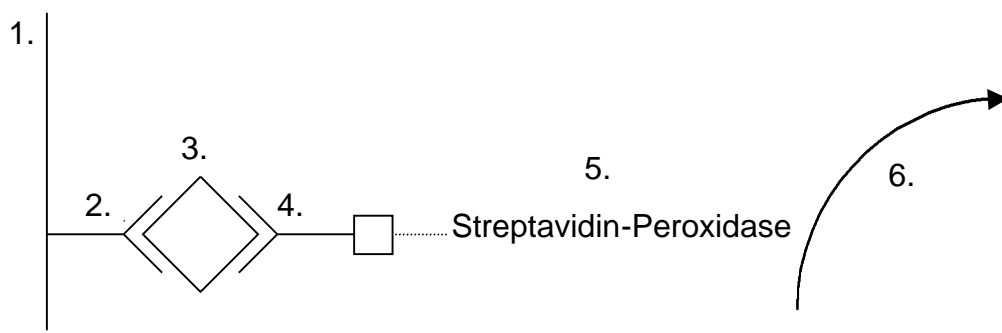


Abb.1: Prinzip der Zytokin-ELISA

Schematische Darstellung der einzelnen Reaktionsschritten eines ELISA, innerhalb eines einzelnen Röhrchens. Bindung des gesuchten Antigens an zwei verschiedene Antikörper und die anschließend dadurch initiierte Farbreaktion.

Legende :

1 : Platte

2 : Capture-Antikörper

3 : spezifisches Antigen

4 : Biotingekoppelter Antikörper

5 : Streptavidin-Peroxidase-Komplex

6 : Farbreaktion

Bei dem IL-12 Elisa werden allerdings schon fertig beschichtete Platten mitgeliefert. Anschließend wird eine Lösung (Saturation-Lösung) in die Microplatiterplatten gegeben, die eine unspezifische Reaktion mit an der Wand haftenden Partikel verhindern soll. Die Proben werden entsprechend den Angaben in der Tabelle 1 unverdünnt oder verdünnt, mit einem Gesamtvolumen von 100µl, eingesetzt.

Als Vergleichslösungen dienen verschiedene Ansätze mit bekannten Konzentrationen in dem vorgegeben Nachweisbereich des ELISA (Abb.2).

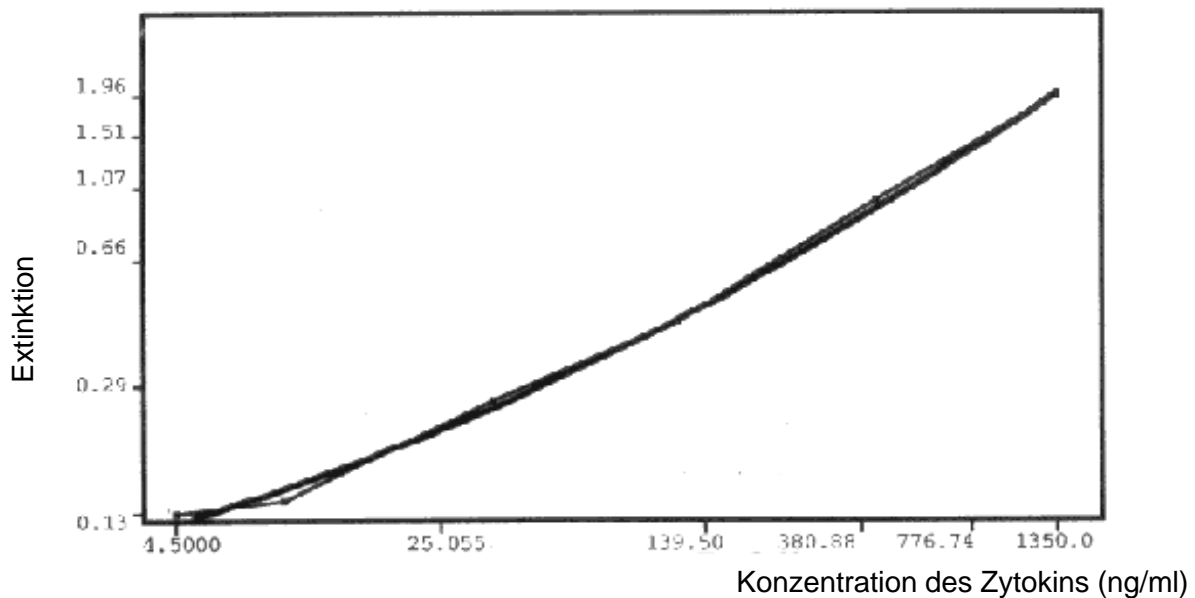


Abb.2: Beispiel für eine Standardkurve :

Aufgetragen sind die einzelnen Zytokinkonzentrationen (x-Achse) gegen die entsprechende Extinktion (y-Achse). Ermittelt wird die Standardkurve anhand bekannter Konzentrationen und der daraus resultierenden Funktion. Diese errechnete Funktion gibt die Grundlage für die Umrechnung der gemessenen Extinktionen in die gesuchte Konzentration des spezifischen Zytokins.

In der folgenden Inkubationszeit bindet das spezifische Zytokin an den immobilisierten Antikörper. Nach weiteren Waschvorgängen werden spezifische biotinylierte polyklonale Antikörper hinzugegeben, die gegen andere Zytokin-Epitope gerichtet sind, als die monoklonalen Antikörper. Die entsprechende Bindung dieser Antikörper an das schon immobilisierte Zytokin stellt den nächsten Schritt zum Nachweis des spezifischen Zytokins dar. Überschüssige Antikörper werden durch anschließende Waschvorgänge entfernt. Das an den Antikörper gekoppelte Biotin wird im weiteren genutzt, um über die Bindung mit Streptavidin eine Peroxidase-Markierung des Antikörper-Antigen Komplex zu erreichen. Der IL-12 ELISA verzichtet auf diesen Zwischenschritt, da das Streptavidin schon an den Detection-Antikörper gebunden ist. Nachdem nicht gebundenes Enzym ebenfalls durch mehrmaliges Waschen entfernt worden ist, wird die Substratlösung Tetramethylbenzidin hinzugegeben. Diese dient der Peroxidase als Substrat und wird zu einem blauen Farbstoff gespalten. Die Intensität der Farbe ist proportional zu der

Zytokinkonzentration und wird durch die Messung in einem Spektralphotometer bei 450 nm Wellenlänge bestimmt.

Tabelle 2 : Ablauf der ELISA

	IL-12-Elisa	IL-10-Elisa	IL-5-Elisa IFN- γ -Elisa	IL-13-Elisa
Beschichtung der Platten <i>Inkubation</i>		100 μ l 24h, 4°	100 μ l <i>über Nacht, RT</i>	100 μ l <i>über Nacht, RT</i>
Blockierende Lösung <i>Inkubation</i>		200 μ l 5%BSA 2h, RT	200 μ l Assay Diluent 1h, RT	300 μ l 1%BSA, 0,05%NaN ₃ 5%Saccharose 1h, RT
Probe <i>Inkubation</i>	100 μ l unverdünnt 100 μ l Lösung A 2h, RT	100 μ l 1/10 verd. 50 μ l AK-biot. 1h, RT	100 μ l IL-5 unverdünnt IFN- γ (1/50verd.) 2h, RT	100 μ l unverdünnt 2h, RT
Biotinylierter Antikörper <i>Inkubation</i>	50 μ l AK-HRP 100 μ l Lösung A 2h, RT		100 μ l 1h, RT	100 μ l 1h, RT
HRP- Streptavidin <i>Reagenz</i> <i>Inkubation</i>		100 μ l 20min,RT	100 μ l 1h, RT	100 μ l 20min, RT

	IL-12-Elisa	IL-10-Elisa	IL-5-Elisa IFN- γ -Elisa	IL-13-Elisa
Substrat	200 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Lösung				
<i>Inkubation</i>	<i>30min, RT</i>	<i>20min, RT</i>	<i>30min, RT</i>	<i>20min, RT</i>
Stop-Lsg (1M H ₂ SO ₄)	50 μ l	100 μ l	50 μ l	50 μ l

2.2.5 Statistik

Zur Verdeutlichung der Ergebnisse werden die Mittelwerte aus sechs unabhängigen Experimenten und der entsprechende Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

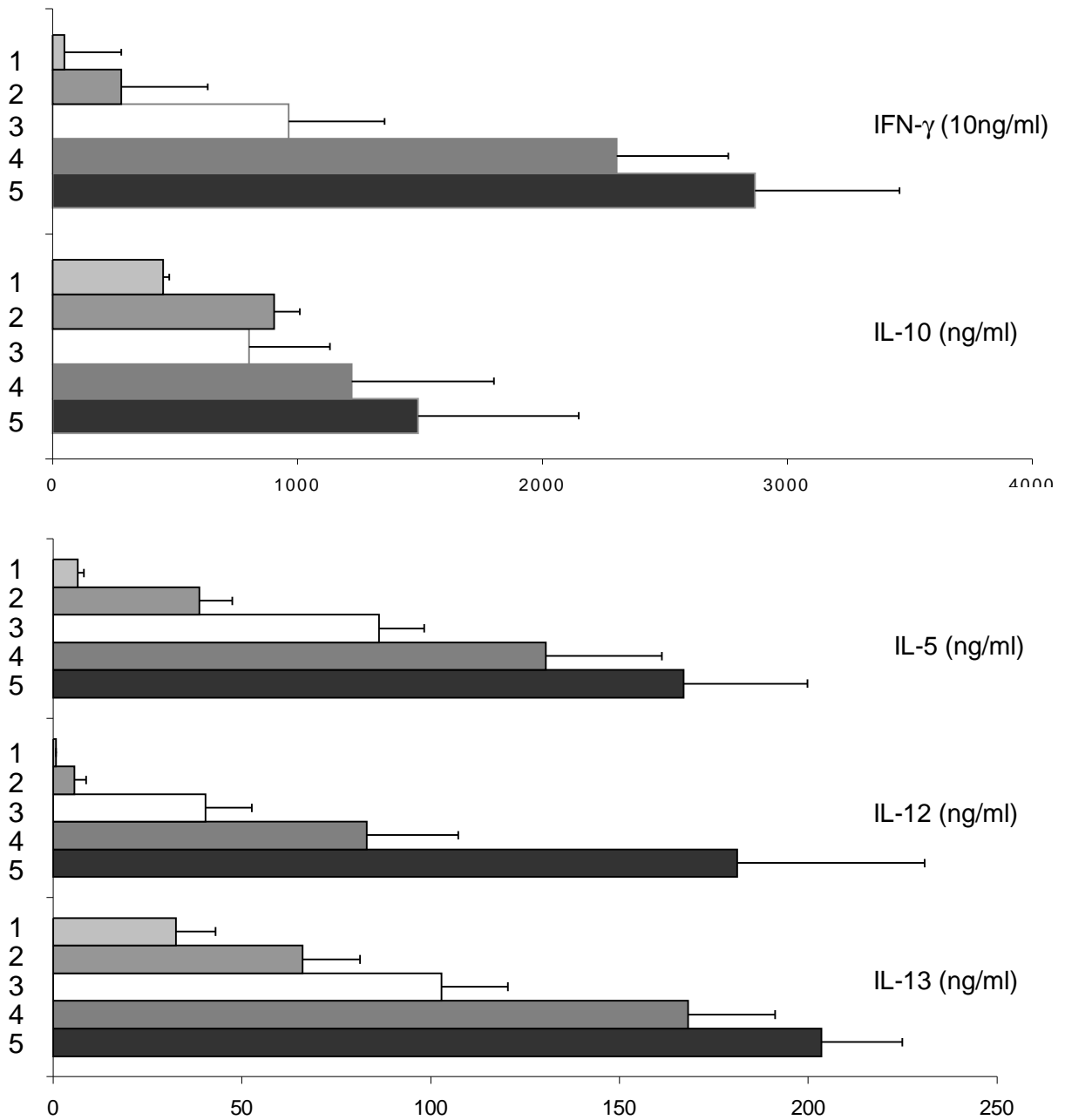
3 Resultate

3.1 Stimulation mit verschiedenen IL-2 Konzentrationen

Zu Anfang wird die Induktion der verschiedenen Zytokine (IFN- γ , IL-5, IL-10, IL-12 und IL-13) in Abhängigkeit von der eingesetzten IL-2 Konzentration untersucht. Die mononukleären Zellen (MNZ) werden 72h mit anti-CD3 alleine und zusätzlich mit IL-2 in verschiedenen Konzentrationen stimuliert. (Abb 3). Schon bei einer IL-2 Konzentration von 1 ng/ml steigen die gemessenen Zytokine im Vergleich mit der alleinigen anti-CD3 Stimulation an, wobei sich eine klare Dosis-Wirkungsbeziehung ergibt. IL-2 in einer Konzentration von 10 ng/ml führt zu einer weiteren Steigerung der Menge aller Zytokine, deren maximale Konzentrationen durch 100 ng/ml IL-2 Zugabe erreicht wird. Die deutlichsten Steigerungen werden beim IFN- γ und IL-12 gesehen.

3.2 Kinetik der IL-2 induzierten Zytokinproduktion

Die Abhängigkeit der Zytokinproduktion von der Inkubationszeit wird ermittelt, indem zu sechs verschiedenen Zeitpunkten (24, 48, 72, 96, 120, 144h) die entsprechenden Zytokine in den Überständen bestimmt werden. Die MNZ werden zu diesem Zweck mit anti-CD3 und IL-2 (100 ng/ml) stimuliert. Die IL-10 Produktion ist bereits nach 24h deutlich durch das IL-2 vermehrt, zeigt nach 48h ihren Maximalwert und sinkt anschließend wieder ab. IL-5 erreicht nach 48h ebenfalls seinen maximalen Wertebereich, zeigt aber im weiteren Beobachtungszeitraum einen Plateauverlauf. Ein ähnlicher Verlauf findet sich auch für die IL-12 Kinetik. IFN- γ dagegen steigt leicht verzögert an, so dass das Plateau der Zytokinproduktion erst zwischen 72 und 96 Stunden erreicht wird. IL-13 unterscheidet sich vom IFN- γ nur durch einen weiteren Spitzenwert nach 120 Stunden (Abb. 4).



1 : Med 2 : IOT3 3 : IL-2 (1ng/ml) 4 : IL-2 (10ng/ml) 5 : IL-2 (100ng/ml)

Abb. 3 Produktion der Zytokine IFN-γ, IL-5, IL-10, IL-12 und IL-13 in Abhängigkeit von der verwendeten IL-2 Konzentration

Mononukleäre Zellen (MNZ) werden entsprechend den angegebenen Bedingungen stimuliert. Nach 72 stündiger Inkubation werden in den zellfreien Überständen die Zytokinkonzentrationen mittels spezifischer ELISA gemessen (IFN-γ, IL-10, IL-5, IL-13 und IL-12). Ein dosisabhängiger Effekt zeigt sich für alle untersuchten Zytokine. Gezeigt sind die Mittelwerte und SEM aus 6 unabhängigen Experimenten.

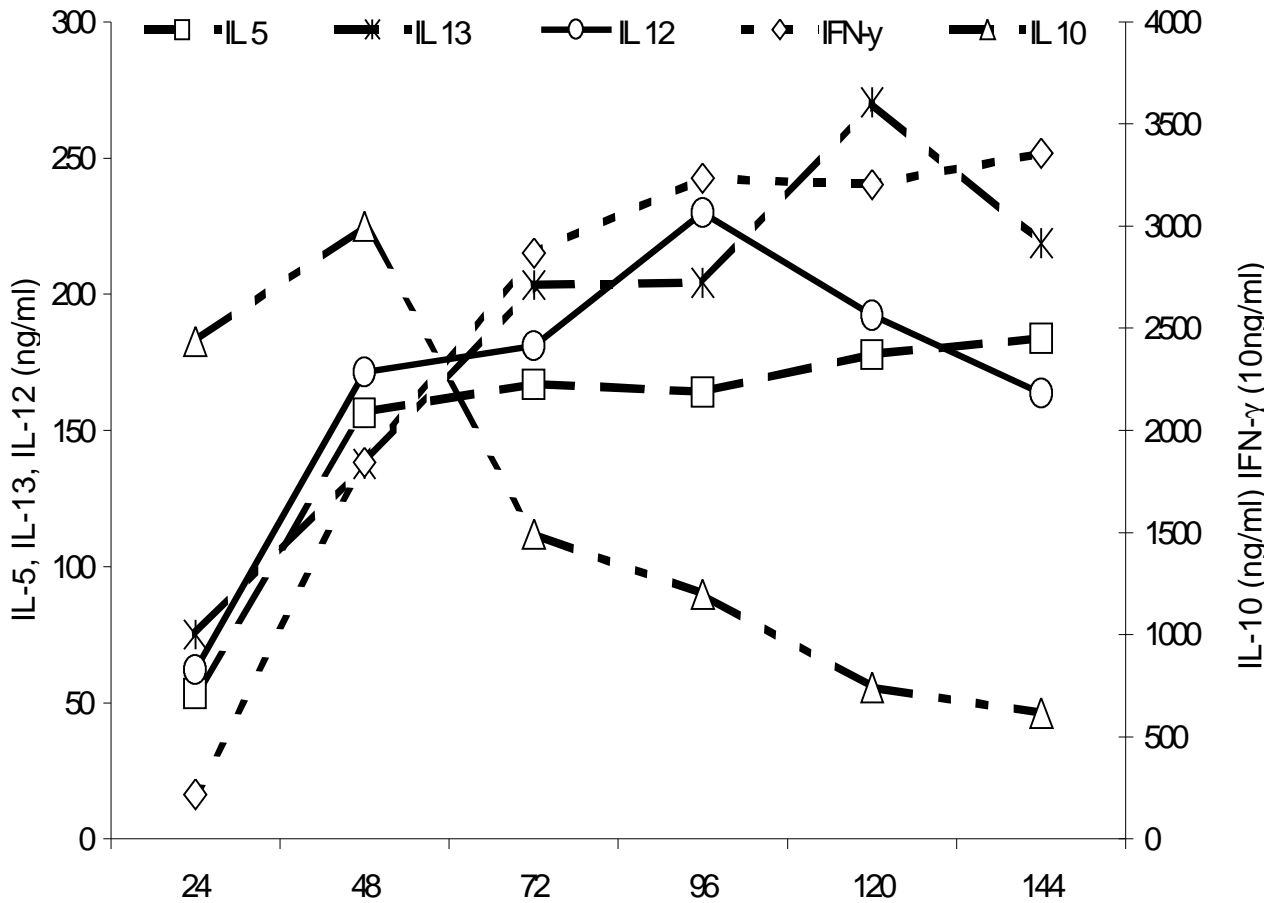


Abb. 4 Kinetik der IL-2 induzierbaren Zytokine

Anti-CD3 aktivierte mononukleäre Zellen werden mit IL-2 (100 ng/ml) stimuliert, wobei Überstände zur Zytokinanalyse nach 24, 48, 72, 96, 120 und 144h gewonnen werden. Anschließend werden IFN- γ , IL-10, IL-5, IL-13 und IL-12 mittels spezifischer ELISA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 6 unabhängigen Experimenten.

3.3 Kinetik der IL-2 induzierten CD40L Expression

Periphere mononukleäre Zellen werden isoliert, in einem Nährmedium mit oder ohne zusätzliche Stimulatoren kultiviert und nach verschiedenen Zeiten (12, 24, 48, 72 und 96 Stunden) mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf ihre CD40L Expression untersucht. Die MNZ werden mit anti-CD3 alleine oder in Kombination mit IL-2 stimuliert, als Kontrolle dient ein Ansatz mit unveränderter Nährlösung. Der Anteil der CD40L positiven Zellen variiert bereits nach 12h stark zwischen den einzelnen Bedingungen, wobei sich ein deutlich stimulatorischer Effekt des anti-CD3 als auch des IL-2 abzeichnet. Ein Maximum für die gemessenen Werte wird nach 48 Stunden erreicht, mit einer anschließenden allmählichen Abnahme. Nach 96 Stunden werden wiederum Werte ähnlich denen nach 24h gemessen. Unter der Kombinationsstimulation mit IL-2 und anti-CD3 findet sich deutlich mehr CD40L positive Zellen, zu allen gemessenen Zeiten, als bei den beiden anderen Bedingungen. (Abb. 5)

3.4 Wirkung von IL-12, IL-4 und IL-10 auf die IL-2 vermittelte CD40L Expression

Im Folgenden wird untersucht, welchen Einfluss die regulatorischen Zytokine IL-4, IL-10 und IL-12 auf die IL-2 vermittelte Expression von CD40L haben. Zu diesem Zwecke werden MNZ neben den drei schon beschriebenen Stimulationsweisen in einer Kombination aus anti-CD3 und IL-2 sowie IL-12, IL-10 oder IL-4 stimuliert. IL-12 führt zu einer Steigerung der CD40L Expression, während IL-4 einen gegenteiligen Effekt zeigt. IL-10 bewirkt nur einen marginalen Unterschied zu der alleinigen IL-2 Stimulation in der Beeinflussung der CD40L Expression (Abb 6/7).

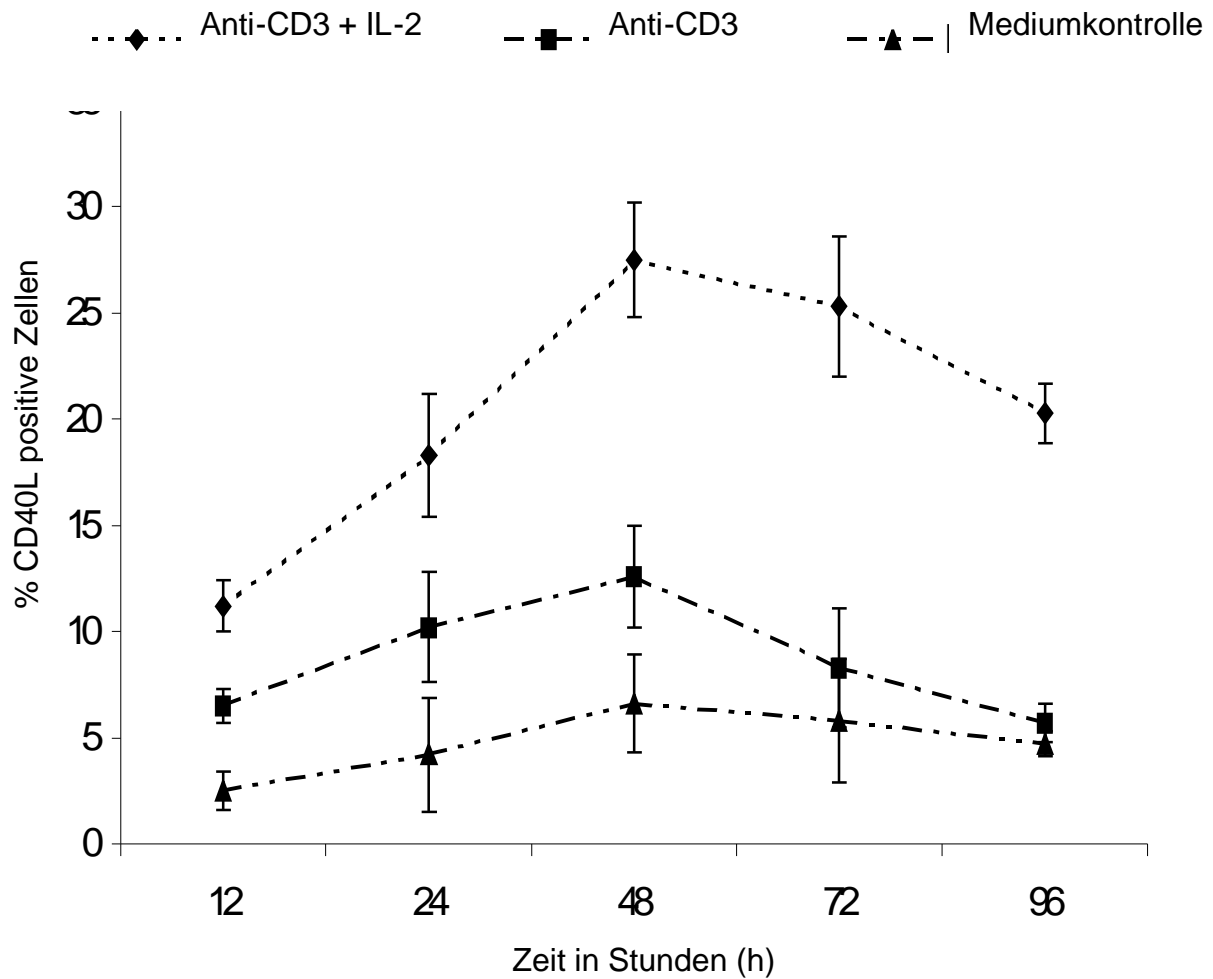


Abb 5 Kinetik der IL-2 induzierten CD40 Ligand Expression in mononukleären Zellen

Mononukleäre Zellen werden für 12, 24, 48, 72, 96h wie angegeben stimuliert. Anschließend wird die CD40L Expression im FACS gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte (+/-SEM) aus 6 unabhängigen Experimenten.

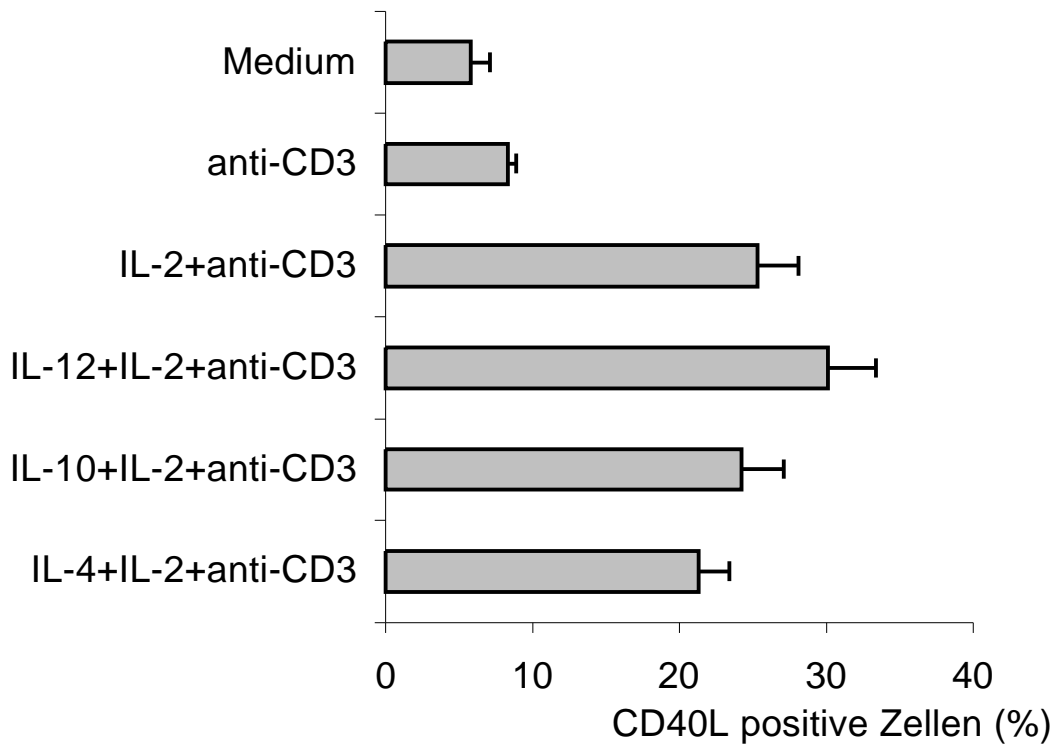


Abb 6 Bedeutung von IL-12, IL-10 und IL-4 für die IL-2 induzierte CD40L Expression auf mononukleären Zellen

Mononukleäre Zellen werden neben anti-CD3 und IL-2 (100 ng/ml) zusätzlich mit IL-12 (10 ng/ml), IL-10 (10 ng/ml) und IL-4 (100 U/ml) stimuliert. Nach 72h werde die CD40L Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM von 6 unabhängigen Experimenten

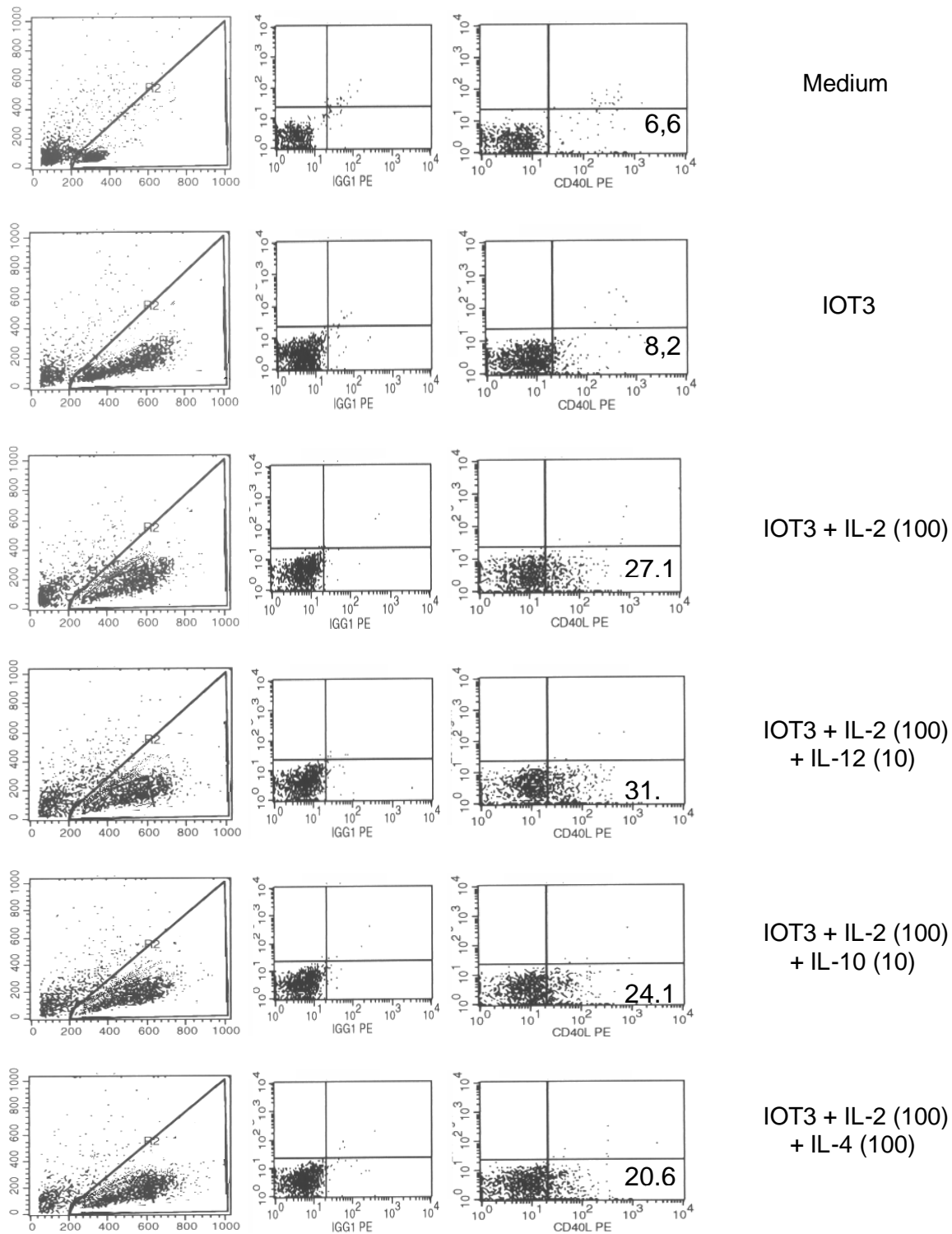


Abb.7 Regulation der IL-2 induzierten CD40L Expression – FACS Analysen

Dargestellt sind FACS Auswertungen der CD40L Expression eines repräsentativen Versuches mit MNZ. Links kommen die MNZ im FSC gegen den SSC zur Darstellung. Ausgewertet werden die sich im Lymphozytengate (R2) befindlichen Zellen. In der Mitte befindet sich das Ergebnis der Isotyp-Kontrolle mit einem PE gekoppelten unspezifischen Antikörper gleichen Subtyps. Rechts werden die Ergebnisse der CD40L Färbung zusammen mit der entsprechenden Stimulation präsentiert.

3.5 Die Bedeutung der endogenen IL-10 und IL-12 Produktion für die IL-2 induzierten Zytokine

Die Rolle des endogen produzierten IL-10 in dem IL-2 induzierten Zytokinnetzwerk, wird mit Hilfe eines IL-10-Rezeptor neutralisierenden Antikörpers bestimmt. Die Blockade der IL-10 Wirkung führt zu einer gesteigerten Freisetzung aller fünf untersuchten Zytokine (Tab 2). Auf die Untersuchung der endogenen IL-4 Wirkung wird verzichtet, da kein endogenes IL-4 mittels ELISA nachgewiesen werden konnte.

Die Blockade des endogenen IL-12 erfolgt durch einen IL-12 inhibierenden Antikörper, der gleichzeitig mit IL-2 (100ng/ml) zu den anti-CD-3 aktivierten mononukleären Zellen hinzu gegeben wird. Es zeigt sich eine deutlich geringere Menge an IFN- γ und IL-10 in den Überständen der Zellen. Demgegenüber ist die Ausschüttung von IL-5 und IL-13 aus den Zellen erhöht (Tab 3).

3.6 Wirkung von exogenem IL-12, IL-4 und IL-10 auf die IL-2 vermittelte Zytokinproduktion

Anti-CD-3 und IL-2 (100ng/ml) stimulierte mononukleäre Zellen werden mit IL-10, IL-4 und IL-12 alleine oder in einer Kombination aus IL-12 mit IL-10 oder IL-4 für 72h stimuliert. Exogenes IL-12 führt sowohl zu einer gesteigerten Sekretion des IFN- γ als auch des IL-10. Demgegenüber findet sich ein gegenteiliger Effekt für die IL-5 und IL-13 Mengen. Beide Zytokine werden nach IL-12 Zugabe in verringerter Konzentration in den Überständen vorgefunden, wobei der Effekt auf das IL-13 stärker ausfällt (Abb. 8).

IL-4 seinerseits wirkt inhibierend auf die IFN- γ Menge und steigert die Ausschüttung der TH2 Zytokine IL-5 und IL-13. IL-10 verhält sich diesmal nicht dem IFN- γ ähnlich, sondern wird gleichermaßen dem IL-5 und IL-13 durch IL-4 induziert. Dieser Effekt fällt in vergleichbarer Stärke zu der IL-12 Induktion aus. IL-4 und IL-12 in Kombination verwendet, führt zu einer additiven Verstärkung der IL-10 Produktion. Bei den anderen Zytokinen jedoch wirken IL-4 und IL-12 entgegengesetzt. So können ca. 50% der durch IL-4 demonstrierten IFN- γ Reduktion durch IL-12

ausgeglichen werden. Auch der positive Einfluss auf die IL-5 und IL-13 Ausschüttung wird durch das IL-12 verringert (Abb. 8).

IL-10 wirkt auf alle fünf Zytokine gleichermaßen reduzierend. Die IFN- γ Reduktion ist dabei Folge der verminderten IL-12 Menge, da durch zusätzlich exogen zugeführtes IL-12 diese Wirkung vollständig aufgehoben werden kann. Andererseits wirken IL-12 und IL-10 zumindestens teilweise unterschiedlich auf die IL-5 und IL-13 Konzentrationen, da durch IL-12 Zugabe eine geringe weitere Abnahme bewirkt werden kann (Abb. 8)

3.7 Bedeutung des CD40L und exogenem IL-12 für die IL-2 vermittelte Zyokinproduktion

Der Stellenwert der CD40/CD40L Interaktion für die verschiedenen Zytokine wird mittels eines CD40L neutralisierenden Antikörpers bestimmt. Als Kontrolle dient ein entsprechender unspezifischer Antikörper gleichen Subtyps. Da durch die CD40/CD40L Interaktion bekanntermaßen die Antigen präsentierenden Zellen zur IL-12 Ausschüttung angeregt werden können, wird des Weiteren untersucht, ob exogen zugeführtes IL-12 den Einfluss des CD40L neutralisierenden Antikörpers aufheben kann. Durch die CD40L Blockade wird die IL-2 induzierte IL-12 Produktion vermindert, daraus resultierend kommt es zu verringerten Mengen von IFN- γ und IL-10. Ebenfalls durch die IL-12 Reduktion findet sich IL-5 und IL-13 vermehrt in den Überständen. Die CD40L Blockade bringt somit gleichartige Ergebnisse wie die IL-12 Blockade. Weiterhin kann durch exogenes IL-12 die Ergebnisse der CD40L Blockade völlig neutralisiert werden.

Tabelle 2 Einfluss des endogenen IL-10 auf die IL-2 induzierten Zytokine

Zytokine	Steigerung der Zytokine in Prozent im Vergleich zur Kontrolle*
IFN- γ	348,3 (+/- 88,0)
IL-12	800,1 (+/- 241,4)
IL-13	190,1 (+/- 20,1)
IL-5	300,7 (+/- 96,6)

*% = ((Konzentration der Zytokine bei Koinkubation mit dem anti-IL10-Rezeptor-Antikörper) / (Konzentration der Zytokine bei Koinkubation mit einem Isotyp-Kontroll-Antikörper))x100%

Zur Blockade der endogenen IL-10 Wirkung wird ein anti-IL10 Rezeptor in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ zu anti-CD3 und IL-2 (100 ng/ml) gleichzeitig stimulierten MNZ gegeben. Als Kontrolle wird ein unspezifischer Antikörper gleichen Isotyps gewählt. Gezeigt ist der Mittelwert aus 6 unabhängigen Experimenten und der entsprechende SEM.

Tabelle 3 Einfluss des endogenen IL-12 auf die IL-2 induzierten Zytokine

Zytokine	Verhältnis der Zytokine in Prozent Im Vergleich zur Kontrolle*
IFN- γ	32,1 (+/- 10,1)
IL-10	55,8 (+/- 2,5)
IL-13	275,9 (+/- 43,3)
IL-5	368,5 (+/- 90,8)

*% = ((Konzentration der Zytokine bei Koinkubation mit dem anti-IL-12 Antikörper) / (Konzentration der Zytokine bei Koinkubation mit einem Isotyp-Kontroll Antikörper))x100%

Zur Blockade der endogenen IL-12 Wirkung wurde ein IL-12 neutralisierender Antikörper in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ zu gleichzeitig anti-CD3 und IL-2 (100 ng/ml) stimulierten MNZ gegeben. Als Kontrolle wird ein unspezifischer Antikörper gleichen Isotyps gewählt. Gezeigt ist der Mittelwert aus 6 unabhängigen Experimenten und der entsprechende SEM.

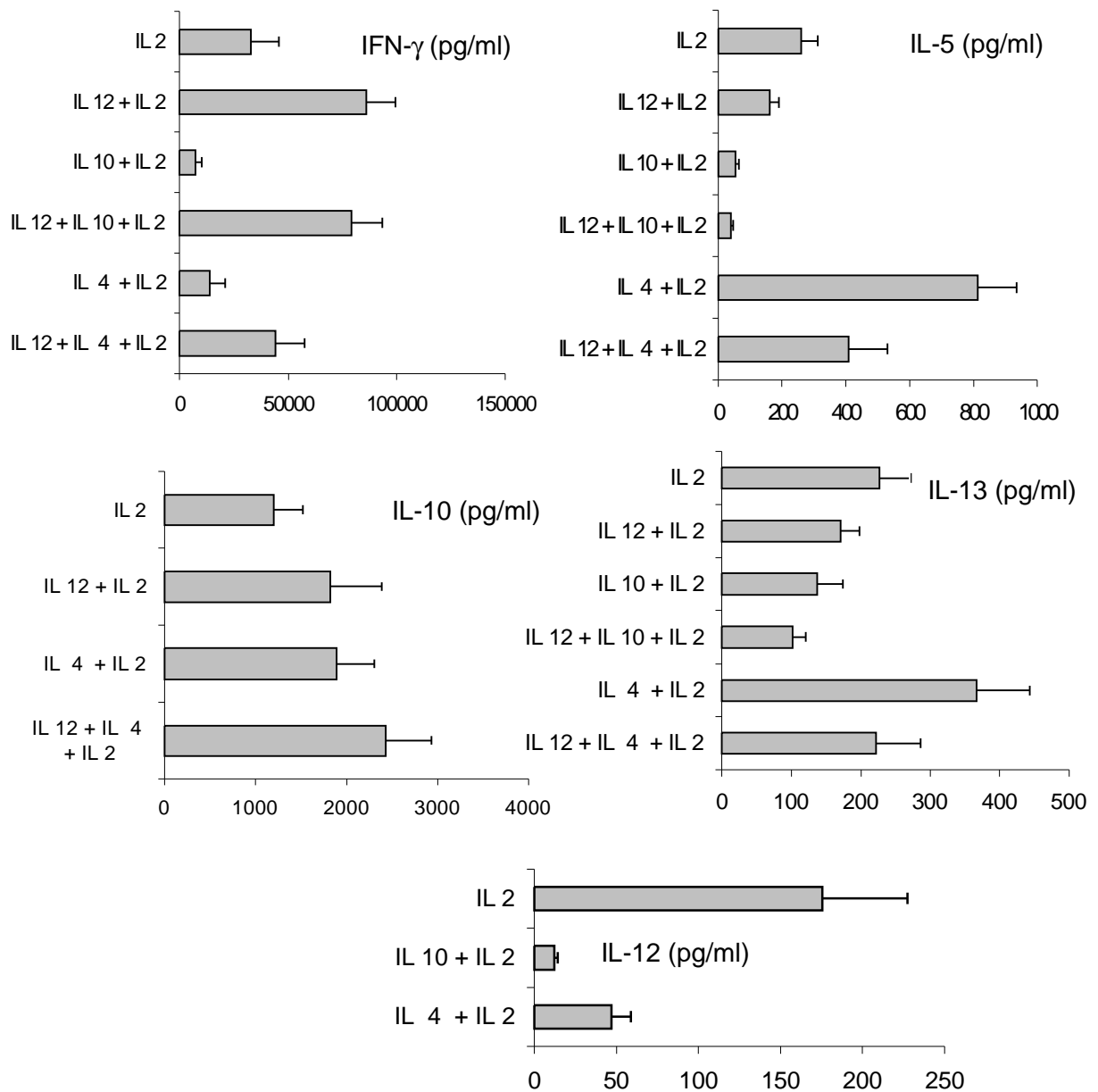


Abb 8 Bedeutung von IL-12, IL-10 und IL-4 für die IL-2 vermittelte Zytokinproduktion.

Neben der Grundstimulation mit anti-CD3 und IL-2 (100ng/ml) werden als weitere Zytokine IL-12 (10 ng/ml), IL-10 (10 ng/ml) oder IL-4 (100 U/ml) wie aufgeführt hinzugegeben. Die Bildung der angegebenen Zytokine wird nach 72h in Überständen mit Hilfe der ELISA-Technik bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 6 unabhängigen Experimenten und deren SEM.

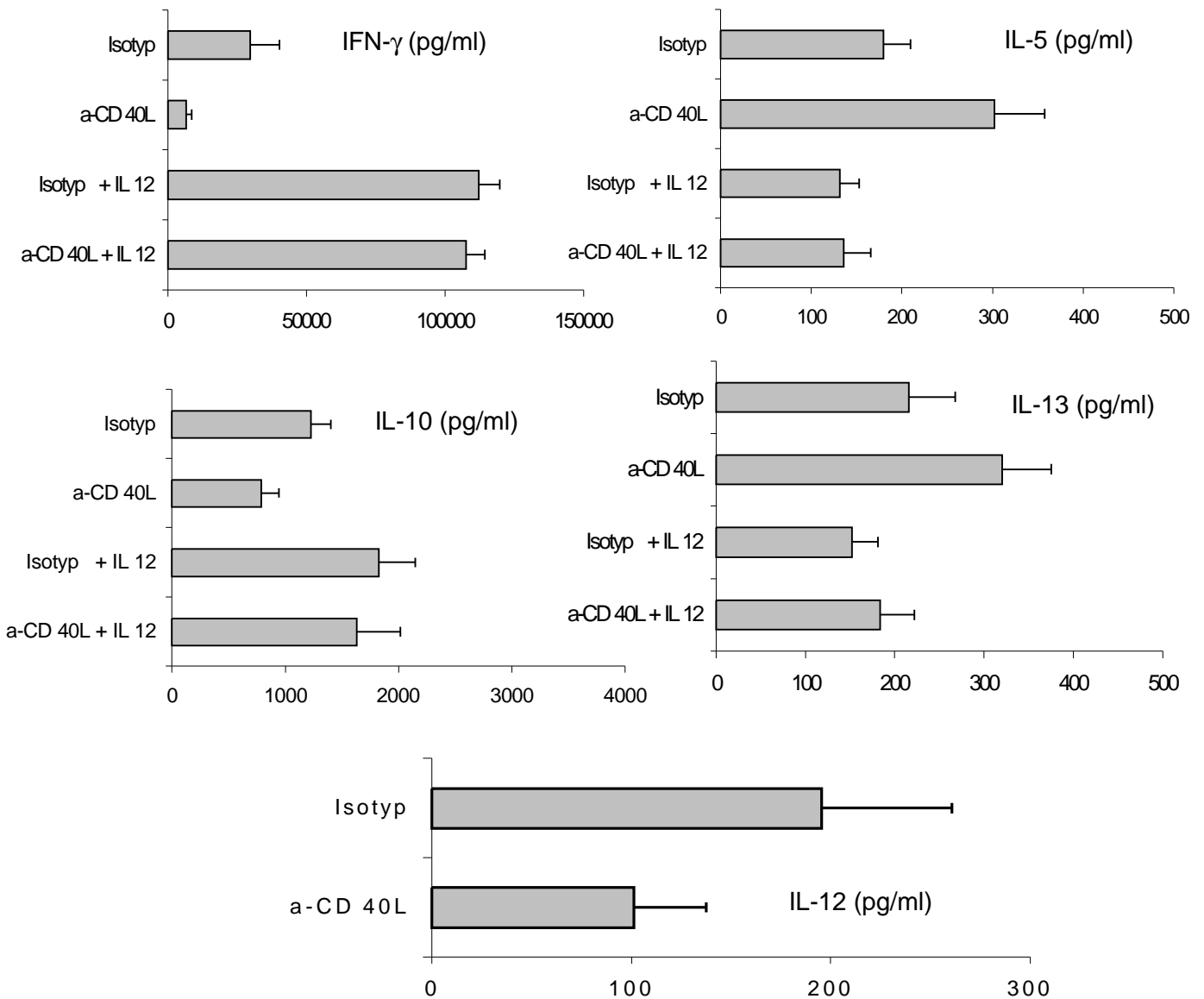


Abb 9 Bedeutung der CD40L/CD40 Interaktion für die IL-2 induzierten Zytokine

Die anti-CD3 und IL-2 (100 ng/ml) stimulierten MNZ werden zusätzlich mit CD40L neutralisierenden Antikörper kostimuliert, um die CD40-CD40L Interaktion zu unterbinden. Als Kontrolle werden Antikörper gleichen Isotyps verwendet. Zum Ausgleich der durch anti-CD40L supprimierten IL-12 Produktion wird exogenes IL-12 (10 ng/ml) hinzugegeben. Die angegebenen Zytokine werden dann im ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 6 unabhängigen Experimenten und deren SEM.

4 Diskussion

4.1 IL-2 abhängige Zytokinproduktionen in mononukleären Zellen - Dosisabhängigkeit und zeitliche Kinetik

Durch in vitro Analysen konnten bedeutende Regulationsmechanismen der IL-2 vermittelten T-Zellaktivierung aufgeklärt werden. Viele dieser Untersuchungen haben angereicherte Zellpopulationen oder T-Zellklone verwendet (Bönig et al., 1999; De Waal et al., 1993; Körholz et al., 1997; Leonard et al., 1997; Weltmann et al., 1998). Im Rahmen dieser Arbeit werden bewusst Untersuchungen an mononukleären Zellen durchgeführt, um insbesondere die Interaktionen der verschiedenen Zellpopulation besser erfassen zu können.

Die Analysen zeigen, dass IL-2 die Bildung verschiedener Zytokine konzentrationsabhängig induziert. Dabei werden die höchsten Zytokinmengen durch IL-2 Konzentrationen von 100 ng/ml induziert. Ähnliche Beobachtungen werden auch von anderen Autoren gemacht, die sich mit der IL-2 Regulation beschäftigen. In einem System mit gereinigten T-Zellen (>90%), in dem die IL-2 vermittelten Zytokinproduktionen von TNF- α , IFN- γ und IL-10 untersucht worden sind, sind mit dieser Untersuchung übereinstimmende Ergebnisse gefunden worden (Körholz et al., 1997). Zusätzliche FACS-Analysen der Oberflächenexpression von CD25 (IL-2-Rezeptor) in diesem T-Zell System haben darüber hinaus einen IL-2 dosisabhängigen Anstieg der CD25-positiven T-Zellen darstellen können.

Hohe IL-2 Konzentrationen haben den Vorteil, dass sie einen deutlicheren Anstieg der Zytokinkonzentrationen bewirken. Dieses macht es möglich, verschiedene Effekte besser zu unterscheiden und Zytokinkonzentrationen im mittleren Nachweisbereich des jeweiligen ELISA Systems zu erreichen. Trotzdem sind die verwendeten IL-2 Konzentrationen nicht biologisch irrelevant. Messungen unter niedrigdosierter IL-2 Therapie bei Patienten mit nachgewiesener HIV-Infektion, haben Spitzenspiegel von bis zu 35pM bei einer Dosierung von $0,5 \cdot 10^6 \text{ U/m}^2$ zeigen können (Jacobson et al., 1996). Ein zugrunde gelegtes Molekulargewicht von 15kDa des IL-2 führt dabei zu einer Konzentration von 0,525 ng/ml im Blut. Allerdings

werden bei der Hochdosis IL-2 Therapie bis zu $12 \cdot 10^6$ U/m²/24h verabreicht (Bönig et al., 2000), so dass die Plasmakonzentrationen entsprechend höher ausfallen dürften.

Bei der Kinetik der IL-2 induzierten Zytokine lässt sich IL-10 bereits nach 24 Stunden vermehrt nachweisen. Die IL-10 Menge erreicht nach 48 Stunden ihr Maximum und fällt anschließend allmählich wieder ab. Dieses korreliert mit den Beobachtungen von Körholz et al. (1997) im T-Zellsystem. Dort wurde auch gezeigt, dass IL-10 neben anderen Zytokinen auch seine eigene Synthese hemmt. Es fand sich eine verringerte IL-10-mRNA Menge in Zellen, die mit IL-2 und IL-10 inkubiert worden waren (Körholz et al., 1997). Somit lässt sich auch die zunehmende IL-10 Abnahme mit steigender Inkubationszeit durch die eigene IL-10 Wirkung als negative Rückkopplungshemmung erklären.

Die initial hohe Menge IL-10 könnte daneben auch eine Ursache dafür sein, dass die anderen Zytokine erst mit Abschwächung des negativen IL-10 Signals ansteigen. Eine Möglichkeit der Einflussnahme des IL-10 auf die anderen Zytokine besteht in der Hemmung der IL-12 Ausschüttung. Diese führt konsekutiv zu einer Reduzierung der IL-12 abhängigen Zytokine IFN- γ und TNF- α . Diese Induktionshierarchie gilt jedoch nicht für alle Zellpopulationen im selben Maße. Während IFN- γ und TNF- α im T-Zell System hauptsächlich über die IL-12 Herunterregulation beeinflusst werden, stehen in anderen Zellpopulationen weitere Regulationswege zur Verfügung. Shin et al. (1999) haben anhand gereinigter Monozyten (>95%) zeigen können, dass in diesem System die TNF- α Inhibition durch IL-10 nicht über IL-12 oder IL-1 β gesteuert wird. Bei der Stimulation von Monozyten mit LPS und IL-10 ist durch zusätzliches exogenes IL-12 oder IL-1 β der negative Effekt auf die TNF- α Menge nicht zu überwinden. Somit wird deutlich, dass in vivo eine Vielzahl von unterschiedlichen Wirkungen desselben Zytokins berücksichtigt werden müssen.

Von den anderen Zytokinen steigen anschließend IL-12 und IL-5 gefolgt von IFN- γ und IL-13 an; allen gemeinsam ist der Plateauverlauf im weiterem Zeitintervall. Die zeitliche Abhängigkeit der Produktion von IL-12 und IFN- γ ist dabei auffallend und Ausdruck dafür, dass IL-12 die Induktion des IFN- γ steuert. Auch in anderen Kultursystemen wird eine ähnliche Kinetik derselben Zytokine beobachtet. McHugh et al. (1996) haben MNZ mit PHA in einer Konzentration von 10 μ g/ml stimuliert. 24h

nach Stimulationsstart stieg zunächst IL-2 an, anschließend IL-10 mit einem Maximum nach 72h. In Übereinstimmung mit den dargestellten Ergebnissen hat IL-5 einen 24-stündigen Vorsprung vor dem IFN- γ beim Erreichen seines Höchstwertes. Abweichend dazu hat IL-12 einen zweigipfligen Verlauf mit einem Maximum nach 72h und 192h gezeigt. Dieses zusammen mit den Kurvenverläufen als Optimumkurven kann durch die unterschiedlichen Stimulationsweisen erklärt werden, da IL-2 nicht erst induziert werden muss, sondern exogen in ausreichender Menge zugeführt wird.

Die Kurve der IL-2 induzierten CD40L Expression erreicht nach 48h ihr Maximum und nimmt anschließend allmählich ab. Die IL-12 Ausschüttung verhält sich ähnlich, indem ebenfalls nach 48h ein Plateau erreicht wird. Diese Gemeinsamkeiten sind Ausdruck der bestehenden Abhängigkeiten zwischen der CD40L Expression auf den T-Zellen, der Interaktion mit dem CD40 Protein auf den APZ und der darauffolgenden IL-12 Ausschüttung derselben Zellen (Cella et al., 1996). Die Ergebnisse stimmen auch mit den Beobachtungen auf RNA-Ebene überein, die von Ford et al. (1999) beschrieben wurden. Aus isolierten CD4(+) Zellen, die mit anti-CD3 stimuliert wurden, wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten CD40L mRNA gewonnen, die die größte Stabilität zwischen 24h und 48h zeigte.

4.2 Bedeutung der CD40L/CD40 Interaktion und des IL-12 für die Regulation der IL-2 vermittelten Zytokinproduktion

IL-2 bewirkt in anti-CD3 aktivierten MNZ eine gesteigerte CD40L Expression. Die Interaktion dieses Liganden mit seinem Rezeptor auf den APZ ist essentiell für die IL-2 induzierte IL-12 Produktion. Die Blockade der CD40L/CD40 Interaktion führt zu einer Inhibition von IL-12 und den IL-12 abhängigen Zytokinen IFN- γ und IL-10. Demgegenüber ist die Bildung von IL-13 und IL-5 unter diesen Bedingungen erhöht. Durch IL-12 Zugabe kann sowohl der supprimierende als auch der steigernde Effekt des anti-CD40L Antikörpers vollständig ausgeglichen werden.

Die Bedeutung der CD40L/CD40 Interaktion wurde schon vorher in anderen experimentellen Systemen untersucht. Peng et al. (1996) demonstrierten, dass

gereinigte T-Zellen (>99%) nach vorheriger TCR-Aktivierung mit Hilfe der CD40/CD40L Interaktion vermehrt IFN- γ bilden. Zusätzlich wirkt exogenes IL-12 synergistisch in der Induktion von IFN- γ bei gleichzeitiger CD40L Stimulation. IL-12 selber führt zu einer nochmalig gesteigerten CD40L Expression auf den Zellen, wie es von Peng et al. (1996) für T-Zellen gezeigt wurde. Auf der anderen Seite ist das IL-12 eines der vorrangigsten ausgeschütteten Zytokine der APZ nach CD40 Stimulation (Cella et al., 1996).

Eine Blockade dieses Systems in der Maus durch neutralisierende Antikörper verursacht deutlich verringerte Mengen von gebildetem IL-2, IL-12 und IFN- γ durch Splenozyten. Der CD40L Antikörper bewirkt des Weiteren eine Verbesserung der Überlebensrate nach allogener CD4(+) Infusion, durch die Unterdrückung der tödlichen Immunantwort (Blazer et al., 1997). Auch in anderen tierexperimentellen Systemen wurde die Bedeutung der CD40L/CD40 Interaktion für die T-Zell vermittelte Freisetzung von IL-12 bewiesen. CD40L-knock-out Mäuse zeigen signifikant geringere Zytokinreaktionen nach MNZ Stimulation mit Antigenen in-vitro und in-vivo. Diese wird hauptsächlich auf die nur geringe IL-12 Produktion zurückgeführt (Grewal et al., 1996; Kennedy et al., 1996).

IL-12 ist hauptverantwortlich für die IL-2 abhängige IFN- γ Produktion humaner MNZ. Exogenes IL-12 bewirkt in Kombination mit IL-2 eine deutlich gesteigerte IFN- γ Synthese. Neben dem IFN- γ findet sich aber auch IL-10 vermehrt in den Überständen derselben Zellen. Die Versuche mit IL-12 neutralisierendem Antikörper demonstrieren gleichartige Ergebnisse. Durch die Verwendung des Antikörpers kann die IFN- γ - und IL-10-Menge gesenkt werden. Einen gegenteiligen Effekt übt das IL-12 auf die IL-5- und IL-13-Ausschüttung aus. Exogenes IL-12 führt zu einer reduzierten Menge von IL-5 und IL-13, wohingegen durch IL-12 Blockade ein deutlicher Anstieg beider Zytokine verzeichnet werden kann.

IL-12 nimmt in dem Zytokinnetzwerk die Rolle des wichtigsten TH1 Aktivators ein, demgegenüber wird IL-5 und IL-13 in erster Linie von TH2 Zellen gebildet (Oppenheim et al., 2001). Diese beiden Zellpopulationen stehen in gegenseitiger Konkurrenz zueinander und führen bei einer Aktivierung zu einer Supprimierung der jeweils anderen Untergruppe. Die Wege der Beeinflussung und weitere

regulatorische Vorgänge innerhalb dieser Systeme sind noch nicht abschließend erforscht. Die negative Beeinflussung durch das IL-12 ist eine Möglichkeit für das TH1 System, eine überschießende TH2 Antwort zu verhindern.

Der negative Einfluss von IL-12 auf die IL-5 Menge konnte auch in anderen Systemen gezeigt werden (Okano et al., 1998). Varga et al. (2000) isolierten MNZ von Patienten mit allergischer Erkrankung und untersuchten die IL-5 Produktion nach IL-12 Stimulation mit dem Ergebnis, dass die MNZ eine deutlich geringere Menge produzierten. MNZ von Patienten mit eosinophilen Szezary Syndrom, die eine gesteigerte IL-5 Ausschüttung aufweisen, produzierten in Anwesenheit von zusätzlichen IL-12 wieder deutlich weniger IL-5 (Suchin et al., 2001). Allergische Erkrankungen, die durch Eosinophilie und TH2 Aktivierung gekennzeichnet sind, wurden daraufhin im Mausmodell auf die Beeinflussbarkeit durch exogenes IL-12 untersucht. Bei Mäusen, die bestimmten Allergenen ausgesetzt werden, verhindert die gleichzeitige intraperitoneale IL-12 Injektion die ansonsten typische IgE Vermehrung und die erhöhte IL-5 Konzentration (Lee et al., 1999). Ähnliche Ergebnisse erzielten auch von Schwarze et al. (1997), die IL-12 den Mäusen intranasal applizierten bei gleichzeitig geringen Nebenwirkungen. Dieses eröffnet neue Perspektiven für immunologische Therapien allergischer Erkrankungen beim Menschen. Erste Versuche in klinischen Studien erbrachten jedoch nur eingeschränkt positive Ergebnisse, da die Bluteosinophilie signifikant abnahm, die pulmonale Situation sich jedoch nicht signifikant verbesserte, und die Reaktionen auf anschließende allergene Reize unbeeinflusst blieben (Bryan et al., 2000). Die geringe Fallzahl dieser Untersuchung mit jeweils ca. 20 Patienten in beiden Gruppen (IL-12 vs. Placebo) und die Möglichkeit, dass andere Faktoren zusätzlichen Einfluss haben, z.B. Kortikoid-sensible und nicht-sensible Erkrankungen bei den Patienten (Naesser et al., 1997), lässt den Stellenwert dieser Therapie auch weiterhin Gegenstand einer kontroversen Diskussion sein.

Erst in neuerer Zeit ist die Bedeutung des Zytokins IL-13 für die Pathogenese allergischer Erkrankungen erkannt worden (McKenzie et al., 1998b; Wills-Karp et al., 1998). Durch diesen Umstand wird auch das Verhältnis von IL-13 zu IL-12 zunehmend interessanter. Ähnlich den beschriebenen Ergebnissen findet sich in isolierten T-Zellen unter anti-CD3 und anti-CD28 Stimulation wesentlich weniger

IL-13 bei gleichzeitiger IL-12 Zugabe als in der Vergleichsgruppe (Jung et al., 1996). Anhand von IL-12-mRNA und IL-13-mRNA Analysen isolierter Zellen und anschließender Kortikoidstimulation können darüber hinaus Asthmapatienten unterschieden werden, die kortikoidresistent und –sensibel sind. Kortikoide führen in Zellen des Lungengewebes bei kortikoidsensiblen Patienten zu einer Verschiebung der mRNA Mengen zugunsten des IL-12 und zuungunsten des IL-13 (Naesser et al., 1997). Dieses Ungleichgewicht zwischen IL-12 und IL-13 wird mittlerweile hauptverantwortlich gemacht für das Entstehen und die Unterhaltung vieler Erkrankungen des allergischen Formenkreises (Wills-Karp et al., 2001). Im Mausmodell wurden erste Versuche mit IL-13 neutralisierenden Antikörpern zur Verhinderung typischer Reaktionen durch von Pilzen induziertes Asthma unternommen (Blease et al., 2001). Die Ergebnisse wiesen einen signifikanten Effekt auf, bei gleichzeitig geringen systemischen Nebenwirkungen, so dass sich die IL-13 Beeinflussung als eine vielversprechende zukünftige Therapieoption darstellt.

4.3 Die Rolle des IL-4 in der IL-2 induzierten Zytokinproduktion

Da endogenes IL-4 mittels ELISA in diesem System nicht nachweisbar ist, beschränkt sich die Untersuchung auf die Wirkungen des exogenen IL-4. Die Schwierigkeit IL-4 in einem ähnlichen System nachzuweisen, beschrieben schon Palmer et al. (1997), die nur nach PHA Stimulation IL-4 in den Überständen fanden. Durch den Einsatz anderer Methoden wird jedoch trotzdem deutlich, dass IL-4 in der IL-2 induzierten Zytokinkaskade seinen festen Platz hat. Beim Vergleich von MNZ, die mit anti-CD3 alleine oder in Kombination mit IL-2 stimuliert wurden, lässt sich vermehrt IFN- γ aber auch IL-4 im Zytoplasma der Zellen darstellen (Verheyen et al., 2001). Der Nachweis gelingt durch die Anwendung einer zytoplasmatischen Färbung im FACS-Scan für IFN- γ und IL-4.

Im Gegensatz zum IL-12 steigert exogenes IL-4 die IL-2 induzierte IL-5 und IL-13 Produktion in MNZ. Eventuell sind diese antagonistischen Wirkungen miteinander verbunden, da IL-4 die IL-2 induzierte IL-12 Menge verringert und gleichzeitig die Expression des IL-12 Rezeptors herunterreguliert (Gallob et al., 1997; Wu et al., 1997). Zusätzlich sind Effekte auf die CD40L Expression nachweisbar, aber nicht in

dem Ausmaße, dass die Stärke IL-12 Reduktion dadurch erklärt werden könnte. Für den induzierenden Effekt des IL-4 auf die Produktion von IL-5 und IL-13 kann somit teilweise die Reduzierung des biologisch aktiven IL-12 verantwortlich gemacht werden. Wenn auch nicht systematisch untersucht, so spricht dennoch für diese Hypothese, dass durch exogenes IL-12 der positive Effekt des IL-4 teilweise neutralisiert werden kann.

Gallob et al. (1997) benutzten IL-4 und IFN- γ als Kostimulatoren, um das Verhalten von PHA aktivierten T-Zellen auf IL-12 zu untersuchen. Dabei fand sich ein durch IL-4 stark reduziertes Ansprechen der Zellen und ein umgekehrtes Verhalten beim IFN- α . Durch Bindungsstudien mit radioaktiven Substanzen wurde der Nachweis erbracht, dass der IL-4 Effekt durch die Herunterregulation des High-Affinity IL-12R bewirkt wird. Ähnliche Ergebnisse fanden auch Wu et al. (1997) in anti-CD3 stimulierten MNZ, in denen durch IL-4 gleichfalls die Expression des High-affinity IL-12R vermindert werden kann. Dieses zeigt, dass neben der Regulation der Synthese der Interleukine, die Veränderung der Rezeptor Expression eine wichtige biologische Rolle spielt und eine induktive Wirkung auch über die Hemmung anderer Faktoren zustande kommen kann. Alternativ ist aber auch denkbar, dass der IL-4 Effekt durch die Erhöhung der endogenen IL-10 Produktion vermittelt wird. Dagegen hat Frau Röhne in ihrer Dissertation (2000) demonstrieren können, dass der IL-4 Effekt auf die IFN- α und FasL Mengen nicht durch die Induktion von IL-10 zustande kommt. In anti-CD3, IL-2 und IL-4 stimulierten Zellen haben zusätzliche anti-IL10R-Antikörper nicht den reduzierenden Effekt des IL-4 zu vermindern vermocht.

4.4 Die Rolle des IL-10 in der IL-2 induzierten Zytokinproduktion

Exogenes IL-10 ist ein potenter Inhibitor der IL-2 vermittelten IL-12 Sekretion und somit ebenfalls der IFN- γ Ausschüttung, allerdings mit kaum nachweisbarem Einfluss auf die CD40L Expression. Dieser Effekt beruht hauptsächlich auf einer Reduzierung der IL-12 Menge, da exogenes IL-12 die IL-10 Wirkung hinreichend überwinden kann. IL-12 führt somit über die gleichermaßen erfolgte Induktion des IL-10 zu einer negativen Rückkopplung, wodurch eine überschüssige TH1 Aktivierung verhindert wird. Anders als beim IL-4 besteht der Einfluss des IL-10 besonders in der

Regulation der IL-12 Mengen im Extrazellulärraum und weniger in der Minderung der Wirkung des schon vorhandenen IL-12. Gleichzeitig kann aber IL-10 auch durch exogenes IL-4 induziert werden, in Kombination mit IL-12 zeigt sich darüber hinaus ein additiver und somit unabhängiger Charakter dieser beiden Induktionswege. IL-10 nimmt aber auch für die IL-4 abhängigen Zytokine IL-5 und IL-13 eine zusätzliche Kontrollinstanz ein. Dabei kann die negative IL-10 Wirkung, unter Zusatz von IL-12, weiter verstärkt werden, so dass das IL-12 seinen Einfluss auf das IL-5 und das IL-13 nicht nur über die gesteigerte IL-10 Ausschüttung entfaltet. Endogenes und exogenes IL-10 haben dieselbe Wirkung auf die untersuchten Zytokine, da nach Blockade des IL-10 Rezeptors durch entsprechende Antikörper alle Zytokine vermehrt in den Überständen gefunden werden.

In Kulturen von speziellen CD4(+) T-Zellklonen, der drei verschiedenen Untergruppen TH1, TH2 und TH0, vermittelt IL-10 seine Untergruppen unabhängige hemmende Wirkung besonders durch die Inhibition der zelleigenen IL-2 Produktion. Daneben stehen dem IL-10 weitere Möglichkeiten zur Verfügung, sowohl TH1 als auch TH2 Zellen zu beeinflussen, in deren Mittelpunkt die APZ stehen. Nach Vorinkubation von APZ mit IL-10, die im Anschluss mit den T-Zellklonen inkubiert wurden, findet sich eine reduzierte Zytokinsynthese aller Zellpopulationen (De Waal Malefyt et al., 1993). Die besondere Rolle des IL-10 wird weiter dadurch hervorgehoben, dass sowohl TH1 als auch TH2 T-Zellklone zur IL-10 Produktion befähigt sind, ihm also in beiden Systemen eine eigenständige Rolle zufällt (Del Prete et al., 1993). IL-10 supprimiert die Produktion von TH-1 Zytokinen auch in anderen Systemen deutlich (Körholz et al., 1997, Shin et al., 1999). Versuche mit Mäusen, die kein IL-10 bilden können, zeigen auch in vivo eine deutliche Beeinflussbarkeit der TH2 assoziierten allergenen Entzündungsreaktionen. IL-10 verhindert eine ungebremste Immunreaktion auf allergene Reize bei IL-10 kompetenten Mäusen. Als Quelle für das durch IL-2 induzierbare IL-10, das gleichermaßen in-vitro und in-vivo nachgewiesen werden kann (Bönig et al., 2000; Körholz et al., 1997), kommen die verschiedensten Zellen des Immunsystems in Frage.

Neben den aufgezeigten inhibierenden Eigenschaften für die TH1 (IL-12/IFN- γ) und TH2 (IL-5/IL-13) Zytokine, fallen dem IL-10 aber auch wichtige aktivierende Aufgaben

zu. In-vitro ist die Fähigkeit der NK-Zellen, fremde Zellen zu lysieren, durch exogenes IL-10 eindrucksvoll steigerbar (Carson et al., 1995, Schwarz et al., 1994). Im Hinblick auf den Tumorescapemechanismus verschiedener Tumorzellen, die Zytokine wie IL-10 und TGF- β sezernieren, sind die gewonnenen Daten der IL-10 und IL-12 Kombination darüber hinaus besonders wichtig. Zusätzliches IL-12 vermag den negativen IL-10 Effekt auf die IFN- γ Menge völlig auszugleichen. Somit könnte bei einer Kombinationstherapie aus IL-2 und IL-12 der inhibierende Effekt des IL-10 auch gänzlich überwunden werden, ohne auf die positive Wirkung des IL-10 auf die NK-Zellen verzichten zu müssen.

4.5 Biologische Bedeutung der Ergebnisse für die Behandlung mit IL-2

Der wichtigste Effekt, der mit einer Hoch-Dosis-IL-2 Therapie erzielt werden soll, ist die Befähigung des Immunsystems, bösartige Zellen zu eliminieren. Dieser Vorgang beruht in erster Linie auf einer zellulären Reaktion durch Zellen des Immunsystems, die auffällige Zellen phagozytieren, deren Membran mittels Perforin durchlöchern oder ein Signal zur Apoptoseinitiierung vermitteln (Oppenheim et al., 2001). Bei den Zellen, denen diese Eigenschaften zugesprochen werden, stehen die zytotoxischen CD8(+) Zellen und NK-Zellen im Mittelpunkt des Interesses. Deren Aktivierungszustand wird maßgeblich durch das gebildete IFN- γ bestimmt. Somit ist eine gesteigerte IFN- γ Menge auch mit einer verbesserten Wirkung assoziiert, wobei gerade die akute GvHD mit all ihren Komplikationen und einer Überexpression von IFN- γ auch Grenzen für die Aktivierung aufzeigt (Blazer et al., 1997, Klingebiel et al., 1998).

Von dieser Seite her würde sich IL-12 als Kombinationspartner für das IL-2 anbieten. Die nachgewiesene IL-10 Induktion unter IL-2 Therapie in-vivo als auch in-vitro und dessen Bedeutung bei einigen Tumorescapemechanismen hemmt die erwünschte TH-1 Aktivierung bei der IL-2 Monotherapie. Zusätzliches IL-12 könnte diese negative Rückkopplungsschleife erfolgreich durchbrechen, ohne dass man auf die positiven Eigenschaften des IL-10 verzichten müsste. Es würde sogar im Gegenteil, durch dessen IL-10 Induktion, die abhängige NK-Aktivierung weiter unterstützen. Das Verständnis der Bedeutung und Beeinflussbarkeit anderer Zellen für den

erwünschten Anti-Tumor Effekt ist zur Zeit noch sehr gering. Im Moment gibt es nur erste Hinweise, dass auch Granulozyten eine Rolle spielen könnten, die durch weitere Versuche abgeklärt werden müssen (Girard et al., 1995).

Neben den direkt aktivierenden Wirkungen des IL-2 auf das Immunsystem wird der therapeutische Effekt auch maßgeblich durch die dosislimitierenden Nebenwirkungen beeinflusst. Diese Nebenwirkungen sind breit gefächert und können vom akuten Nierenversagen, der Veränderung von Gerinnungsparametern bis zum Kapillarlecksyndrom reichen. Auch hier könnte die Kombination mit IL-12 wesentliche Vorteile bringen, wegen der suppressiven Wirkung des IL-12 auf die IL-5 und IL-13 Mengen. Der Nachweis von gesteigerten IL-5 Spiegeln bei Patienten unter IL-2 Therapie, zusammen mit einer Bluteosinophilie, wird für einen Teil der beschriebenen Nebenwirkungen verantwortlich gemacht (Schaafsma et al., 1991; van Haelst et al., 1991). Zu diesen gehören besonders die Hypotonie, das Kapillarlecksyndrom und andere allergieähnliche Symptome. Diese Annahme wird besonders gestützt durch die Tatsache, dass bei allergischen Erkrankungen, die teilweise ein ähnliches klinisches Erscheinungsbild haben, wie die IL-2 Nebenwirkungen, ebenfalls ein Anstieg der IL-5 Konzentration und der Bluteosinophilen beobachtet werden kann. In Analogie zu den allergischen Erkrankungen ergibt sich daraus, dass IL-13 eine nicht weniger wichtige Rolle für die Nebenwirkungen der IL-2 Therapie spielt, auch wenn es bisher noch nicht direkt im Serum dieser Patienten nachgewiesen wurde. In der Pathogenese allergischer Erkrankungen ergänzen sich beide Zytokine.

IL-5 als wichtigster Regulator der eosinophilen Granulozyten aktiviert diese nicht nur, sondern verleiht ihnen auch Schutz vor Apoptose. Die Eosinophilen nehmen somit eine wichtige Rolle in der Entstehung und der Chronifizierung dieser entzündlichen Prozesse ein. IL-13, dessen Inbalance mit IL-12 beträchtlichen Einfluss auf die Entstehung allergischer Erkrankungen hat, reguliert vornehmlich die B-Zell abhängige Antikörperbildung, aber auch viele andere Bereiche der TH2 Antwort (McKenzie et al., 1993; Till et al., 1997b; Wills-Karp et al., 1998). So können Therapieansätze mit IL-12 bei allergischen Erkrankungen als Vorbild dienen, zukünftig IL-12 als Kombinationspartner in der Zytokintherapie einzusetzen. Eine Verringerung der dosislimitierenden Nebenwirkungen könnte in der Zytokintherapie

dazu führen, dass eine Dosisescalation möglich wird und somit eine größere therapeutische Breite erzielt werden kann.

Zusammengefasst kann durch die Kombination aus IL-2 und IL-12 nicht nur die Wirksamkeit, sondern auch die therapeutische Breite dieser Immuntherapie gesteigert werden, da Zytokine durch IL-12 gehemmt werden, die einen Teil der Nebenwirkungen der IL-2 Gaben vermitteln.

5 Abkürzungen :

APZ	Antigen präsentierenden Zellen
BSA	bovines Serum-Albumin
CD	Cluster of differentiation
DZ	Dendritische Zellen
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FasL	Fas-Ligand
GvHD	Graft versus host disease
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL-	Interleukin-
IL-2R	Interleukin-2 Rezeptor
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
TCR	T-cell receptor
TGF- β	Transforming-growth-factor- β
TH	T-Helferzelle
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α

6 Literatur

1. Barata LT, Ying S, Meng Q, Barkans J, Rajakulasingam K, Durham SR, Kay AB; IL-4 and IL-5-positive T lymphocytes, eosinophils, and mast cells in allergen-induced late phase cutaneous reactions in atopic subjects. (1998) *J Allergy Clin Immunol* 101: 222-30
2. Blazar BR, Taylor PA, Panoskaltisis-Mortari A, Buhlman J, Xu J, Flavell RA, Korngold R, Noelle R, Vallera DA Blockade of CD40 Ligand-CD40 interaction impairs CD4⁺ T-cell mediated alloreactivity by inhibiting mature donor T cell expansion and function after bone marrow transplantation (1997) *J Immunol* 158: 29-39
3. Bleese K, Jakubzick C, Westwick J, Lukacs N, Kunkel SL, Hogaboat Therapeutic effect of IL-13 immunoneutralization during chronic experimental fungal asthma. (2001) *J Immunol* 15: 5219-5224
4. Bönig H, Banning U, Hannen M, Kim YM, Verheyen J, Mauz-Körholz C, Körholz D Transforming growth factor- β 1 suppresses interleukin-15-mediated interferon- γ production in human T lymphocytes. (1999) *Scand J Immunol* 50: 612-618
5. Bönig H, Laws HJ, Wundes A, Verheyen J, Hannen M, Kim YM, Banning U, Nürnberger W, Körholz D In vivo cytokine responses to interleukin-2 immunotherapy after autologous stem cell transplantation in children with solid tumors. (2000) *Bone Marrow Transpl* 26.: 91-96
6. Bryan SA, O'Conner BJ, Matti S, Lecki MJ, Kanabar V, Khan J, Renzetti L, Rames A, Bock JA, Boyce MJ, Hansel TT, Holgate ST Effects of recombinant human interleukin-12 on eosinophils hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. (2000) *Lancet* 356: 2114-6

7. Carson WE, Lindelann MJ, Baiocchi R, Linett M, Tan JC, Chou CC, Narula S, Caliguri MA The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells. (1995): Blood 85: 3577-85
8. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T Help via APC activation (1996) J Exp Med 184: 747-752
9. Clamann H, Chaperon E, Triplett R. Thymus-marrow cell combinations synergismin antibody production. (1966) Proc Soc Exp Biol Med 122: 1167
10. De Waal Malefyt R, Yssel H, De Vries JE Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. (1993) J Immunol 150: 4754 - 65.
11. Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi FMG, Biagiotti R, Romagnani S Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. (1993) J Immunol 150: 353 -60.
12. Emson CL; Bell SE; Jones A; Wisden W; McKenzie AN Interleukin (IL)-4-independent induction of immunoglobulin (Ig)E, and perturbation of T cell development in transgenic mice expressing IL-13. (1998) J Exp Med. 188: 399-404
13. Evans RL, Breard JM, Lazarus H, Schlossman SF, Chess L. Detection, isolation and functional characterization of two human T-cell subclasses bearing unique differentiation antigens. (1977) J Exp Med 145: 221
14. Ford D; Sheehan C; Girasole C; Priester R; Kouttab N; Tigges J; King TC; Luciani A; Morgan JW; Maizel AL The human B cell response to IL-13 is dependent on cellular phenotype as well as mode of activation. (1999) J Immunol. 163: 3185-93

15. Girard D, Gosselin J, Heitz D, Paquin R, Beaulieu AD Effects of Interleukin-2 on gene expression in human neutrophils. (1995) *Blood* 86: 1170-6
16. Glick B, Chang TS, Jaap RG. The bursa of Fabricius and antibody production. (1956) *Poultry Science* 35: 224, 1956
17. Gollob JA, Kawasaki H, Ritz J Interferon-gamma and interleukin 4 regulate T-cell interleukin12 responsiveness through different modulation of high-affinity interleukin 12 receptor expression. (1997) *Eur J Immunol* 27: 647 – 52
18. Grewal IS, Xu J, Flavell RA Impairment of antigen-specific T cell priming in mice lacking the CD40 ligand. (1995) *Nature* 378: 617 - 20
19. Grewal IS and Flavell RA The role of CD40 Ligand in costimulation and T cell activation. (1996) *Immunol Rev* 153: 85 -106
20. Halverson DC, Schwartz GN, Carter C, Gress RE, Fowler DH In vitro generation of allospecific human CD8+ T cells of Tc1 and Tc2 Phenotype (1997) *Blood* 90: 2089-96
21. Heinly CS, Sempowaski GD, Lee DM, Patel DD, McDermott PM, Scearce RM, Thompson CB, Haynes BF Comparison of thymocyte development and cytokine production in CD7-deficient, CD28-deficient and CD7/CD28 double-deficient mice. (2001) *Int Immunol* 13: 157-66
22. Huettner C, Czub S, Kerkau S, Roggendorf W, Tonn JC Interleukin 10 is expressed in human gliomas in vivo and increases glioma cell proliferation and motility in vitro (1997) *Anticancer Res* 17: 3217-24
23. Jacobson EL, Pilaro F, Smith KA Rational interleukin 2 therapy for HIV positive individuals: daily low doses enhance immune function without toxicity (1996) *Proc Natl Acad Sci* 93: 10405-10

24. Jung T, Wijdenes J, Neumann C, de Vries JE, Yssel H Interleukin-13 is produced by activated human CD45RA+ and CD45RO+ T cells: modulation by interleukin-4 and interleukin-12. (1996) *Eur J Immunol* 26: 571 – 7
25. Kadowaki N, Antonenko S, Ho S, Risoan MC, Soumelis V, Porcelli SA, Lanier LL, Liu YJ Distinct cytokine profiles of neonatal natural killer T-cells after expansion with subsets of dendritic cells. (2001) *J Exp Med* 193: 1221-6
26. Kendall A, Smith Interleukin 2. (1984) *Ann. Rev Immunol* 2 319-33
27. Kennedy MK, Picha KS, Fanslow WC, Grabstein KH, Alderson MR, Clifford KN, Chin WA, Mohler KM CD40/CD40 ligand interactions are required for T cell dependent production of IL-12 by mouse macrophages. (1996) *Eur J Immunol* 26: 370 - 8.
28. Kitani A, Fuss IJ, Nakamura K, Schwartz OM, Usui T, Strober W Treatment of experimental (Trinitrobenzene sulfonic acid) intranasal administration of transforming growth factor (TGF)-beta1 plasmid: TGF-beta1 mediated suppression of cell type 1 response occurs by interleukin (IL)-10 induction IL-12 receptor beta2 chain downregulation. (2000) *J Exp Med* 192: 41-52
29. Klingebiel T, Schlegel PG GVHD: overview on pathophysiology, incidence, clinical and biological features (1998) *Bon Marrow Trans* 21: 45-49
30. Köhler G, Milstein C. Continuous culture of fused cell secreting antibody of predefined specificity. (1975) *Nature* 256: 495
31. Kopf M, Brombacher F, Hodgkin PD, Ramsay AJ, Milbourne EA, Dai WJ, Ovington KS, Behm CA, Kohler G, Young IG, Matthaei KI IL-5-deficient mice have a developmental defect in cd5+ B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. (1996) *Immunity* 4: 15 – 24.

32. Körholz D, Banning U, Bönig H, Grewe M, Schneider M, Mauz-Körholz C, Klein-Vehne A, Krutmann J, Burdach S The role of interleukin 10 (IL-10) in IL-15 mediated T-cell responses. (1997) *Blood* 90: 4513 – 20.
33. Lee YL, Fu CL, Ye YL, Chiang BL Administration of interleukin-12 prevents mite der p 1 allergen-IgE antibody production and airway eosinophilia in an animal model of airway inflammation. (1999) *Scand J Immunol* 49: 229 – 36
34. Leonard JP, Sherman ML, Fisher GL, Buchanan LJ, Larsen G, Atkins MB, Sosman JA, Dutcher JP, Vogelzang NJ, Ryan JL Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. (1997) *Blood* 90: 2541 – 8
35. Liu YU, Kadowaki N, Rissoan MC, Soumelis V T cell activation and polarization by DC1 and DC2. (2000) *Curr Top Microbiol Immunol* 251: 149-59
36. Ludviksson BR, Seegers D, Resnick AS, Strober W The effect of TGF-beta1 on immune responses of naive vers memory CD4+ Th1/Th2 T-cells. (2000) *Eur J Immunol* 30: 2101-2111
37. Matthaei KI, Foster P, Young IG The role of IL-5 in vivo: Studies with IL-5 deficient mice. (1997) *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92S2: 63 – 68.
38. McHugh S, Deighton J, Rifkin I, Ewan P Kinetics and functional implications of Th1 and Th2 cytokine production following activation of peripheral blood mononuclear cells in primary culutre (1996) *Eur J Immunol* 26: 1260-5
39. McKenzie AN, Culpepper JA, de Waal Malefyt R, Briere F, Punnonen J, Aversa G, Sato A, Dang W, Cocks BG, Menon S Interleukin 13, a T-cell derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3735-9

40. McKenzie GJ; Bancroft A; Grecis RK; McKenzie AN A distinct role for interleukin-13 in Th2-cell-mediated immune responses. (1998a) *Curr Biol.* 8: 339-42
41. McKenzie GJ; Emson CL; Bell SE; Anderson S; Fallon P; Zurawski G; Murray R; Grecis R; McKenzie AN Impaired development of Th2 cells in IL-13-deficient mice. (1998b) *Immunity.* 9: 423-32
42. Minami Y, Kono T, Miyazaki T, Taniguchi T The IL-2 receptor complex : its structure, function and targets genes (1993) *Annu Rev Immunol* 11: 245-68
43. Minty A, Asselin S, Bensussan A, Shire D, Vita N, Vyakarnam A, Wijdenes J, Ferrara P, Caput D The related cytokines interleukin-13 and interleukin-4 are distinguished by differential production and differential effects on T lymphocytes. (1997) *Eur Cytokine Netw* 8: 203 – 13
44. Morgan D A, Ruscetti F W, Gallo R C Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. (1976) *Science* 193 1007-8
45. Morisaki T, Katano M, Ikubo A, Anan K, Nakamura M, Nakamura K, Sato H, Tanaka M, Torisu M Immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF-beta) genes expression in human gastric carcinoma tissues (1996) *J Surg Oncol* 63: 234-9
46. Morita M, Lamkhioued B, Soussi Gounni A, Aldebert D, Delaporte E, Capron A, Capron M Induction by interferons of human eosinophils apoptosis and regulation by interleukin-3, granulocyte/macrophage-colony stimulating factor and interleukin-5. (1996) *Eur Cytokine Netw* 7: 725-32
47. Mosman T.R., Cherwinski H.M., Bond M.W., Giedlin M.A., Coffman R.L. : Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. (1986) *J Immunol* 136: 2348-2357

48. Mosman T.R., Coffman R.L.: Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. (1989) *Ann Rev Immunol* 7: 145-173
49. Mosmann TR, Sad S The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. (1996) *Immunol Today* 17: 138 -146.
50. Naseer T, Minshall EM, Leung DY, Laberge S, Ernst P, Martin RJ, Hamis Q Expression of IL-12 and IL-13 mRNA in asthma and their modulation in response to steroid therapy (1997) *Am J Respir Crit Care Med* 155: 845-51
51. Okano Y, Nakamura Y, Sano T, Azuma M, Sone S Interleukin-12 inhibits production of interleukin-5 but not of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor by antigen-stimulated blood mononuclear cells in allergic bronchial asthmatics. (1998) *Int Arch Allergy Immunol* 115: 83 – 90
52. Oleksowicz L., Strack M., Dutcher JP., Sussman I., Caliendo G., Sparano J., Wiernik PH. : A distinct coagulopathy associated with interleukin-2 therapy. (1994) *Br J Haematol* 88 892-4
53. Oppenheim JJ, Feldmann M Volume 1: Ligands, Volume 2: Receptors (2001) *Cytokine Reference, Academic Press*
54. Palmer EM, van Seventer GA, Human T-helper cell differentiation is regulated by the combinate action of cytokines and accessory cell dependent costimulatory signals. (1997) *J Immunol* 158:2654-62
55. Paul CC, Keller JR, Armpriester JM, Baumann MA Epstein-Barr virus transformed B lymphocytes produce interleukin-5. (1990) *Blood* 75: 1400-3
56. Pauling L, A theory of the structure and process of foramation of antibodies. (1940) *J Am Chem Soc* 62: 2643

57. Peng X, Kasran A, Warmerdam PA, de Boer M, Ceuppens JL. Accessory signaling by CD40 for T cell activation: induction of Th1 and Th2 cytokines and synergy with interleukin-12 for interferon- γ production (1996) *Eur J Immunol* 26: 1621-1627
58. Perritt D, Robertson S, Gri G, Showe L, Aste-Ameyaga M, Trinchieri G. Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. (1998) *J Immunol* 161: 5821 – 4
59. Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, de Waal Malefyt R, de Vries JE. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3730-4
60. Rosenberg SA; Lotze MT; Muul LM; Leitman S; Chang AE; Ettinghausen SE; Matory YL; Skibber JM; Shiloni E; Vetto JT. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. (1985) *N Engl J Med.* 1985 Dec 5; 313(23): 1485-92
61. Rosenberg SA; Lotze MT; Muul LM; Chang AE; Avis FP; Leitman S; Linehan WM; Robertson CN; Lee RE; Rubin JT. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. (1987) *N Engl J Med.* 316: 889-97
62. Rosenberg SA., Yang JC, Topalian SL, Scharzhuber DJ, Weber JS, Parkinson DR., Seipp CA., Einhorn JH, White DE. Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2. (1994) *JAMA* 271: 945-6
63. Sanderson CJ, Warren DJ, Strath M. Identification of a lymphokine that stimulates eosinophil differentiation in vitro. Its relationship to interleukin 3,

- and functional properties of eosinophils produced in cultures. (1985) J Exp Med 162: 60-74
64. Sanderson CJ, O'Garra A, Warren DJ, Klaus GG Eosinophil differentiation factor also has B-cell growth factor activity: proposed name interleukin 4. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83: 437-40
 65. Schaafsma MR, Falkenburg JH, Landegent JE, Duinkerken N, Osanto S, Ralph P, Kaushansky K, Wagemaker G, Van Damme J, Willemze R, Fibbe WE In vivo production of interleukin-5, granulocyte-macrophage colony stimulating factor, and interleukin-6 during intravenous administration of high-dose interleukin-2 in cancer patients. (1991) Blood 78: 1981 – 7
 66. Schwarz MA, Hamilton LD, Tardelli L, Narula SK, Sullivan LM Stimulation of cytolytic activity by interleukin-10. (1994): J Immunother 16, 95-104
 67. Schwarze J, Hamelmann E, Cieslewicz G, Tomkinson A, Joetham A, Bradley K, Gelfand EW Local treatment with IL-12 is an effective inhibitor of airway hyperresponsiveness and lung eosinophilia after airway challenge in sensitized mice. (1998) J Allergy Clin Immunol 102: 86-93
 68. Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP, Kundig TM, Kishihara K, Wakeham A, Kawai K, Ohashi PS, Thompson CB, Mak TW Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. (1993) Science 261: 609-12
 69. Shalmi CL., Dutcher JP., Feinfeld DA., Chun KJ., Saleemi KR., Freeman LM., Lynn RI., Wiernik PH. : acute renal dysfunction during interleukin-2 treatment: suggestion of an intrinsic renal lesion. (1990) J Clin Oncol 8 1839-46 1990
 70. Shin DI, Banning U, Kim YM, Verheyen J, Hannen M, Bönig H, Körholz D Interleukin 10 inhibits TNF-alpha production in human monocytes independently of interleukin 12 and interleukin 1 beta (1999) Immunol Invest 28: 165-75

71. Suchin KR, Cassin M, Gottlieb SL, Sood S, Cucchiara AJ, Vonderheid EC, Rook AH Increased interleukin-5 production in eosinophilic Sezary syndrom regulation by interferon alfa and interlaukin 12. (2001) J Am Acad Dermatol 44: 28-32
72. Tao X, Constant S, Jorritsma P, Bottomly K Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4+ T cel differentiation (1997) J Immunol 159: 5956-63
73. Till S, Li B, Durham S, Humbert M, Assoufi B, Huston D, Dickson R, Jeannin P, Kay AB, Corrigan C Secretion of the eosinophil-active cytokines interleukin-5, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 by bronchoalveolar lavage CD4+ and CD8+ T cell lines in atopic asthmatics and atopic and non-atopic controls. (1995) Eur J Immunol 25: 2727-31
74. Till S, Dickason R, Huston D, Robinson D, Larche M, Durham S, Kay AB, Corrigan C IL-5 secretion by allergen-stimulated CD4+ T cells in primary culture: relationship to expression of allergic disease. (1997a) J Allergy Clin Immunol 99: 563-9
75. Till S, Durham S, Dickason R, Huston D, Bungre J, Walker S, Robinson D, Kay AB, Corrigan C IL-13 production by allergen-stimulated T-cells is increased in allergic disease and associated with IL-5 but not IFN- γ expression. (1997b) Immunology. 91: 53 – 7
76. Van Gool SW, Vermeiren J, Rafiq K, Lorr K, de Boer M, Ceuppens JL Blocking CD40-CD154 and CD80/CD86-CD28 interactions during primary allogeneic stimulation results in T cell anergy and high IL-10 production (1999) Eur J Immunol 29: 2367-75
77. van Haelst Pisani C, Kovach JS, Kita H, Leiferman KM, Geich GJ, Silver JE, Dennin R, Abrams JS Administration of interleukin-2 (IL-2) results in increased plasma concentrations of IL-5 and eosinophilia in patients with cancer. (1991) Blood 78: 1538 – 4

78. Varga VA, Wachholz P, Nouri-Aria KT, Verhoef A, Corrigan CJ, Till SJ, Durham SR T-cells from human allergen-induced late asthmatic responses express IL-12 receptor beta 2 subunit mRNA and respond to IL-12 in vitro. (2000) *J Immunol* 165: 2877-85
79. Verheyen J, Bönig H, Banning U, Shin DI, Körholz D Co-operation of IL-1 and IL-2 on T-cell activation in mononuclear cell cultures. *Immunol Invest im Druck*
80. Walker C, Checkel J, Cammisuli S, Leibson PJ, Gleich GJ IL-5 production by NK cells contributes to eosinophil infiltration in a mouse model of allergic inflammation. (1998) *J Immunol* 161: 1962-9
81. Wang J, Palmer K, Lotvall J, Milan S, Lei XF, Matthaei KI, Gauldie J, Inman MP, Jordana M, Xing J Circulating, but not local lung interleukin 5 is required for the development of antigen-induced airway eosinophilia. (1998) *J Clin Invest* 102: 1132 - 41.
82. Weltman JK, Karim AS Interleukin 5: a proeosinophilic cytokine mediator of inflammation in asthma and a target for anti-sense therapy. (1998) *Allergy Asthma Proc* 19: 257 – 61.
83. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, Donaldson DD Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. (1998) *Science* 282: 2258 – 61
84. Wills-Karp M IL-12/IL-13 axis in allergic asthma (2001) *J Allergy Clin Immunol* 107 : 9-17
85. Wu C, Warriar RR, Wang X, Presky DK, Gately K Regulation of interleukin 12 receptor beta-1 chain expression and interleukin 12 binding to human peripheral blood mononuclear cells. (1997) *Eur J Immunol* 27: 147 – 54

7. Lebenslauf

Name : Jens Verheyen

Geburtsdatum: 21.7.73

Geburtsort: Köln

Staatsangehörigkeit:: deutsch

Familienstand: ledig

Konfession römisch-katholisch

Schullaufbahn: Norbert Gymnasium Knechtsteden, Dormagen
Hochschulreife 31.05.93

Zivildienst Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
7/93 – 9/94

Studium: Albertus Magnus Universität zu Köln,
Studium der Humanmedizin 10/94 – 5/01
Ärztliche Prüfung 18.05.01

Berufstätigkeit: Arzt im Praktikum seit 6/01
im Zentrum für Kinderheilkunde
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Sinnersdorf, 06.11.01

Jens Verheyen

8. Zusammenfassung

Regulation der Interleukin 2 induzierten Interleukin 5 und Interleukin 13 Produktion durch mononukleäre Zellen gesunder Blutspender.

Jens Verheyen

In der pädiatrischen Onkologie wird die adjuvante Interleukin-2 Therapie eingesetzt, um über die Steigerung immunologisch vermittelter anti- Tumor Effekte maligne Zellen zu eliminieren. Die Behandlungsergebnisse mit IL-2 sind bislang enttäuschend. Gleichzeitig ist hoch-dosierte IL-2 Therapie aber mit z.T. lebensbedrohlichen Nebenwirkungen assoziiert. In meiner Dissertation habe ich am Modell mononukleärer Zellen die Regulation der IL-2 induzierten T-Zellaktivierung untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass IL-2 über die Induktion von IL-12 in APC die Bildung von IFN- γ , einem Zytokin mit potentiell antineoplastischer Wirkung vermittelt. Über diesen Mechanismus wirkt IL-2 auch auf die Bildung von IL-10. Sowohl IL-4 wie auch IL-10 hemmen die IL-2 induzierte IFN- γ Produktion über die Suppression der IL-12 Produktion. Diese suppressiven Effekte können durch die Zugabe von IL-12 zu den Kulturen ausgeglichen werden. Im Gegensatz zu IFN- γ wird die IL-2 induzierte Bildung von IL-5 und IL-13, d.h. von Zytokinen, die für die IL-2 vermittelten Nebenwirkungen mitverantwortlich sein können, durch IL-12 gehemmt. Auch IL-10, obwohl es die IL-12 Produktion unterdrückt, supprimiert die IL-2 induzierte IL-5 und IL-13 Bildung, während IL-4 die Synthese von IL-5 und IL-13 unterstützt. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass durch die Kombination aus IL-2 und IL-12 die Wirkung des IL-2 auf potentiell antineoplastisch wirksame Zytokine wie z.B. IFN- γ gesteigert werden kann, da die negative Feedbackwirkung durch IL-10 unterdrückt wird. Andererseits führt die Kombination IL-2 und IL-12 auch zur Unterdrückung der Bildung von IL-5 und IL-13, die potentiell für einen Teil der durch IL-2 vermittelten Nebenwirkungen verantwortlich sein können. Somit wird durch die Kombination aus IL-2 und IL-12 die Wirkung der Immuntherapie gesteigert und die therapeutische Breite des IL-2 vergrößert.

Univ.-Prof. Dr. med. D. Körholz