

Aus der
**Klinischen Abteilung des
Deutschen Diabetes-Forschungsinstitutes
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Werner A. Scherbaum

**Die MMLC als immunologisches Testsystem
der kombinierten Aktivierung von natürlicher und adaptiver Immunität
zur Analyse immunmodulatorischer Eigenschaften
therapeutisch genutzter Substanzen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Bettina Rose

2004

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

Gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referent: Prof. Dr. Martin
Korreferent: Prof. Dr. Pfeffer

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
1.1 Die Komponenten des Immunsystems	1
1.1.1 Die adaptive Immunantwort: T _H 1- und T _H 2-Differenzierung	2
1.1.2 Der Einfluss der natürlichen Immunität auf T _H 1- und T _H 2-Differenzierung	4
1.1.3 T _H 1-Zytokine	4
1.1.4 T _H 2-Zytokine	6
1.2 T _H 1- und T _H 2-Immunität bei Krankheiten	7
1.2.1 Infektionserkrankungen	7
1.2.2 Autoimmunerkrankungen	7
1.2.3 Arteriosklerose	8
1.2.4 Typ-2-Diabetes mellitus	8
1.3 Möglichkeiten der Immunmodulation	9
1.3.1 Generelle Immunsuppression	9
1.3.2 Selektive Immunmodulation	11
1.4 Immunologische Testsysteme	14
1.5 Ziel der Arbeit	14
2. <u>Material und Methoden</u>	16
2.1 Material	16
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	16
2.1.2 Geräte	16
2.1.3 Reagenzien	17
2.1.4 Enzyme	17
2.1.5 Zellkultur	18
2.1.5.1 Medien	18
2.1.5.2 Proteine, Antikörper und Stimulanzen	18
2.1.6 Proliferations-Assay	18
2.1.7 ELISA	18
2.1.8 RNA-Isolierung	19
2.1.9 Nukleotide	19
2.1.10 Quantitative TaqMan PCR	19
2.1.11 Sterilisation der Chemikalien und Geräte	20
2.1.12 Stammlösungen und Puffer	20
2.2 Methoden	21
2.2.1 Zellkultur	21

2.2.1.1	Isolierung von PBMC aus Vollblut	21
2.2.1.2	Stimulation von PBMC	22
2.2.1.3	Proliferations-Assay mit radioaktiv markiertem ^3H -Thymidin	22
2.2.2	ELISA	23
2.2.3	Nachweis von Zytokin-mRNA	27
2.2.3.1	RNA-Isolation aus der Zellkultur	27
2.2.3.2	Reverse Transkription	30
2.2.3.3	Quantitative RealTime PCR (TaqMan PCR)	31
2.2.4	Statistische Auswertung	35
3.	<u>Ergebnisse</u>	36
3.1	Wirkung von LPS auf die IFN- γ -Produktion in der MMLC	36
3.2	Die LPS-induzierte IFN- γ -Produktion in der MMLC wird durch IL-12 und IL-18 vermittelt	42
3.3	Beeinflussung der LPS-induzierten IFN- γ -Freisetzung durch T _H 2-Zytokine und Hydrokortison	46
3.4	Analysen weiterer Zytokine in der MMLC	48
3.4.1	Zeitverläufe von IL-6, IL-10 und TNF- α auf Protein- und mRNA-Ebene	48
3.4.2	Modulation von IL-6, IL-10 und TNF- α durch das T _H 2-Zytokin IL-4 und Hydrokortison	51
4.	<u>Diskussion</u>	54
4.1	Einführung: Die MMLC als Surrogatassay für komplexe Immunreaktionen	54
4.2	Wirkung von LPS in der MMLC	54
4.3	Mediatoren der LPS-induzierten IFN- γ -Produktion	56
4.4	Modulationsmöglichkeiten der IFN- γ Sekretion in der MMLC	57
4.5	Untersuchung T _H 1- und T _H 2-assoziiertes Zytokine in der MMLC	58
4.6	Modulation von IL-6, IL-10 und TNF- α durch T _H 2-Zytokine und Hydrokortison	60
4.7	Abschließende Betrachtungen zum Testsystem der MMLC	61
5.	<u>Literaturverzeichnis</u>	65
6.	<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	88
7.	<u>Danksagungen</u>	90
	<u>Lebenslauf</u>	91
	<u>Zusammenfassung</u>	92

1. Einleitung

Die Immunologie ist eine relativ junge Wissenschaft. Zwar erkannte Edward Jenner 1796, dass man durch die Infizierung von Menschen mit dem Vacciniavirus (Kuhpocken) die oftmals letale Infektion mit Menschenpocken verhindern konnte. Die Beteiligung von Mikroorganismen als pathogenes Agens infektiöser Krankheiten wurde jedoch erst durch Robert Koch und andere Mikrobiologen Ende des 19. Jahrhunderts nachgewiesen. Zeitgleich wurden die ersten Komponenten des Immunsystems durch ihre Beteiligung bei der Infektionsabwehr identifiziert.

In den letzten 150 Jahren wurde die Hauptfunktion des Immunsystems, die Abwehr von Infektionen durch Beseitigung der Erreger, eingehend untersucht. In der klinischen Medizin werden diese Erkenntnisse dazu verwendet, die Immunabwehr durch den Einsatz von Antibiotika noch zu unterstützen. Außerdem wird die Eigenschaft des „immunologischen Gedächtnisses“, die Fähigkeit des Immunsystems, auf eine erneute Infektion mit einem ihm bekannten Erreger schneller und effektiver zu reagieren, im Rahmen der Infektionsprävention durch systematische Impfprogramme genutzt. Die Bekämpfung eindringender Mikroorganismen beruht auf der Fähigkeit des Immunsystems, körpereigene Oberflächenproteine von fremden zu unterscheiden. Während diese Eigenschaft bei der Infektionsabwehr erwünscht ist, führt sie in der Transplantationsmedizin zur Abstoßung des lebensrettenden Fremdorgans. Um das Transplantat dennoch zu erhalten, ist eine lebenslange immunsupprimierende Therapie notwendig. Dazu werden heute Medikamente eingesetzt, die das gesamte Immunsystem und damit zwangsläufig auch die Infektabwehr schwächen. Hier könnte die Möglichkeit einer selektiven Modulation der Immunität zu einer drastischen Reduktion von Nebenwirkungen beitragen. Dabei ist das zunehmende Verständnis der komplexen Regulation des Immunsystems Grundlage für die Entwicklung neuer Therapiestrategien.

1.1 Die Komponenten des Immunsystems

Die Elimination von Mikroorganismen, die in den Körper eindringen, basiert einerseits auf der schnellen, aber unspezifischen Immunantwort der so genannten natürlichen oder angeborenen Immunität. Auf der anderen Seite führt die adaptive Immunität zu einer Pathogenspezifischen Immunreaktion, deren Ausbildung jedoch einige Tage benötigt. Beide Formen der Immunreaktionen beinhalten sowohl lösliche als auch zelluläre Komponenten, die aus den weißen Blutzellen, den Leukozyten, stammen.

Bei der natürlichen Immunität lässt sich die zelluläre Abwehr in Form von Phagozyten wie Makrophagen, dendritischen Zellen, Granulozyten und NK-Zellen von löslichen Faktoren wie dem Komplementsystem und sezernierten Enzymen unterscheiden. Die adaptive Immunantwort umfasst als lösliche Faktoren die Antikörper, die zusammen mit ihren produzierenden

den Lymphozyten, den B-Zellen, auch als humorale Immunität bezeichnet werden. Die zelluläre adaptive Immunantwort basiert auf einem anderen Lymphozytensubtyp, den T-Zellen. Dabei ist zur effektiven Elimination eines Erregers ein komplexes Wechselspiel zwischen allen Komponenten des Immunsystems notwendig, das sowohl auf zellulären Kontakten als auch auf der Sekretion von speziellen Proteinen wie Zytokinen und Chemokinen beruht¹ (Abb. 1).

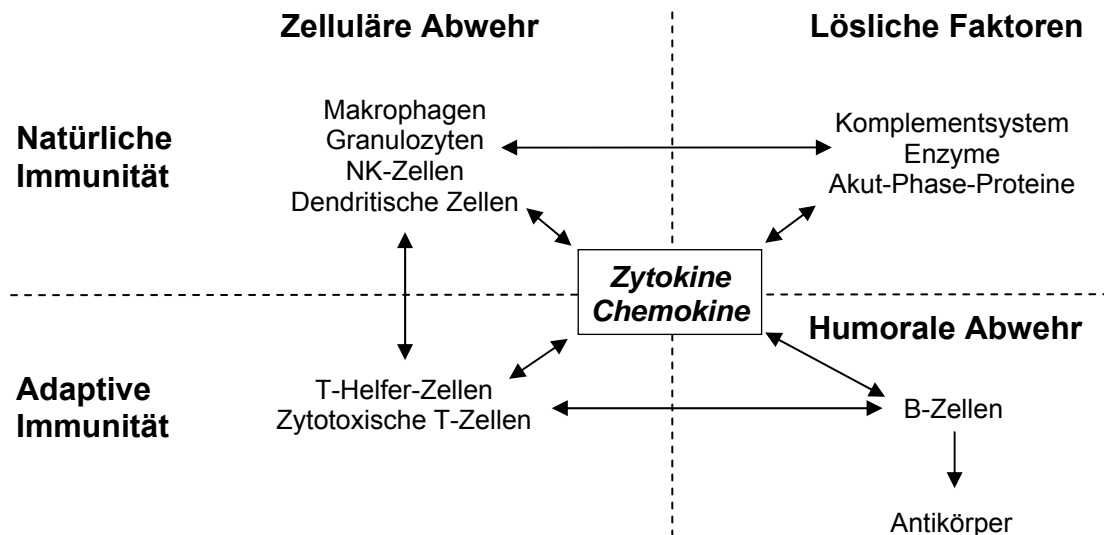


Abb. 1 Schematische Einteilung des Immunsystems und seiner Komponenten Modifiziert nach Kayser, F.H., Medizinische Mikrobiologie, Thieme-Verlag 1998²

1.1.1 Die adaptive Immunantwort: T_H1- und T_H2-Differenzierung

Bei der adaptiven zellulären Immunität, die im Wesentlichen durch T-Zellen vermittelt wird, lassen sich zwei Zelltypen abgrenzen, die unterschiedliche Funktionen haben und auch durch unterschiedliche Oberflächenmarker gekennzeichnet sind. Man unterscheidet die T-Helfer-Zellen (T_H-Zellen oder CD4⁺-Zellen), die in die Aktivierung von B-Zellen und Makrophagen involviert sind, von den zytotoxischen T-Zellen (T_c-Zellen oder CD8⁺-Zellen), die infizierte Körperzellen durch die Ausschüttung zytotoxischer Substanzen direkt eliminieren können. Innerhalb dieser beiden Gruppen lassen sich wiederum verschiedene Zelltypen anhand ihrer produzierten Zytokine differenzieren, die zu unterschiedlichen Immunantworten führen.

Im Jahr 1986 beschrieben Mosmann et al.³ zum ersten Mal unterschiedliche Muster der Zytokinsekretion in T_H-Zellen der adaptiven Immunantwort in der Maus. Er unterschied die T_H1-Antwort, die durch die Zytokine Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukin-2 (IL-2) gekennzeichnet war und zur Ausbildung einer zellulären Immunantwort führte, vom T_H2-Muster, das

durch die Zytokine Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-5 (IL-5), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10) und Interleukin-13 (IL-13) charakterisiert war und die Antikörper-vermittelte Immunantwort aktivierte^{3,4}. Dabei hemmen die Schlüssel-Zytokine der T_H1- oder T_H2-Immunantwort, IFN- γ und IL-4, antagonistisch die Ausbildung des reziproken Phänotyps^{4,5} (Abb.2).

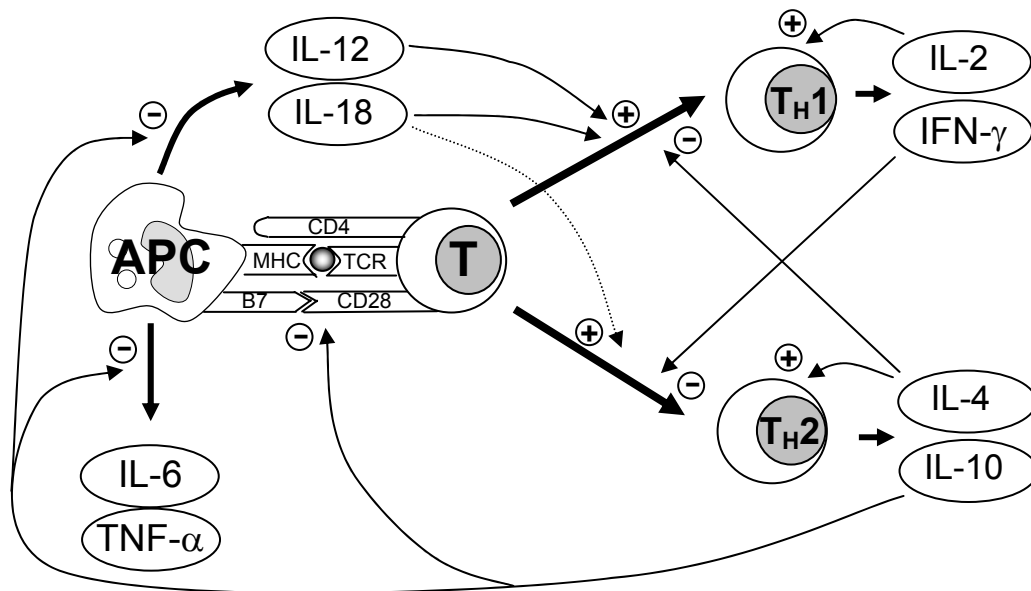


Abb. 2 Schema der T-Zell-Aktivierung und T_H1/T_H2-Differenzierung mit ihren Zytokinwechselwirkungen Durch die Antigenpräsentation der professionellen Antigen-präsentierenden Zelle (APC) an die T-Zelle werden beide Zelltypen durch die MHC-TCR-Interaktion aktiviert. Zusätzlich werden kostimulatorische Signale benötigt, die einerseits zellulärer Natur sind (B7-CD28 Interaktion), andererseits aus löslichen Faktoren (Zytokinen) bestehen. Je nach Zusammenspiel von hemmenden und stimulierenden Zytokinen kann sich die T-Zelle in Richtung der T_H1- oder T_H2-Antwort differenzieren.

Seit der Erstbeschreibung wurden noch weitere Zytokinmuster beschrieben. Das T_H0-Profil ist wahrscheinlich ein Vorläuferstadium der T_H1- und T_H2-Differenzierung und ist durch das Nebeneinander von T_H1- und T_H2-Zytokinen gekennzeichnet⁴. T-Zellen, die vornehmlich aus dem Immunsystem der gastrointestinalen Mukosa stammen, exprimieren neben typischen T_H2-Zytokinen auch TGF- β und werden als T_H3-Subtyp vom klassischen T_H1/T_H2-Profil abgegrenzt^{6,7}. Auch bei einem anderen T-Zell-Subtyp, den zytotoxischen T-Zellen (Tc-Zellen), die durch den Oberflächenmarker CD8 gekennzeichnet sind, kann eine Unterscheidung in Tc1- und Tc2-Profil mit den analogen Zytokinmustern wie bei den T_H-Zellen getroffen werden^{6,8}.

1.1.2 Der Einfluss der natürlichen Immunität auf T_H1- und T_H2-Differenzierung

Es ist bisher nicht völlig geklärt, welche Faktoren die Entwicklung zu einer T_H1- oder T_H2-dominierten Immunantwort steuern. Unstrittig ist, dass die Zellen der natürlichen oder angeborenen Immunität wie Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen einen entscheidenden Einfluss auf die spätere Differenzierung der adaptiven Immunantwort haben⁹. Diese Zellen phagozytieren eindringende Mikroorganismen, zerstören diese in Phagolysosomen und präsentieren Peptide zusammen mit dem MHC-Komplex auf ihrer Oberfläche an T-Lymphozyten, weshalb sie zusammenfassend als „Antigen-präsentierende-Zellen (APC)“ bezeichnet werden. Neben der Antigenpräsentation zusammen mit dem MHC-Komplex sind zur Aktivierung der T-Zellen noch weitere kostimulatorische Signale erforderlich, bei denen es sich einerseits um zelluläre Interaktionen mit Bildung von Rezeptor-Ligand-Bindungen wie bei CD28 und B7.2 handelt, andererseits um lösliche Faktoren wie Zytokine und Chemokine⁹. Zusammen übermitteln die kostimulatorischen Signale zusätzliche Informationen an die T-Zellen und beeinflussen so die Differenzierung der adaptiven Immunantwort (Abb. 2). Im Folgenden werden die Schlüssel-Zytokine der jeweiligen Immunreaktion, die auch in dieser Arbeit untersucht wurden, näher charakterisiert.

1.1.3 T_H1-Zytokine

Interleukin-12 (IL-12)

IL-12 ist ein 70-kDa Heterodimer aus zwei durch Disulfidbrücken verbundenen Peptiden, p35 und p40, das zuerst von Kobayashi et al. als „natural killer cell stimulatory factor“ (NKSF)¹⁰ beschrieben wurde. Während die mRNA für das kleinere p35-Peptid konstitutiv in vielen Zellen exprimiert wird^{11;12}, ist die Expression des p40-Peptids auf die Zellen beschränkt, die auch bioaktives p70 sezernieren. Dabei wird p40 im großen Überschuss produziert und neben p70 als Monomer und Homodimer freigesetzt^{12;13}. Möglicherweise unterbindet das p40-Homodimer durch Blockierung der Bindungsstellen des IL-12-Rezeptors die Aktivierung von T-Zellen durch p70 und trägt so zur Limitierung der Immunantwort bei^{14;15}. Dabei scheint das p40-Homodimer in CD4⁺ und CD8⁺-Zellen unterschiedliche Auswirkungen auf die T_H1-Differenzierung zu haben. Während das Homodimer bei CD4⁺ T-Zellen die T_H1-Entwicklung und IFN- γ Produktion hemmt, führt es bei CD8⁺-Zellen zur Verstärkung der IFN- γ Produktion¹⁶. Die IL-12 Produktion in dendritischen Zellen und Makrophagen wird durch das bakterielle Oberflächenglykopeptid LPS stark stimuliert¹⁷ und führt zu einer T_H1-Differenzierung von naiven T-Zellen^{12;18;19}, die mit einer Produktion von IFN- γ einhergeht^{20;21}. IL-12 steigert auch in Makrophagen die IFN- γ Produktion²², wobei es sich hier um eine positive autokrine Rückkopplung handeln könnte. Snijders et al. konnten zeigen, dass IFN- γ die IL-12

Produktion in LPS-aktivierten Monozyten steigern kann²³. Zusätzlich fördert IL-12 die Zytotoxizität, Proliferation und IFN- γ -Sekretion von NK-Zellen²⁴, die zur natürlichen Immunität gehören und vor allem virusinfizierte Körperzellen abtöten.

Interleukin-18 (IL-18)

IL-18 wurde erstmals von Okamura et al. 1995 als „IFN- γ inducing factor“ (IGIF) beschrieben²⁵. IL-18 wird als ein Vorläufer-Peptid (pro-IL-18) vor allem in LPS-aktivierten PBMC²⁶ und dendritischen Zellen²⁷, aber auch T-Zellen und neutrophilen Granulozyten synthetisiert und intrazellulär gespeichert²⁸. Pro-IL-18 hat keine biologische Wirkung und wird erst durch das „IL-1 converting enzyme“ (ICE) oder Caspase-1 in seine aktive Form überführt^{29;30}. Caspase-1 konnte sowohl im Zytoplasma wie auch auf der Oberfläche von LPS-aktivierten Makrophagen nachgewiesen werden³¹. IL-18 stimuliert synergistisch mit IL-12 die IFN- γ Produktion in T-Zellen, NK-Zellen und dendritischen Zellen^{28;32-34}. Dabei steigert IL-12 die Expression des IL-18 Rezeptors auf T- und NK-Zellen^{35;36}, während IL-18 reziprok die Expression der β 2-Untereinheit des hochaffinen IL-12 Rezeptors stimuliert³⁷.

IL-18 kann jedoch im Gegensatz zu IL-12 nicht allein eine T_H1-Differenzierung induzieren^{28;38}. In Abwesenheit von IL-12 führt IL-18 sogar bei gleichzeitiger Aktivierung des T-Zell-Rezeptors zu einer T_H2-Differenzierung von T- und NK-Zellen mit Produktion von IL-4, IL-13 und IL-10^{39;40}. Damit scheint IL-18 eher eine unterstützende Funktion bei der Ausbildung einer T-Zell-Antwort zu haben, während die Verstärkung einer bestimmten Differenzierungsrichtung abhängig vom weiteren Zytokinprofil ist.

Interferon- γ (IFN- γ)

IFN- γ ist eines der am längsten bekannten Zytokine. Es wurde zum ersten Mal 1965 von Wheelock et al. als ein von Phytohämagglutinin (PHA)-stimulierten Lymphozyten sezerniertes Protein mit virus-inhibierenden Eigenschaften beschrieben⁴¹. IFN- γ ist ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von 40 kDa, das vorwiegend von T_H1-Zellen, aber auch von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen exprimiert wird. Neben dem antiviralen Effekt hat IFN- γ wichtige Funktionen in der Aktivierung von Makrophagen, T-Zell-Differenzierung und MHC-Expression^{42;43}. IFN- γ unterstützt die Ausbildung einer T_H1-Immunantwort und supprimiert eine T_H2-Differenzierung einerseits durch Reduktion der IL-4-Rezeptor-Expression⁴⁴, andererseits durch eine Unterstützung der IL-12 Produktion in Makrophagen²² im Sinne einer positiven Rückkopplung. Zusätzlich steigert IFN- γ die Expression des hochaffinen IL-12-Rezeptors in T-Zellen⁴⁵. So ist IFN- γ essentiell für die Abwehr von überwiegend intrazellulär lebenden Pathogenen durch die starke Induktion einer T_H1-Immunantwort, kann aber auch schwerwiegende Folgen bei Autoimmunerkrankungen wie dem Morbus Crohn oder dem Diabetes mellitus Typ-1 haben⁴⁶.

1.1.4 T_H2-Zytokine

Interleukin-4 (IL-4)

IL-4 wurde 1982 zunächst als ein B-Zell-stimulierendes Zytokin beschrieben⁴⁷. Unter den verschiedenen Funktionen von IL-4 sind jedoch die Modulation der Makrophagenfunktion sowie seine Rolle in der T-Zell-Differenzierung die Wichtigsten. IL-4 wird vor allem von aktivierten T-Zellen und CD4⁺NK1.1⁺ Zellen (auch als NK-T-Zellen bezeichnet) produziert⁴⁸⁻⁵⁰. NK-T-Zellen gehören zu den CD4⁺-T-Lymphozyten, ihre Entwicklung ist jedoch nicht MHC-Klasse II-abhängig, sondern sie erkennen ein MHC-Klasse Ib-Molekül, CD1, das auf Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert wird und unter anderem ein bakterielles Lipid präsentiert⁵¹. Nach der Aktivierung produziert die NK-T-Zelle große Mengen von IL-4 und kann so die Entwicklung von aktivierten naiven CD4⁺-Lymphozyten in Richtung des T_H2-Phänotyps dirigieren⁵². Andererseits können naive CD4⁺-T-Zellen nach CD28-abhängiger Aktivierung geringe Mengen von IL-4 produzieren, die nach Akkumulation durch anhaltende Stimulation einen Schwellenwert überschreiten und die T_H2-Differenzierung auslösen können⁴⁶. Zusätzlich zu seiner T_H2-fördernden Wirkung inhibiert IL-4 die Entwicklung von T_H1-Zellen durch Suppression der IL-12 Synthese⁵³ sowie durch die Herunterregulation des hochaffinen IL-12 Rezeptors. Diese wird durch verminderte Genexpression von niedrigaffinen Untereinheiten des Rezeptors erreicht, die für die Bildung des hochaffinen Rezeptors essentiell sind⁴⁵.

Interleukin-10 (IL-10)

IL-10 wird von T-Zellen der T_H2-Differenzierung sowie von Makrophagen sezerniert^{5;54}. Seit seiner Erstbeschreibung durch Fiorentino et al.⁵ 1989 wurde die Fähigkeit dieses Zytokins, die Aktivierung und Zytokinproduktion der T_H1-Immunantwort zu unterbrechen und die Entzündungsreaktion zu terminieren, näher charakterisiert. Der Rezeptor für IL-10 wird auf den meisten Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert und durch Aktivierung in Monozyten hoch⁵⁴ und in T-Zellen herunterreguliert⁵⁵. Dementsprechend hemmt IL-10 die Zytokinproduktion in aktivierten Makrophagen sehr potent⁵⁶, vor allem die für die weitere Einleitung und Aufrechterhaltung einer Immunreaktion wichtigen Zytokine IL-12, TNF- α und IL-1 β sowie das systemisch wirksame IL-6^{11;57}. Zusätzlich wird die Produktion von physiologischen Antagonisten dieser Zytokine wie dem „Interleukin-1 receptor antagonist“ (IL-1RA) und löslichem p55 und p75 TNF- α Rezeptor (TNF- α R) gesteigert⁵⁷. Die Expression von MHC-Klasse II Antigenen⁵⁸, Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und kostimulatorischen Signalen wie B7.2 wird ebenfalls reduziert^{59;60}, woraus eine verminderte Fähigkeit der APCs zur Aktivierung von T-Zellen resultiert⁶¹. Auch bei dendritischen Zellen hat IL-10 ähnliche Effekte, es führt zu einem der Anergie ähnlichen Status⁵⁴. Dadurch wird die weitere Aktivierung und Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion unterbrochen und die Zytokinproduktion der CD4⁺-Zellen reduziert⁶².

1.2 T_H1- und T_H2-Immunität bei Krankheiten

1.2.1 Infektionserkrankungen

Die Ausbildung einer T_H1- oder T_H2-Immunantwort steht in engem Zusammenhang mit der Infektionsabwehr, da sie eine Resistenz gegenüber vielen Mikroorganismen vermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass die Art der Differenzierung in T_H1- oder T_H2-Antwort entscheidenden Einfluss für den Verlauf der Infektion hat⁶³. Eine Infektion mit *Leishmania major* im Mausmodell führt bei Ausbildung einer T_H1-Antwort zur Resistenz, die Gabe von anti-IL-4-Antikörpern schützt das Tier, während eine T_H2-Antwort oder die Behandlung mit anti-IFN- γ -Antikörpern zum Ausbruch der Erkrankung führt⁶³. Die Entwicklung der protektiven T_H1-Antwort wird unter anderen durch IL-12 vermittelt⁶⁴. Eine ähnliche Beobachtung konnte auch bei mit *Mycobacterium leprae* infizierten Menschen gemacht werden: eine überwiegende T_H1-Antwort führt zur milder verlaufenden tuberkuloiden Lepra, die T_H2-Differenzierung dagegen zur lepromatösen Lepra mit schweren Verstümmelungen⁶⁵. Die Ursache dieser fehlgeleiteten Immunantwort, die zur Erregerpersistenz bis hin zum Tod des Individuums führen, ist noch unklar.

1.2.2 Autoimmunerkrankungen

Auch bei Autoimmunerkrankungen kommt es zu einer Fehlfunktion des Immunsystems. Hier richtet sich die Aktivität der Abwehr gegen fälschlicherweise als „Fremd“ erkannte körpereigene Zellen. Die nachfolgende Immunreaktion kann wiederum in eine T_H1- oder T_H2-dominierte Verlaufsform unterschieden werden. Das Asthma bronchiale und das atopische Ekzem scheinen durch eine T_H2-Immunreaktion gefördert zu werden, dagegen sind bei der Multiplen Sklerose, der rheumatoiden Arthritis und dem Typ-1-Diabetes T_H1-Zellen und deren Zytokine beteiligt⁶⁶. Der Typ-1-Diabetes ist gekennzeichnet durch die spezifische Zerstörung der β -Zellen in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas. Der Krankheitsverlauf hat zwei Stadien. Während in der präklinischen Phase noch keine Stoffwechselstörung vorliegt, findet man im Pankreas die Insulinitis, eine Infiltration der Langerhans'schen Inseln durch Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten. In der klinischen Phase tritt dann der manifeste Diabetes mellitus auf, da ein Großteil der β -Zellen zerstört wurde. Beim Mausmodell des Typ-1-Diabetes, der NOD-Maus (non-obese diabetic Maus) resultiert je nach Art der Immunantwort ein unterschiedlicher Verlauf der Erkrankung⁶⁷: Eine T_H1-dominierte Antwort führt zu einer raschen Zerstörung der Inselzellen, während das Überwiegen einer T_H2-Insulinitis mit einem benignen Verlauf korreliert, bei dem noch β -Zellen erhalten bleiben und sich unter Umständen kein manifester Diabetes entwickelt^{66,68,69}. Dabei spielen Zytokine wie IL-18, IL-12, IL-6, IL-1 β und IFN- γ eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung und Verstärkung der destrukturierenden T_H1-Immunantwort^{67,70}.

1.2.3 Arteriosklerose

In den vergangenen Jahren haben Studien die entscheidende Rolle der Entzündungsreaktion in der Pathogenese der Arteriosklerose herausgestellt⁷¹. Schon die früheste morphologisch fassbare arteriosklerotische Läsion besteht vorwiegend aus Immunzellen: Monozyten, T-Lymphozyten und glatten Muskelzellen^{72;73}. Die in der Regel durch oxidiertes LDL aktivierten Makrophagen innerhalb des Plaques sezernieren neben proteolytischen Enzymen und Wachstumsfaktoren auch Zytokine wie TNF- α , IL-1 und TGF- β ⁷¹. Diese unterstützen wahrscheinlich die Progression der Läsion und führen zusammen mit einer Antigenpräsentation zur Aktivierung von T-Zellen⁷⁴. In den arteriosklerotischen Plaques nachgewiesenen CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten sezernieren ebenfalls Zytokine wie TNF- α , TGF- β und IFN- γ und können die Entzündungsreaktion dadurch weiter unterhalten^{75;76}. Dabei scheint TGF- β eine gewisse gegenregulatorische Funktion zu haben. Die TGF- β Spiegel im Serum sind bei Patienten mit schwerer Arteriosklerose erniedrigt⁷⁷. Des Weiteren findet sich eine erhöhte Anzahl an Mutationen des TGF- β Rezeptors in arteriosklerotischen Plaques⁷⁸. Auch Komplikationen wie die Ruptur des arteriosklerotischen Plaques mit nachfolgendem kompletten Verschluss des Gefäßquerschnitts und Ischämie im abhängigen Kapillarbett sind eng an die vermehrte Expression T_H1-assoziiierter Zytokine wie IFN- γ , IL-1 β und TNF- α gekoppelt⁷⁹⁻⁸¹.

1.2.4 Typ-2-Diabetes mellitus

Auch der Typ-2-Diabetes scheint eine immunologische Komponente zu besitzen^{82;83}. Die Kombination aus peripherer Insulinresistenz bei gleichzeitig gestörter Insulinsekretion der β -Zellen stellt die pathophysiologische Basis der Erkrankung dar. Beide Störungen bestehen schon lange vor der klinischen Manifestation des Diabetes und werden bei bestehender genetischer Prädisposition durch Wechselwirkung mit Umweltfaktoren wie Bewegungsmangel und Übergewicht noch gefördert⁸⁴. Der Einfluss der erhöhten Körperfettmasse auf die Insulinresistenz konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden. Dabei sind mögliche Mediatoren aus dem Fettgewebe, die zur Insulinresistenz am Muskel führen können, freie Fettsäuren (FFS), Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Leptin, Resistin und IL-6^{84;85}.

FFS-Spiegel sind bei insulinresistenten und übergewichtigen Personen erhöht^{86;87} und führen über die Modulation von Stoffwechselfvorgängen zu einer Hyperglykämie und gleichzeitiger Hyperinsulinämie⁸⁸⁻⁹¹. Während über die direkte Interaktion von FFS mit dem Immunsystem und die Induktion pro- und antiinflammatorischer Zytokine bisher widersprüchliche Daten existieren⁹²⁻⁹⁴, konnte für das unter anderem von Adipozyten freigesetzte Zytokin TNF- α eine Verstärkung der Insulinresistenz im Mausmodell nachgewiesen werden⁹⁵. TNF- α kann direkt mit der Insulin-Signalkaskade interferieren und so den durch Insulin stimulierten Glukose-

transport behindern⁹⁶. Beim Menschen konnte bisher kein Zusammenhang zwischen zirkulierendem TNF- α -Spiegeln und peripherer Insulinresistenz nachgewiesen werden⁹⁷, möglicherweise ist aber die lokale TNF- α Produktion entscheidend^{98;99}.

Das immunregulatorische Zytokin IL-6 wird im subkutanen Fettgewebe exprimiert und auch sezerniert. Es trägt wahrscheinlich wesentlich zu den erhöhten systemischen IL-6 Spiegeln in übergewichtigen Individuen bei⁸⁵. Die Assoziation zwischen IL-6 Spiegeln im Serum und dem Typ-2-Diabetes mellitus sowie seinem Vorläufer, der gestörten Glukosetoleranz (IGT), kann klar belegt werden^{100;101}. Dabei scheint ein bestimmter Polymorphismus im Bereich des IL-6 Promotors die Entwicklung von der gestörten Glukosetoleranz zum manifesten Diabetes zu beschleunigen¹⁰². Über den Zusammenhang zwischen dem IL-6 Promotor-Polymorphismus und seinem Einfluss auf die periphere Insulinsensitivität existieren jedoch bislang nur wenige, konträre Daten^{103;104}.

Zusätzlich führt der Diabetes mellitus zu einer Verstärkung der Arteriosklerose und deren Komplikationen. Die Hyperglykämie fördert einerseits die initiale Funktionsstörung und Aktivierung des Immunsystems durch vermehrten oxidativen Stress¹⁰⁵ mit Bildung von oxidierten LDL¹⁰⁶ und Verminderung der NO-vermittelten Vasodilatation¹⁰⁷. Erhöhte Glukosespiegel können direkt den Transkriptionsfaktor NF κ B aktivieren, der die Transkription mehrerer proinflammatorischer Zytokine kontrolliert¹⁰⁸. Außerdem konnte gezeigt werden, dass gesteigerte Glukosekonzentrationen in vitro die Bildung des Zytokins IL-6 stimulieren¹⁰⁹. Zusätzlich kommt es im Rahmen der Hyperglykämie zur verstärkten nicht-enzymatischen Glykierung von Proteinen, wodurch sich intermediäre, hochreaktive advanced glycation end products (AGE) bilden. Durch Aktivierung des unter anderem auf Endothelzellen exprimierten Rezeptors für AGE (RAGE) wird über den nukleären Transkriptionsfaktor NF κ B die Expression von Zytokinen wie TNF- α , IL-1 β und von RAGE gesteigert^{110;111}. Der AGE-induzierte oxidative Stress kann außerdem zur Bildung von Hitzeschockproteinen (Hsp) führen und auf diesem Wege die Expression von Adhäsionsmolekülen und proinflammatorischen Zytokinen zusätzlich induzieren¹¹². Diese Prozesse unterstützen die Entwicklung von arteriosklerotischen Läsionen. Auch in späteren Stadien der Arteriosklerose führt die Hyperglykämie zu einer Aggravation der Erkrankung durch die Reduktion der Kollagenbildung und verstärkte Expression von kollagenabbauenden Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)¹¹³, was zur Plaqueruptur und Ischämie in der Peripherie führen kann.

Besonders die Erkenntnisse über die dominante Rolle einer chronischen Entzündungsreaktion bei den beiden großen Volkskrankheiten, der Arteriosklerose und dem Typ-2-Diabetes, zeigen die Notwendigkeit auf, neue Formen der Intervention zu entwickeln, die sich vorwiegend auf die präventive Modulation der Immunbalance und weniger auf die symptomatische Therapie der akuten und chronischen Folgen der Stoffwechselstörungen konzentrieren würden.

1.3 Möglichkeiten der Immunmodulation

Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die Möglichkeiten der Immunmodulation mit aktuell im klinischen Einsatz befindlichen Substanzen gegeben werden.

1.3.1 Generelle Immunsuppression

Während das Verständnis des komplexen Netzwerkes Immunsystem schon relativ groß ist, werden bei heutigen Therapiekonzepten, die sich eine Modulation der Immunabwehr zunutze machen, vielfach nur generelle Immunsuppressiva eingesetzt. Diese führen zu einer mehr oder weniger vollständigen, unselektiven Blockade aller Funktionen des Immunsystems.

Glukokortikoide

Hydrokortison ist eines der bekanntesten und potentesten Immunsuppressiva in der Medizin. Als Steroidhormon kann es die Zellmembran passieren und im Zytoplasma an den Glukokortikoid-Rezeptor (GK) binden. Nach Translokation in den Zellkern bildet der Komplex aus Glukokortikoid und GK Homodimere, die die Transkription von antiinflammatorischen Genen verstärken und von proinflammatorischen Zytokinen hemmen können. Dies geschieht einerseits durch die direkte Bindung und Inhibition von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF- κ B^{110;114}, andererseits durch verstärkte Expression von I κ B, das einen Proteinkomplex mit NF- κ B bildet und dessen Aktivität auf diese Weise beendet¹¹⁵. Zusätzlich führt Hydrokortison zu einer unspezifischen Hemmung der Transkription durch eine erschwerte Ablösung und Abwicklung der DNA von den Histonen, wodurch die Bindung von Transkriptionsfaktoren und der DNA-Polymerase behindert wird¹¹⁵.

Azathioprin und Cyclophosphamid

Auch bestimmte Zytostatika wie Azathioprin und Cyclophosphamid können als Immunsuppressiva eingesetzt werden, da sie durch ihre Interaktion mit der DNA bevorzugt auf Zellen mit hoher Teilungsrate wirken. Azathioprin wird im Körper zu seiner aktiven Form, 6-Mercaptopurin, metabolisiert und interferiert mit der Purin-Biosynthese. Dadurch wird die Herstellung der beiden Nukleotide ATP und GTP blockiert. Die DNA-Replikation kommt zum Erliegen¹¹⁶.

Cyclophosphamid führt dagegen zu einer Alkylierung der DNA. Es kommt bei der DNA-Replikation und der Transkription zu Fehlpaarungen mit nachfolgendem Basenaustausch, so dass fehlerhafte oder funktionsuntüchtigen Proteine in der Zelle gebildet werden, wodurch der Zellstoffwechsel blockiert wird¹¹⁷. Durch die hohe Teilungsrate von Lymphozyten nach Aktivierung sind diese besonders empfindlich für diese Zytostatika^{118;119}. Aber auch das gesamte hämatopoetische System wird beeinträchtigt, es kann zu Anämie, Thromozytopenie

und Leukopenie kommen. Die Darmschleimhaut kann ebenfalls schwer geschädigt werden¹²⁰.

Cyclosporin A und Tacrolimus

Die Immunsuppressiva Cyclosporin A und FK506 oder Tacrolimus wirken im Gegensatz zu Azathioprin und Cyclophosphamid vor allem die Proliferation von T-Zellen, da sie mit dem Signaltransduktionsweg des T-Zell-Rezeptors (TCR) interferieren¹²¹. Cyclosporin A bindet im Zytoplasma an Cyclophilin, Tacrolimus an das FK-bindende Protein, beide haben jedoch denselben Wirkmechanismus. Die Komplexe aus zytoplasmatischem Protein und Cyclosporin A bzw. Tacrolimus inhibieren die Phosphatase-Aktivität des Calcineurins, einer speziellen zytoplasmatischen Phosphatase, die durch Steigerung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Bindung des T-Zell-Rezeptors an den MHC-Komplex aktiviert wird. Auf diese Weise kann die weitere Aktivierung der Transkriptionsfaktoren der NF-AT-Familie unterbunden und die Transkription von IL-2 und weiteren proinflammatorischen Zytokinen blockiert werden¹²². Durch die reduzierte Zytokinproduktion und Proliferation der T-Zellen wird auch die Aktivierung von B-Zellen eingeschränkt, da diese auf die unterstützende Stimulation durch T_H-Zellen angewiesen sind^{121;123}.

1.3.2 Selektive Immunmodulation

Die therapeutische Strategie der selektiven Immunmodulation hat zum Ziel, das fehlgesteuerte Immunsystem mit einem Ungleichgewicht aus proinflammatorischen und antiinflammatorischen Faktoren wieder auszubalancieren, ohne gleichzeitig die gesamte Immunabwehr zu hemmen.

Desensibilisierung

Die Desensibilisierung wird vor allem bei Erkrankungen wie der Insektengift-Allergie oder dem Asthma bronchiale eingesetzt. Diese Erkrankungen sind durch die Produktion von IgE-Antikörpern gegen weit verbreitete, harmlose Antigene gekennzeichnet, die über die Schleimhaut in Kontakt mit dem Immunsystem kommen. Charakteristisch ist die exzessive IgE-Produktion durch B-Lymphozyten, die anscheinend durch die frühe und übermäßige Produktion von IL-4 von NK1.1-positiven CD4-T-Zellen vermittelt wird^{52;124}. Die produzierten IgE-Antikörper binden an hochaffine IgE-Rezeptoren auf Mastzellen und eosinophilen Granulozyten und aktivieren durch die Bindung des Antigens bei erneuter Exposition die Mastzellen. Daraufhin werden große Mengen Histamin und anderer Mediatoren ausgeschüttet, was zu den typischen allergischen Symptomen führt. Zusätzlich wird durch die gleichzeitige Anregung der IL-4 Produktion die Bildung von weiteren IgE unterstützt¹²⁵. Diese Ausbildung einer pathologischen T_H2-Antwort ist besonders bei bestimmten Personen, den so genannten Atopikern, ausgeprägt, während gesunde Individuen auf Umweltantigene eher

mit einer T_H1 -Immunantwort reagieren, die protektiv zu sein scheint. Durch die Desensibilisierungstherapie wird versucht, die beim Atopiker dominante T_H2 -Reaktion in eine T_H1 -Reaktion umzuwandeln und so den Circulus vitiosus aus sich immer weiter verstärkender IgE-Produktion zu unterbrechen. Durch die Injektion steigender Dosen des Antigens wird die Umwandlung in eine T_H1 -dominierte Reaktion angeregt, die mit einer vermehrten Bildung von Antikörpern der Klasse IgG einhergeht. Dadurch wird zum einen die Menge des produzierten IgE vermindert, zum anderen fangen die IgG-Antikörper das auslösende Antigen ab, so dass es nicht mehr an das noch vorhandene IgE binden kann. Der Mechanismus dieser T_H2/T_H1 -Konversion ist jedoch unklar. Die Desensibilisierung wird sehr erfolgreich bei der Therapie von Allergien gegen Insektengifte angewendet, ist aber beim Asthma bronchiale aus bisher unbekanntem Gründen nur selten effektiv^{126;127}.

Orale Toleranz

Ein anderer Ansatz der selektiven Immunmodulation benutzt das Phänomen der oralen Toleranz. Darunter versteht man das Ausbleiben einer Immunreaktion auf in der Nahrung enthaltene Antigene, mit denen der Organismus täglich konfrontiert wird. So bilden B-Lymphozyten keine Antikörper gegen oral aufgenommenes Ovalbumin, während die Injektion eine starke Antikörperreaktion hervorruft. Erfolgt diese Injektion jedoch nach einer vorausgegangenen oralen Exposition von Ovalbumin, tritt keine Antikörperbildung auf, selbst zusammen mit der Gabe eines die Immunreaktion fördernden Adjuvans¹²⁸. Diese Toleranzbildung ist Antigen-spezifisch und wird durch die Präsentation des Antigens oder seiner Fragmente von APCs an T-Zellen ausgelöst, wobei aber charakteristischerweise die zusätzlichen inflammatorischen Kostimuli fehlen, die bei pathogenen Keimen immer vorhanden sind. Dadurch wird in den T-Zellen ein Stadium der Anergie ausgelöst, in dem diese nicht mehr aktivierbar sind^{129;130}. Zusätzlich scheinen regulatorische T-Zellen in den Vorgang der oralen Toleranzbildung involviert zu sein¹³¹. Sie sezernieren vorwiegend die Zytokine IL-10 und TGF- β und können zu einer Hemmung sowohl der T_H1 -Antwort wie auch der Antikörperbildung führen^{129;131}.

Anti-TNF- α -Antikörper

Sowohl die Desensibilisierung als auch die orale Toleranz lassen sich nur spezifisch für das jeweilige Antigen auslösen, der jeweils zu Grunde liegende Mechanismus ist bisher nur teilweise geklärt. Dem gegenüber stellt der Einsatz von Antikörpern gegen TNF- α oder Fusionsproteine des TNF- α Rezeptors (TNF- α R) einen kausalen Therapieansatz dar, da TNF- α eine zentrale Rolle bei der Pathogenese und Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion beispielsweise im Rahmen der rheumatoiden Arthritis spielt. Anti-TNF- α -Antikörper vermindern dabei nicht nur die Symptome, sondern führen auch zu einer

Reduktion der Serumspiegel des C-reaktiven Proteins (CRP) als Zeichen einer Hemmung der Entzündungsaktivität. Ähnliche Ergebnisse wurden auch durch den Einsatz des TNF- α -Fusionsproteins erreicht¹³². Während die Reduktion von chronisch erhöhten TNF- α Spiegeln einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf hat, führt sie möglicherweise aber auch zu einer reduzierten Infektabwehr bei akuten bakteriellen Infektionen, da TNF- α eine wichtige Funktion bei der Aktivierung der Immunreaktion hat^{24;133}. Die Infektion mit *Mycobacterium avium* verläuft in Mäusen, die den p55-Subtyp des TNF-Rezeptors nicht exprimieren, durch die Disintegration der Granulome tödlich^{134;135}. Dieser Rezeptor scheint zudem bei der Induktion von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und der nachfolgenden Extravasation von Leukozyten eine entscheidende Rolle zu spielen¹³⁶. Außerdem stammen die eingesetzten Antikörper meist aus Mäusezellen. Auch wenn durch spezielle Methoden die Antigenität reduziert werden kann, besteht die Möglichkeit, dass der Patient Antikörper gegen das Fremdprotein entwickelt. Diese Antikörper führen nicht nur zu einer Inaktivierung der Anti-TNF- α -Antikörper, sondern können zu allergischen Reaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock führen^{120;132}.

Während der zu Grunde liegende Mechanismus der T_{H2}/T_{H1}-Konversion bei der Desensibilisierung ebenso wie die Induktion der Anergie bei der oralen Toleranz noch weitgehend ungeklärt sind, wird durch den Einsatz von anti-TNF- α -Antikörpern oder TNF- α -Fusionsproteinen gezielt in eine pathologische Immunreaktion eingegriffen. Dadurch kommt es zu einer generellen Blockade der Entzündungsreaktion, es werden möglicherweise auch die durch TNF- α ausgelösten notwendigen Reaktionen bei einer akuten bakteriellen Infektion gehemmt werden. Dem gegenüber führen generelle Immunsuppressiva zwangsläufig zu einer Unterdrückung der Immunantwort im Rahmen einer Infektion, zusätzlich haben sie zum Teil schwere Nebenwirkungen. Andere therapeutische Ansätze im Bereich der Autoimmunerkrankungen verwenden Antikörper gegen den T-Zell-Rezeptor der speziellen, krankheitsauslösenden T-Zellen oder gegen den MHC-Komplex von APCs, der das entsprechende Autoantigen präsentiert. Diese Therapieansätze befinden sich noch im experimentellen Stadium¹²⁰.

Durch die Erkenntnis über die dominante Rolle einer chronischen, subklinischen Entzündungsreaktion bei der Pathogenese der Arteriosklerose und des Typ-2-Diabetes entsteht der Bedarf einer nebenwirkungsarmen, präventiven Immunmodulation als kausalem Therapieansatz.

1.4 Immunologische Testsysteme

Um eine Vielzahl von Substanzen auf ihre mögliche immunmodulierende Wirkung zu testen, wird ein zuverlässiges Screening-System benötigt, in dem ohne größeren Aufwand alle Immunzellen und ihre Interaktionen untersucht werden können. Generell kann man bei Testsystemen die *in vitro* Systeme von Experimenten *in vivo* abgrenzen. Ein Großteil der *in vitro* Testsysteme benutzt entweder einzelne Zelltypen der natürlichen Immunität wie Makrophagen und dendritische Zellen oder T-Zell-Klone als Bestandteil der adaptiven Immunität. Einzelne Zelltypen zum Beispiel aus Vollblut für jedes Experiment frisch zu isolieren, ist sehr aufwendig. Zudem ist aufgrund der hohen interindividuellen Variabilität eine große Anzahl von Experimenten nötig. Die Verwendung von Zelllinien erfordert zwar regelmäßige Pflege, bietet als Vorteil aber eine geringe Variabilität der experimentellen Ergebnisse. Inwieweit die Daten auf native Zellen übertragbar sind, hängt auch von der verwendeten Zelllinie ab, da es sich in der Regel um Klone bestimmter antigenspezifischer Zellen handelt. Außerdem bedarf es in diesen Zelllinien wie auch bei isolierten humanen peripheren Blut-mononukleären Zellen (PBMC) starker, meist unphysiologischer Stimuli wie Phytohämagglutinin (PHA) oder anti-CD3 Antikörper zur Induktion einer messbaren Immunantwort. Damit sind diese Versuchsansätze zwar hervorragend geeignet, die molekularen Details der Interaktion zwischen einer bestimmten Substanz und dem jeweiligen Zelltyp zu untersuchen, es ist aber keine Aussage über die natürlichen Interaktionen zwischen den Zellen der Immunabwehr möglich. Des Weiteren wäre eine Vielzahl von Experimenten mit verschiedenen Zelltypen notwendig, um die immunologischen Eigenschaften einer Substanz umfassend zu charakterisieren.

Die Untersuchung der Auswirkungen einer Substanz im Organismus kann dagegen durch *in vivo* Versuche vorgenommen werden. Zu diesen Tierexperimenten werden meist Mäuse oder Ratten, oft mit einem speziellen genetischen Hintergrund, aber auch Schweine und vor allem bei klinischen Studien auch Affen verwendet. Diese Untersuchungen ermöglichen die Analyse der Wirkungen einer Substanz auf alle Gewebe des Organismus. Sie beziehen die Wechselwirkungen des Immunsystems mit den Organen wie auch die Interaktionen der einzelnen Komponenten des Immunsystems mit ein. Tierexperimente sind jedoch sehr aufwendig in ihrer Durchführung und erfordern durch die große interindividuelle Variabilität eine ausreichend große Anzahl an Versuchstieren, um eine statistisch signifikante Aussage zu erhalten. Damit sind *in vivo* Versuche für Screeninguntersuchungen nicht geeignet.

1.5 Ziel dieser Arbeit

Die Immunantwort und deren Regulation stellt ein komplexes Netzwerk aus zellulären Kontakten und Zytokinfreisetzung dar, von dem hier nur ein kleiner Ausschnitt dargestellt wurde. Für die Entwicklung eines validen und zuverlässigen *in vitro* Testsystems muss ein Kompro-

miss zwischen einem möglichst physiologischen Zustand des Systems und der experimentellen Durchführbarkeit geschlossen werden. Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Charakterisierung eines Screening-Systems für immunmodulatorische Substanzen unter besonderer Berücksichtigung der Erhaltung möglichst physiologischer Bedingungen zur Analyse der Interaktion zwischen natürlicher und adaptiver Immunität.

Zu diesem Zweck wurden die durch Antigen-präsentierende Zellen und LPS vermittelten Stimuli der natürlichen Immunität mit der Reaktion der adaptiven Immunität auf allogene Aktivierung in der modifizierten „mixed lymphocyte culture“ (MMLC) kombiniert. Dabei wurde zunächst die Wirkung von LPS auf die Freisetzung des Schlüsselzytokins der klassischen MLC, Interferon- γ (IFN- γ), untersucht und die Beteiligung von Mediatoren der natürlichen Immunität bei der Induktion der IFN- γ Freisetzung analysiert. Nach dieser Charakterisierung des Aktivierungsmechanismus wurde auch die Empfindlichkeit des Systems gegenüber modulatorischen Einflüssen wie T_H2-Zytokinen und immunsupprimierenden Medikamenten getestet. Die Modulierbarkeit des Testsystems ist die Voraussetzung, um später die Wirkung von immunmodulatorischen Substanzen in diesem komplexen System untersuchen zu können und auf diese Weise nicht nur generell immunsupprimierende, sondern auch selektiv immunmodulierende Substanzen voneinander zu unterscheiden und ihren Wirkmechanismus näher zu beschreiben.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Blutentnahme

Surflo winged infusion set 22G x 3/4" (Terumo, Leuven, Belgien)

Luer Adapter für Vacutainer-Systeme (Becton Dickinson, New York, USA)

Natrium-Heparinat Vacutainer 143 I.U., 16x100mm, 10ml (Becton Dickinson, Plymouth, GB)

Zellkultur

Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

Plastikpipetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland; Falcon, Heidelberg, Deutschland)

48well Zellkulturplatten (Falcon, Heidelberg, Deutschland)

96well Rundbodenplatten (Falcon, Heidelberg, Deutschland)

ELISA und TaqMan PCR

96well Maxisorp Nunc Immuno-Plates (Nunc Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland)

Zentrifugenröhrchen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)

Multiply Pro Tubes 0,2 ml für PCR (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

Micro Amp Optical 96-well Plates, Kat.-Nr.: 8010560 (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland)

Micro Amp Optical Caps, Kat.-Nr.: 8010935 (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland)

2.1.2 Geräte

Begasungsbrutschrank EC 5060 CO2 (Heraeus, Osterode, Deutschland)

Emax Microplate precision reader (Molecular Devices, München, Deutschland)

Feinwaage AC 88 DeltaRange (Mettler, Giessen, Deutschland)

GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland)

Imaging Scanner Model RMC (Canberra Packard, Schwadorf, Österreich)

Labormikroskop DMIL (Leitz Biomed, Wetzlar, Deutschland)

Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Laminair HB 2472K (Heraeus, Osterode, Deutschland)

Multiwell Harvester (Canberra Packard, Schwadorf, Österreich)

Nunc Immuno-Wash 8 (Nunc Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland)

Schüttler für Platten Titramax 100 (Heidolph, Saarbrücken, Deutschland)

Schüttler für Platten Titramax 1000 (Heidolph, Saarbrücken, Deutschland)

Spektralphotometer DU 650 (Beckmann, Fullerton, USA)

TaqMan cycler ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland)

Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Tischzentrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Tischzentrifuge Microspin FV 2400 (MolTech, Berlin, Deutschland)

TopCount 100 Detector (Canberra Packard, Schwadorf, Österreich)

Zentrifuge Allegra 21R (Beckman, Fullerton, USA)

Zentrifuge Sepatech (Heraeus, Osterode, Deutschland)

2.1.3 Reagenzien

Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Dinatriumphosphatdihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumcarbonathydrat ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ficoll Paque Plus	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Fluka, Buchs, Schweiz
Methyl- ³ H-Thymidin	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Polymyxin B Sulfat, Kat.-Nr.: P4932	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
TMB Plus Ready-to-use Substrat	Kem-Em-Tec A/S, Kopenhagen, Dänemark
Trypanblau 0,4%, Kat.-Nr.: 15250-61	Gibco / Life Technologies, Paisley, Großbritannien
Türks-Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween 20 pure	Serva, Heidelberg, Deutschland

2.1.4 Enzyme

HRP Streptavidin Konjugat (Zymed, South San Francisco, USA)

Omniscript RT kit, Kat.-Nr.: 205111 (Omniscript Reverse Transkriptase, Buffer RT, dNTP Mix, RNase-freies Wasser) (Qiagen, Hilden, Deutschland)

RNasin - Ribonuclease Inhibitor (Promega, Mannheim, Deutschland)

TaqMan Gold mit Puffer A, Kat.-Nr.: 4304441 (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland)

2.1.5 Zellkultur

2.1.5.1 Medien

RPMI 1640-Medium mit GlutaMax I und 25 mM HEPES (Gibco Life Technologies, Paisley, Großbritannien)

HBSS-Hanks gepufferte Salzlösung (Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland)

PBS Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland)

2.1.5.2 Proteine, Antikörper und Stimulanzen

Hitzeinaktiviertes Humanserum (ausgewähltes Lot mit geringer stimulatorischer Aktivität)

Lipopolysaccharid von *E. coli* 026:B6, Kat.-Nr.: L2654 (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)

Monoklonaler anti-human IL-12 Antikörper Klon 24910.1, Kat.-Nr.: MAB219 (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)

Monoklonaler anti-human IL-18 Antikörper Klon 125-2H, Kat.-Nr.: D044-3 (MBL, Naka-ku Nagoya, Japan)

Rekombinantes humanes IL-12 (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)

Rekombinantes humanes IL-18 (MBL, Naka-ku Nagoya, Japan)

Rekombinantes humanes IL-4 (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)

2.1.6 Proliferations-Assay

Unifilter 96-plate GF/C (Canberra Packard, Schwadorf, Österreich)

Microscint Szintillationslösung (Canberra Packard, Schwadorf, Österreich)

2.1.7 ELISA

PeliKine compact ELISA Kit für IL-6, Kat.-Nr.: M1916 (CLB, Amsterdam, Niederlande)

Antikörper

Gereinigter monoklonaler anti-humaner IFN- γ Antikörper Klon 2G1, Isotyp Maus IgG_{1K}, Kat.-Nr.: M-700A-E (Endogen, Woburn, USA)

Gereinigter monoklonaler anti-humaner, biotinylierter IFN- γ Antikörper Klon B133.5, Isotyp Maus IgG_{1K}, Kat.-Nr.: M-701-B (Endogen, Woburn, USA)

Gereinigter monoklonaler anti-human IL-10 Antikörper Klon JES3-9D7, Isotyp IgG₁, Kat.-Nr.: 554705 (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

Gereinigter monoklonaler anti-human, biotinylierter IL-10 Antikörper Klon JES3-12G8, Isotyp Rat IgG_{2a}, Kat.-Nr.: 554499 (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

Gereinigter monoklonaler anti-human TNF- α Antikörper Klon Mab1, Isotyp Maus IgG₁, Kat.-Nr.: 551220 (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

Gereinigter monoklonaler, biotinylierter anti-human TNF- α Antikörper Klon Mab11, Isotyp Maus IgG₁, Kat.-Nr.: 554511 (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

Proteine

Gereinigtes rekombinantes humanes IFN- γ , Kat.-Nr.: 554616 (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

Gereinigtes rekombinantes humanes IL-10, Kat.-Nr. : 217-IL-005 (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)

Gereinigtes rekombinantes humanes TNF- α , Kat.-Nr.: 210-TA-010 (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)

2.1.8 RNA-Isolierung

RNA-Stabilisierungspuffer (entsprechend dem Puffer im PAXgene blood RNA kit), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Qiagen, Hilden, Deutschland

PAXgene blood RNA kit, Kat.-Nr.: 762134 (PreAnalytix, Hombrechtikon, Schweiz)

2.1.9 Nukleotide

Gene Amp dNTP's mit dUTP, Kat.-Nr.: 8080095 (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland)

2.1.10 Quantitative TaqMan PCR

Primer und Sonden

humanes β -Actin:

Forward Primer: 5'-ATT GCC GAC AGG ATG CAG AA-3'

Reverse Primer: 5'-GCC GAT CCA CAC GGA GTA CT-3'

Sonde: 5'-CAA GAT CAT TGC TCC TCC TGA GCG CA-3'

humanes TNF- α :

Forward Primer: 5'-AGG CGG TGC TTG TTC CTC A-3'

Reverse Primer: 5'-GTT CGA GAA GAT GAT CTG ACT GCC-3'

Sonde: 5'-CCA GAG GGA AGA GTT CCC CAG GGA C-3'

humanes IL-6:

Forward Primer: 5'-CTG ACC CAA CCA CAA ATG CC-3'

Reverse Primer: 5'-CAT GTC CTG CAG CCA CTG G-3'

Sonde: 5'-CTG TGC CTG CAG CTT CGT CAG CA-3'

humanes IL-10:

Forward Primer: 5'-AGG GCA CCC AGT CTG AGA ACA-3'

Reverse Primer: 5'-GCT GAA GGC ATC TCG GAG ATC-3'

Sonde: 5'-CCA CTT CCC AGG CAA CCT GCC TAA C-3'

humanes IFN- γ :

Forward Primer:	5'-TGA ATG TCC AAC GCA AAG CA-3'
Reverse Primer:	5'-CCT TGA AAC AGC ATC TGA CTC CTT-3'
Sonde:	5'-TGG CGA CAG TTC AGC CAT CAC TTG GA-3'

cDNA

TaqMan Standards für

humanes β -Actin:	Vektor: pCR-Script-Amp SK (+), Insertgröße 1117bp
humanes TNF- α :	Vektor: pCR-Script-Amp SK (+), Insertgröße 743bp
humanes IL-6:	Vektor: pCR-2.1-TOPO, Insertgröße 549bp
humanes IL-10:	Vektor: pCR-Script-Amp SK (+), Insertgröße 567bp
humanes IFN- γ	Vektor: pCR-Script-Amp SK (+), Insertgröße 529bp

2.1.11 Sterilisation der Chemikalien und Geräte

Hitzebeständige Lösungen und Glaswaren wurden bei 120°C und 2 bar für 30 min autoklaviert. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden durch Filter mit einer Porengröße von 0,2 μ m sterilisiert.

2.1.12 Stammlösungen und ~puffer

Coating buffer	0,1 M Natriumcarbonat/Natriumbicarbonat, pH 9,6, Lagerung bei 4°C für maximal 4 Wochen
PBS (1 x)	8,0 g NaCl 1,44 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 0,192 g KH ₂ PO ₄ 0,2 g KCL ad 1L ddH ₂ O, pH 7,5
Stop Solution	2N Schwefelsäure
DEPC-Wasser	0,1 % DEPC in ddH ₂ O, autoklaviert
Milchpulver (0,5%)	5 g Milchpulver ad 1L PBS
Waschpuffer	50 μ l Tween 20 ad 1 L PBS
RPMI 1640 mit 5% Humanserum	5 ml hitzeinaktiviertes Humanserum (Inaktivierung bei 56°C für 30 min) ad 100 ml RPMI 1640
Probenpuffer ELISA	10%iges FCS-PBS: 10 ml FCS + 90 ml PBS

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Isolierung von PBMC aus Vollblut

Blutentnahme

Für jedes Experiment wurde gesunden Probanden periphervenös Blut mit dem Vacutainer-Blutabnahmesystem in Natrium-Heparinat-beschichtete Blutentnahmeröhrchen abgenommen. Alle weiteren Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank bei Raumtemperatur mit vorgewärmten Lösungen durchgeführt.

Isolierung von PBMC durch Dichtegradientenzentrifugation

Die Isolation von mononukleären Zellen durch die Zentrifugation von Vollblut über eine Lösung aus Ficoll und Natrium-Diatrizoat wurde erstmals von Böyum et al. 1970 beschrieben¹³⁷. Durch die Ficoll-Trennlösung werden die Blutzellen sowohl nach ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit als auch nach ihrer spezifischen Dichte aufgetrennt, wobei sich folgende Fraktionen unterscheiden lassen: Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten und PBMC („peripheral blood mononuclear cells“, im wesentlichen bestehend aus Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen).

10 ml Vollblut wurden in einem 50 ml Falcon-Röhrchen mit 25 ml HBSS-Salzlösung verdünnt und vorsichtig mit 13 ml Ficoll-Trennlösung unterschichtet. Nach einer Zentrifugationszeit von 20 min bei 800g ohne Bremse zeigen sich vier Phasen im Falcon-Röhrchen: das Sediment aus Erythrozyten, darüber eine Schicht aus Ficoll mit Granulozyten, auf der Ficoll-Lösung die schmale Interphase der PBMC und darüber der Überstand aus Plasma, HBSS-Salzlösung und Thrombozyten.

Die Interphase mit PBMCs wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein neues 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Für die folgenden beiden Waschschrte zum Auswaschen des zelltoxischen Ficoll wurde das Pellet mit jeweils 15 ml HBSS-Salzlösung aufgefüllt und beim ersten Mal 10 min bei 675g, beim zweiten 10 min bei 400g mit maximaler Bremse zentrifugiert. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet in 1 ml RPMI mit 5% Humanserum resuspendiert. Bei der Abnahme von mehr als 10 ml Blut pro Proband wurden die Zellpellets nach dem ersten Waschschrte vereinigt und in einem entsprechend höheren Volumen aus Zellkulturmedium resuspendiert.

Die Zellzählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer nach Anfärbung mit Türks-Lösung zur Darstellung und Zählung der Leukozyten und mit Trypanblau-Färbung zur Darstellung der toten Zellen, die aufgrund ihrer gestörten Membranintegrität den Farbstoff nicht aktiv ausschließen können und sich blau anfärben. Es wurden in zwei Großquadraten jeweils die Gesamtzahl der Leukozyten und Anzahl der toten Zellen ausgezählt und der Mittelwert ge-

bildet. Da sich bei der Anfärbung mit Türks-Lösung die toten Zellen nicht von den lebenden Zellen unterscheiden, wurde durch Subtraktion der Anzahl der toten Zellen von der Gesamtzahl der Zellen die Anzahl der vitalen Zellen pro ml errechnet. Diese Zahl wurde den weiteren Berechnungen zu Grunde gelegt. Die Vitalität wurde als Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtzahl der Zellen berechnet und betrug immer mehr als 90%.

2.2.1.2 Stimulation von PBMC

Die Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml in Zellkulturmedium (RPMI + 5% Humanserum) in einer 48 Well Zellkulturplatte inkubiert. Dabei wurden als Negativkontrolle die PBMC jedes Spenders in 450 μ l einzeln ausgesät, während für die Stimulation durch allogene Zellen (Mixed lymphocyte culture; MLC) die PBMC von beiden Spendern in gleicher Zellzahl ($0,5 \times 10^6$ Zellen) und gleichem Volumen (225 μ l) gemischt wurden. Anschließend wurden weitere Stimuli (LPS, Polymyxin B, rekombinante Zytokine, neutralisierende Antikörper oder Medikamente unterschiedlicher Konzentrationen; s. Ergebnisteil) oder RPMI für die unstimulierte Kultur in einem Volumen von 50 μ l zugegeben und die Zellen unter gleichen Kulturbedingungen für unterschiedliche Zeiträume ohne Mediumwechsel bei 37°C, 5% Kohlendioxidgehalt und Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre in einem Brutschrank inkubiert. Für jeden Stimulationsansatz wurden Triplikate parallel ange-setzt.

Nach der festgelegten Inkubationszeit wurden die Überstände der Triplikate getrennt abgenommen, bei 3000g für 3 Minuten zentrifugiert, aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Die Vitalität der resuspendierten Zellen wurde mittels Trypanblau bestimmt und war während der gesamten Inkubationszeit von 5 Tagen größer als 90%. Zusätzlich wurde die Zellkulturplatte unter dem Mikroskop auf adhärente Zellen kontrolliert, wobei sich typischerweise über 3-5 Tage Inkubation ein Zellrasen aus adhären Zellen bildete, der ca. 50-70% des Bodens bedeckte.

2.2.1.3 Proliferations-Assay mit radioaktiv markiertem ^3H -Thymidin

Die DNA muss bei jeder Zellteilung dupliziert werden. Durch die Zugabe von radioaktiv markierten Thymidin wird dieses zu gleichen Teilen wie das unmarkierte Thymidin in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Damit ist die Höhe der radioaktiven Aktivität der extrahierten DNA der Zellen direkt proportional zur Proliferationsrate der Zellen, da umso mehr radioaktives Thymidin in die DNA eingebaut wird, je stärker die Zellteilungsrate und damit die DNA-Replikation ist. Zur Messung werden die Zellen auf eine spezielle Glasfasermembran übertragen und anschließend lysiert, so dass nur die DNA auf der Membran zurückbleibt. Nach mehreren Waschschritten zur Entfernung des nicht eingebauten radioaktiv markierten Thymidins wird die Szintillationslösung zugegeben. Die beim Zerfall des Tritiumions entstehende

β -Strahlung regt die fluorogene Substanz der Lösung an. Die Anzahl der Fluoreszenzimpulse pro Vertiefung wird dann in einem Szintillationszähler bestimmt.

Die Zellen wurden in 6 parallelen Ansätzen mit einer Dichte von 150.000 Zellen in 150 μ l Medium in 96 Well Rundbodenplatten für 5 Tage unter den oben beschriebenen Bedingungen inkubiert. Zusätzlich wurden zur Bestimmung des Hintergrundes 24 Vertiefungen mit PBS parallel angesetzt. Dann wurde 1 μ Ci/Vertiefung radioaktiv markiertes 3 H-methyl-Thymidin in 50 μ l Medium zu den Zellen gegeben und für weitere 18 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels eines Multiwell-Zellsammlers aspiriert, lysiert und die DNA auf Glasfasermembranen (GF/C, Canberra Packard) übertragen. Ungebundenes Thymidin wurde durch sechs Waschschriffe mit PBS entfernt. Nach dem Trocknen der Filter wurde Szintillationslösung zugegeben und die Fluoreszenzsignale mit dem TopCount 100 Szintillationszähler gemessen. Der Mittelwert der PBS-Proben wurde als Hintergrund vom Mittelwert aller anderen Proben abgezogen.

2.2.2 ELISA

Die verwendete Meßmethode basiert auf dem so genannten „Sandwich-ELISA“ („Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay“) zur Konzentrationsbestimmung eines löslichen Analyten. Dabei ist der ELISA wie ein Sandwich schichtweise aufgebaut: Die erste Schicht bildet der analyt-spezifische primäre Antikörper, der an die Plastikoberfläche der Vertiefungen der ELISA-Platte gebunden wird. Die restlichen unbesetzten Bindungsstellen werden durch das Blocken mit einer Proteinlösung besetzt, um eine unspezifische Bindung des Analyten sowie des Sekundärantikörpers und Enzymkonjugats zu verhindern. Im zweiten Schritt kann der Analyt an den primären Antikörper binden, im dritten ein zweiter spezifischer Antikörper, an den kovalent Biotin gekoppelt ist. An dieses Biotinmolekül kann als vierte Schicht ein Streptavidin-Enzymkomplex binden, der ein geeignetes chromogenes Substrat (z.B. TMB) zu einem Farbstoff umsetzt. Da die Menge des gebundenen zweiten Antikörpers und damit des Enzymkomplexes direkt proportional der Menge des gebundenen Analyten ist, führt eine höhere Konzentration des Analyten zur schnelleren Bildung des Farbstoffes. Diese Bildungskinetik verläuft bis zu einem Endpunkt linear und kann durch die Zugabe einer die Enzymreaktion beendenden Lösung (z.B. Schwefelsäure) während des linearen Kurvenverlaufs konserviert werden. Die quantitative Messung des Farbstoffes erfolgt photometrisch; anhand einer aus der Standardreihe mit definierten Konzentrationen des Analyten errechneten Eichkurve kann so die Konzentration in der Probe bestimmt werden.

Generelles Protokoll für Zytokin-ELISA

1. Beschichtung mit primärem Antikörper

Der gegen das jeweilige Zytokin gerichtete spezifische Antikörper wurde in definierter Konzentration in einem speziellen Puffer aus einer aliquotierten Stocklösung verdünnt.

Die Inkubation der ELISA-Platte (Nunc MaxiSorp Immuno-Plates) erfolgte abgedeckt mit Klebefolie über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Ungebundener Antikörper wurde nach der Inkubationszeit durch viermaliges Waschen mit PBS entfernt.

2. Blocken

Zur Verhinderung der unspezifischen Bindungen des Zytokins, des zweiten Antikörpers oder des Enzymkonjugats wurde anschließend für 1 Stunde mit 200 µl des Probenpuffer (PBS mit einem 10%igen Anteil aus fötalem Kälberserum (FCS)) geblockt. Überschüssige Proteinlösung wurde durch Waschen mit Waschpuffer entfernt.

3. Auftragen von Proben und Standard

Zur Herstellung einer Standardreihe wurde ein Aliquot der Stocklösung aus rekombinantem humanem Zytokin in Probenpuffer seriell mit je nach Zytokin unterschiedlichen Konzentrationen verdünnt. Die Standardreihe und die Proben wurden in die Vertiefungen pipettiert und die ELISA-Platte mit Folie abgedeckt über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Durch die anschließenden vier Waschschrte mit Waschpuffer wurde ungebundenes Zytokin entfernt.

4. Sekundärer Antikörper

Der sekundäre, biotinylierte Detektionsantikörper wurde aus einer Stockkonzentration mit Probenpuffer verdünnt und auf die ELISA-Platte aufgetragen. Nach der Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wurde ungebundener Antikörper durch Waschen mit PBS entfernt.

5. Bindung des Streptavidin-Peroxidase-Konjugat

Das Streptavidin-Peroxidase-Konjugat wurde in Probenpuffer oder in 0,5%iger Milchpulverlösung verdünnt und in die Vertiefungen pipettiert. Die Inkubation erfolgte 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler, anschließend wurden sechs Waschschrte durchgeführt.

6. Farbreaktion

Mit der Zugabe des chromogenen Substrats (TMB) wurde die Umsetzung in einen blauen Farbstoff durch die enzymatische Aktivität der Peroxidase gestartet. Diese Reaktion wurde spätestens nach 30 Minuten durch die Zugabe von 2N Schwefelsäure gestoppt, der Farbstoff nahm daraufhin eine gelbe Farbe an.

7. Photometrische Messung

Die photometrische Messung der ELISA-Platte erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm in einem Microplate Reader. Anhand der mitgeführten Standardkurve wurde durch Log-Log-Interpolation mit der SOFTmax-Software die Konzentration des Zytokins in der Probe unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors berechnet. Jede Probe wurde als Doppelbestimmung gemessen und der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet. Die Standardabweichung der Doppelbestimmungen lag im Mittel unter 10%. Die

errechneten Mittelwerte der Zytokinkonzentrationen wurden allen weiteren Berechnungen zu Grunde gelegt.

ELISA für IFN- γ

Detektionsgrenze: 6 pg/ml

1. Primärer Antikörper

Der primäre Antikörper (Endogen, Kat.-Nr.: M-700A-E) wurde 1:1000 auf eine Endkonzentration von 1,12 $\mu\text{g/ml}$ in Coating buffer verdünnt. Es wurden jeweils 100 μl in jede Vertiefung pipettiert.

2. Blocken

Die Platten wurden mit 200 μl Probenpuffer pro Vertiefung geblockt.

3. Auftragen von Standard und Proben

Die Standardreihe umfasste den Bereich von 2000 – 31,25 pg/ml. Es wurden jeweils 100 μl Standard oder Probe in eine Vertiefung pipettiert

4. Sekundärer Antikörper

Der sekundäre Antikörper (Endogen, Kat.-Nr.: M-701-B) wurde in Probenpuffer aus der Stocklösung 1:2000 auf eine Endkonzentration von 0,25 mg/ml verdünnt und 100 μl der Lösung in jede Vertiefung pipettiert.

5. Bindung des Streptavidin-Enzymkomplexes

Der HRP-Streptavidin-Enzymkomplex wurde in PBS mit 0,5% Milchpulver aus der Stocklösung 1:2000 auf eine Endkonzentration von 0,6 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt und 100 μl pro Vertiefung pipettiert.

6. Farbreaktion

Es wurden 100 μl kalte TMB-Substratlösung in jede Vertiefung pipettiert und die Farbreaktion durch die Zugabe von 100 μl 2N Schwefelsäure gestoppt.

ELISA für IL-6

Detektionsgrenze: 0,2 pg/ml

1. Primärer Antikörper

Der primäre Antikörper (PeliKine compact ELISA kit, Kat.-Nr.: M1916) wurde 1:100 in Coating buffer verdünnt. Es wurden jeweils 50 μl in jede Vertiefung pipettiert.

2. Blocken

Die Platten wurden mit 200 μl 10% FCS-PBS pro Vertiefung geblockt.

3. Auftragen von Standard und Proben

Die Standardreihe umfasste den Bereich von 300 – 4,69 pg/ml. Standard und Proben wurden im Assay Diluent des ELISA-Kits verdünnt und jeweils 50 μl Standard oder Probe in eine Vertiefung pipettiert.

4. Sekundärer Antikörper

Der sekundäre Antikörper (PeliKine compact ELISA kit, Kat.-Nr.: M1916) wurde in Assay Diluent aus der Stocklösung 1:200 verdünnt und 50 µl der Lösung in jede Vertiefung pipettiert.

5. Bindung des Streptavidin-Enzymkomplexes

Der HRP-Streptavidin-Enzymkomplex des ELISA-Kit wurde in Assay Diluent aus der Stocklösung 1:10.000 verdünnt und 50 µl pro Vertiefung pipettiert.

6. Farbreaktion

Es wurden 50 µl kalte TMB-Substratlösung in jede Vertiefung pipettiert und die Farbreaktion durch die Zugabe von 50 µl 2N Schwefelsäure gestoppt.

ELISA für IL-10

Detektionsgrenze: 0,4 pg/ml

1. Primärer Antikörper

Der primäre Antikörper (Becton Dickinson, Kat.-Nr.: 554705) wurde 1:1000 auf eine Endkonzentration von 1 µg/ml in Coating buffer verdünnt. Es wurden jeweils 100 µl in jede Vertiefung pipettiert.

2. Blocken

Die Platten wurden mit 200 µl Probenpuffer pro Vertiefung geblockt.

3. Auftragen von Standard und Proben

Die Standardreihe umfasste den Bereich von 500 – 2,05 pg/ml. Es wurden jeweils 100 µl Standard oder Probe in eine Vertiefung pipettiert

4. Sekundärer Antikörper

Der sekundäre Antikörper (Becton Dickinson, Kat.-Nr.: 554499) wurde in Probenpuffer aus der Stocklösung 1:2000 auf eine Endkonzentration von 0,25 mg/ml verdünnt und 100 µl der Lösung in jede Vertiefung pipettiert.

5. Bindung des Streptavidin-Enzymkomplexes

Der HRP-Streptavidin-Enzymkomplex wurde in PBS mit 0,5% Milchpulver aus der Stocklösung 1:4000 auf eine Endkonzentration von 0,3 µg/ml verdünnt und 100 µl pro Vertiefung pipettiert.

6. Farbreaktion

Es wurden 100 µl kalte TMB-Substratlösung in jede Vertiefung pipettiert und die Farbreaktion durch die Zugabe von 100 µl 2N Schwefelsäure gestoppt.

ELISA für TNF-α

Detektionsgrenze: 3 pg/ml

1. Primärer Antikörper

Der primäre Antikörper (Becton Dickinson, Kat.-Nr.: 551220) wurde 1:1000 auf eine Endkonzentration von 1 µg/ml in Coating buffer verdünnt. Es wurden jeweils 100 µl in jede Vertiefung pipettiert.

2. Blocken

Die Platten wurden mit 200 µl Probenpuffer pro Vertiefung geblockt.

3. Auftragen von Standard und Proben

Die Standardreihe umfasste den Bereich von 500 – 7,8 pg/ml. Es wurden jeweils 100 µl Standard oder Probe in eine Vertiefung pipettiert

4. Sekundärer Antikörper

Der sekundäre Antikörper (Becton Dickinson, Kat.-Nr.: 554511) wurde in Probenpuffer aus der Stocklösung 1:2000 auf eine Endkonzentration von 0,25 mg/ml verdünnt und 100 µl der Lösung in jede Vertiefung pipettiert.

5. Bindung des Streptavidin-Enzymkomplexes

Der HRP-Streptavidin-Enzymkomplex wurde in PBS mit 0,5% Milchpulver aus der Stocklösung 1:4000 auf eine Endkonzentration von 0,3 µg/ml verdünnt und 100 µl pro Vertiefung pipettiert.

6. Farbreaktion

Es wurden 100 µl kalte TMB-Substratlösung in jede Vertiefung pipettiert und die Farbreaktion durch die Zugabe von 100 µl 2N Schwefelsäure gestoppt.

2.2.3 Nachweis von Zytokin-mRNA

Vor Beginn der Arbeiten wurde der Arbeitsplatz mit 70%igem Alkohol gereinigt, alle Arbeiten wurden mit sauberen Einmalhandschuhen ausgeführt. Es wurden ausschließlich RNase freie, autoklavierte Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße zur Vermeidung von Kontamination mit unspezifischer mRNA und Ribonukleasen (RNasen) benutzt. Das verwendete destillierte Wasser wurde zur Inhibierung von RNasen mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt und anschließend autoklaviert.

2.2.3.1 RNA-Isolation aus der Zellkultur

RNA-Stabilisierung

Die Zellen wurden resuspendiert und der Kulturüberstand in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert. Zu den verbleibenden adhären Zellen wurden 400 µl des RNA-Stabilisierungspuffers (Qiagen, PAXgene Blood RNA kit) hinzugegeben und beides einige Minuten zur vollständigen Lysierung der Zellen stehen gelassen. Dann wurde mehrmals resuspendiert und die Zellen der jeweiligen Triplikate in einem 12 ml-Rundbodenröhrchen (Greiner) vereinigt. Der resuspendierte Zellkulturüberstand im Eppendorf-Gefäß wurde bei 3000g für 3 Minuten zentrifugiert, aliquotiert und zur weiteren Analyse durch ELISA eingefroren. Das verbleibende Zellpellet wurde resuspendiert und in das entsprechende Röhrchen mit RNA-Stabilisierungs-

puffer pipettiert (Abb. 3). Die Rundbodenröhrchen wurden für weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur zur vollständigen Lyse und zur Stabilisierung der RNA stehen gelassen und danach bei -20°C eingefroren.

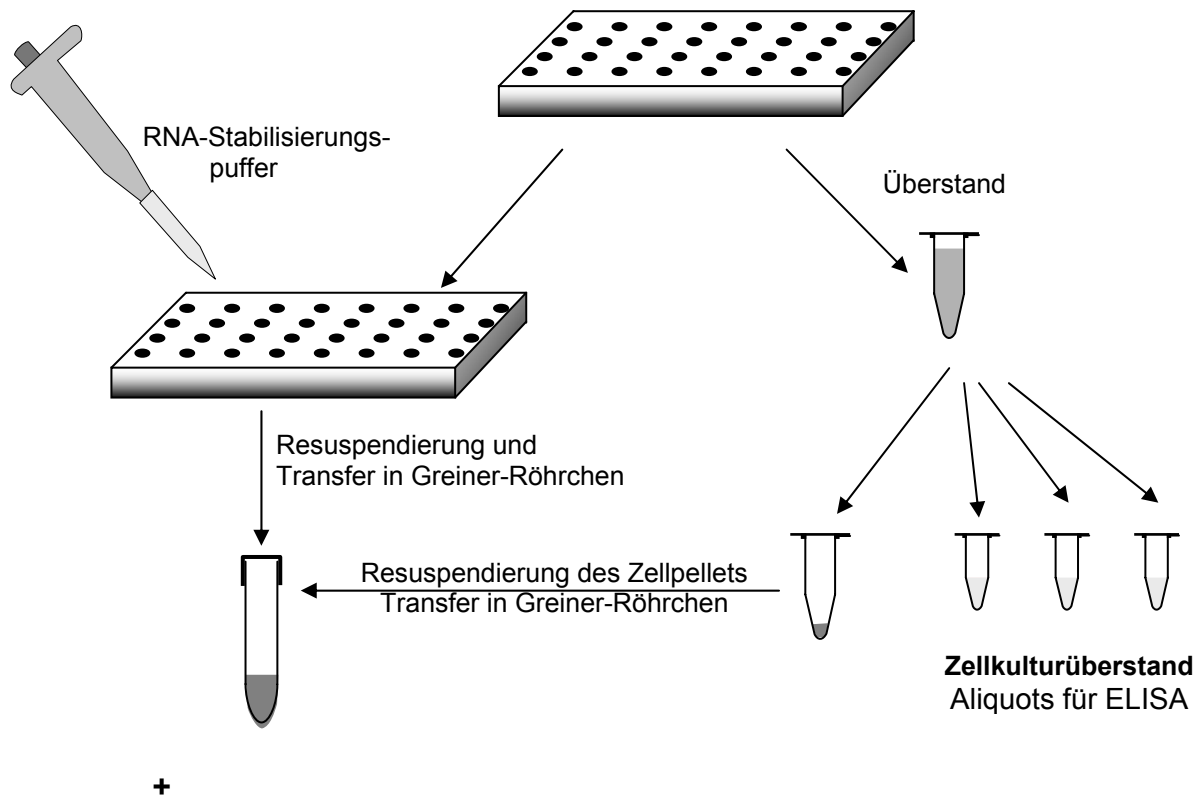


Abb. 3 RNA-Stabilisierung der kultivierten Zellen. Einzelheiten s. Abschnitt 2.2.3.1: RNA-Isolation aus der Zellkultur: RNA-Stabilisation.

RNA-Isolation

Die eingefrorenen Rundbodenröhrchen wurden über Nacht bei 4°C langsam aufgetaut. Die folgende Beschreibung bezieht sich jeweils auf die Isolation der RNA aus einem Rundbodenröhrchen von mit dem PAXgene Blood RNA kit (Kat.-Nr.: 762134) stabilisierter RNA aus ca. 3-5 Mio. PBMC.

1. Waschen der stabilisierten RNA

Zunächst wurde nach intensiven Vortexen der Stabilisierungspuffer bei $5000g$ für 10 Minuten in einer Zentrifuge mit freischwingendem Rotor (Beckmann-Zentrifuge Allegra 21R) abzentrifugiert und verworfen. Zum Waschen wurde das RNA-Pellet in 5 ml DEPC-Wasser aufgenommen, gründlich gevortext und bei $5000g$ für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen.

2. Proteinase K-Inkubation

Das Pellet wurde in 360 µl Puffer BR1 aufgenommen, gevortext und in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Es wurden 300 µl Puffer BR2 und 40 µl Proteinase K mit einer Konzentration von 18 mg/ml zugegeben, die Mischung gut gevortext und in einem Schüttelinkubator bei 35°C für 10 Minuten bei 14 rpm zum Verdau der Proteine inkubiert. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurde das Eppendorf-Gefäß bei 10.000g für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand mit der RNA wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt, mit 350 µl 100%igem Ethanol vermischt und kurz abzentrifugiert.

3. Bindung der RNA an die Säulenmembran

Zur Bindung der RNA an die Membran der Säule wurden 700 µl der Probe auf die Säule gegeben, und diese dann bei 8000g für 1 Minute zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die restlichen 350 µl der Probe auf die Säule pipettiert. Es wurde nochmals zentrifugiert und das Eluat verworfen. Anschließend wurde die Säule gewaschen, dazu wurden 350 µl Puffer BR3 auf die Säule pipettiert, zentrifugiert und das Eluat verworfen.

4. DNA-Verdau

Zum Verdau noch vorhandener DNA auf der Säulenmembran wurde ein DNase-Mix bestehend aus 10 µl DNase I (2,7 Kunitz units/µl) und 70 µl RDD-Puffer angesetzt und auf die Membran der Säule pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde der DNase-Mix und die DNA-Fragmente mit 350 µl Puffer BR3 durch Zentrifugation bei 8000g für 1 Minute von der Säule gewaschen. Es folgten zwei weitere Waschschriffe mit 500 µl Puffer BR4. Beim ersten Waschschriff wurde mit 8000g, beim zweiten mit 10.000g zentrifugiert, zum Ende der zweiten Zentrifugation war die Membran der Säule trocken.

5. Elution der RNA

Die Säule wurde auf ein frisches Eppendorf-Gefäß gesetzt, 40 µl Puffer BR5 auf die Säule gegeben und bei 8000g für 1 Minute zentrifugiert. Zur vollständigen Elution der RNA wurden weitere 40 µl Puffer BR5 auf die Säule gegeben und die Zentrifugation wiederholt.

6. Denaturierung von Enzymen

Zur Denaturierung verbliebener Enzyme wurde das Eluat für 5 Minuten in einem Heizblock bei 65°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gesetzt. 25 µl des Eluats wurden für die photometrische Bestimmung aliquotiert, der Rest wurde bei -80°C eingefroren.

7. Photometrische Messung der RNA-Menge und RNA-Reinheit

Zur photometrischen Bestimmung der Menge und Reinheit der RNA wurden 25 µl des Eluats 1:2 mit 10 mM TRIS-Puffer (pH 7,5) gemischt und im Beckmann DU650 Spectrometer gegen den Leerwert aus 10 mM TRIS-Puffer gemessen. Es wurde die Absorption der Probe bei 260 und 280 nm bestimmt. Nukleinsäuren haben bei 260 und 280 nm ein Absorptionsmaximum mit einem Verhältnis von 2:1, Proteine absorbieren dagegen nur im

Bereich von 280 nm. Daraus ergibt sich, dass bei Verunreinigungen durch Proteine die Ratio 260/280 nm unter 2 liegt. Es wurde eine Reinheit der RNA von $> 1,8$ als ausreichend akzeptiert. Die Menge der isolierten RNA lag zwischen 0,9 und 3,2 μg pro 3-5 Mio. PBMC.

2.2.3.2 Reverse Transkription

Zur weiteren Analyse der RNA mittels PCR-Techniken ist ein Umschreiben der RNA in komplementäre DNA (cDNA) notwendig. Da allein die messenger-RNA (mRNA) von besonderem Interesse ist, die Isolation aber unspezifisch auch ribosomale und Transfer-RNA aufreinholt, wurde bei der reversen Transkription (RT) nur die mRNA in cDNA umgeschrieben, indem ein oligo-dT Primer eingesetzt wurde, der nur an den Poly-A Schwanz der mRNA bindet. Das Enzym Reverse Transkriptase ist durch drei Aktivitäten gekennzeichnet: eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, eine Hybrid-abhängige Exoribonuklease und eine DNA-abhängige DNA-Polymerase. Für den in vitro-Gebrauch sind die ersten beiden Aktivitäten für die Generierung von cDNA entscheidend: Durch die RNA-abhängige Polymerase wird eine zur mRNA-Vorlage komplementäre DNA erstellt, die Exoribonuklease degradiert ausschließlich die als RNA:DNA-Hybrid vorliegende RNA, nicht aber die freie RNA. So wird ein Abbild des RNA-Gehaltes der Probe als cDNA erzeugt, wobei doppeltes Umschreiben des gleichen RNA-Stranges vermieden wird.

Protokoll der Reversen Transkription

Für die RT wurde eine RNA-Menge von 400 ng eingesetzt und die Proben dementsprechend mit DEPC-Wasser verdünnt. Für die Präparation des MasterMix wurden die Komponenten des Omniscript RT Kit verwendet. Der MasterMix für einen RT-Ansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

4 μl	10fach Puffer RT
4 μl	dNTP-Mix (Endkonzentration 0,5 mM/dNTP)
0,4 μl	oligo-dT Primer (Endkonzentration 1 μM)
2 μl	RNase-Inhibitor (Endkonzentration 0,5 U/ μl)
3,6 μl	DEPC-Wasser
2 μl	Omniscript Reverse Transkriptase (Endkonzentration 0,2 U/ μl)
<u>20 μl</u>	<u>RNA-Probe (entspricht 400 ng RNA)</u>
40 μl	

Die gesamte Mischung wurde kurz gevortext und abzentrifugiert und dann in einem PCR-Gerät (GeneAmp PCR System 9700 von Applied Biosystems) unter folgenden Bedingungen inkubiert: 60 min bei 37°C für die reverse Transkription, 5 min bei 95°C zur Inaktivierung der

Enzyme, anschließend sofortige Kühlung auf 4°C. Die cDNA wurde anschließend in 6 Aliquots mit jeweils 6,2 µl für die weitere Analyse mittels quantitativer PCR verteilt und bei -20°C eingefroren.

2.2.3.3 Quantitative RealTime PCR (TaqMan PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde Mitte der 1980er Jahre entwickelt und ermöglicht die selektive in vitro Amplifikation spezieller DNA-Regionen, wobei die in vivo DNA-Replikation nachgeahmt wird¹³⁸. Diese Technik ermöglicht über die Kombination mit der reversen Transkription den Nachweis von gering exprimierten mRNAs aus gemischten Zellpopulationen. Voraussetzung für die Amplifikation ist die Auswahl von spezifischen Primern, die die zu amplifizierende Region auf der cDNA flankieren (Sense und Antisense Primer) und sich an die cDNA anlagern können (Annealing). An den Primern kann die DNA-Polymerase ansetzen und durch Einbau von komplementären Nukleotiden die gebundenen Primer verlängern, wodurch ein vollständiger neuer cDNA-Strang synthetisiert wird (Elongation). Durch Erhitzen auf 95°C werden Matrizenstrang und neu synthetisierter DNA-Strang getrennt (Denaturierung) und stehen für eine erneute Polymerisation als Matrize zur Verfügung. Diesen Ablauf bezeichnet man als einen Zyklus der PCR. Dabei steigt die Menge der amplifizierten DNA im Verlauf exponentiell an und erreicht nach ca. 40 Zyklen ein Sättigungsplateau, da die zunehmende Produktmenge mit den Primern um die Anlagerung an die Matrize konkurriert.

Die Besonderheit der TaqMan PCR besteht im gleichzeitigen quantitativen Nachweis des PCR-Produktes schon im Reaktionsgefäß. Dazu wird zusätzlich zu den beiden Primern ein weiteres Oligonukleotid, die so genannte Sonde, eingesetzt, deren komplementäre Sequenz zwischen Sense und Antisense Primer liegt. Um ein Binden der Taq-Polymerase an die Sonde zu verhindern, wurde das 3'-Ende durch OH-Phosphorylierung blockiert. An die Sonde selbst sind zwei Farbstoffmoleküle kovalent gebunden: am 5'-Ende ein fluoreszierendes Farbstoffmolekül (6-Carboxy-Fluorescein, „FAM“), der Reporter, am 3'-Ende der Farbstoff 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin (TAMRA), der Quencher. Nach Anregung durch Licht der Wellenlänge 488 nm emittiert der Reporter Licht, das vom Quencher durch dessen räumliche Nähe absorbiert wird und diesen zur Freisetzung von Licht der Wellenlänge 582 nm angeregt. Erreicht die Taq-Polymerase während der Elongationsphase die Sonde, wird durch die Verdrängung der Sonde und die Ausbildung einer Y-förmigen Struktur die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase aktiviert und die Sonde geschnitten. Dadurch werden Reporter und Quencher voneinander getrennt und der Reporter kann ungehindert nach Anregung Licht mit der Wellenlänge 518 nm emittieren. Somit steigt die Intensität emittierten Lichts der Wellenlänge 518 nm proportional zur Akkumulation des PCR-Produktes mit jedem weiteren Zyklus an, so dass durch Messung der Lichtemission das gesuchte PCR-Produkt direkt nachgewiesen werden kann. Zusätzlich kann eine quantitative Aussage getroffen wer-

den: Wenn eine große Menge der gesuchten cDNA Sequenz vorliegt, können viele Sonden und Primer gleichzeitig binden, es werden schon in den ersten Zyklen der PCR viele Reporter-moleküle freigesetzt, wodurch die Menge der emittierten Fluoreszenz früher ansteigt als in Proben mit nur kleinem Anteil der gesuchten Sequenz. Durch Mitführen eines Standards mit definierter Menge der gesuchten cDNA kann so eine Standardkurve erstellt und auf die Menge der cDNA bzw. der umgeschriebenen mRNA geschlossen werden¹³⁹.

Protokoll der TaqMan PCR

Die TaqMan PCR Analyse wurde für alle Proben in Triplikaten durchgeführt, wobei pro Reaktionsansatz 2 µl cDNA bei einem Gesamtvolumen der Reaktion von 50 µl eingesetzt wurden. Dabei waren die Reaktionsbedingungen für alle Zytokine: 2 min 50°C, 10 min 95°C, dann 40 Zyklen 15 s 95°C, 60 s 60°C und 120 s 25°C. Die Sammlung der Daten erfolgte alle 7s während der Elongationsphase. Es wurden 40 µl MasterMix für jeden Reaktionsansatz vorgelegt und die 1:5 mit DEPC-Wasser verdünnte cDNA (10 µl) hinzugefügt. Der MasterMix setzte sich je nach analysiertem Zytokin folgendermaßen zusammen:

β-Actin TaqMan PCR MasterMix: Amplikongröße 102 bp

Komponente	Volumen (µl)/	
	Reaktionsansatz	Endkonzentration
TaqMan Puffer A 10x	5	1x
MgCl ₂ (25 mM)	7	3,5 mM
dATP (10 mM)	1	200 µM
dCTP (10 mM)	1	200 µM
dGTP (10 mM)	1	200 µM
dUTP (20 mM)	1	400 µM
Sense-Primer (2 µM)	5	200 nM
Antisense-Primer (1 µM)	5	100 nM
Sonde (2 µM)	5	200 nM
AmpliTaqGold (5 U/µl)	0,25	1,25 U
DEPC-Wasser	8,75	
	40	

IFN- γ TaqMan PCR MasterMix: Amplikongröße 106 bp

Komponente	Volumen (μ l)	
	Reaktionsansatz	Endkonzentration
TaqMan Puffer A 10x	5	1x
MgCl ₂ (25 mM)	11	5,5 mM
dATP (10 mM)	1	200 μ M
dCTP (10 mM)	1	200 μ M
dGTP (10 mM)	1	200 μ M
dUTP (20 mM)	1	400 μ M
Sense-Primer (2 μ M)	5	100 nM
Antisense-Primer (1 μ M)	5	100 nM
Sonde (2 μ M)	5	100 nM
AmpliTaqGold (5 U/ μ l)	0,25	1,25 U
DEPC-Wasser	4,75	
	40	

TNF- α TaqMan PCR MasterMix: Amplikongröße 167 bp

Komponente	Volumen (μ l)	
	Reaktionsansatz	Endkonzentration
TaqMan Puffer A 10x	5	1x
MgCl ₂ (25 mM)	10	5 mM
dATP (10 mM)	1	200 μ M
dCTP (10 mM)	1	200 μ M
dGTP (10 mM)	1	200 μ M
dUTP (20 mM)	1	400 μ M
Sense-Primer (2 μ M)	5	100 nM
Antisense-Primer (1 μ M)	5	100 nM
Sonde (2 μ M)	5	100 nM
AmpliTaqGold (5 U/ μ l)	0,25	1,25 U
DEPC-Wasser	5,75	
	40	

IL-6 TaqMan PCR MasterMix: Amplikongröße 69 bp

Komponente	Volumen (μ l)	
	Reaktionsansatz	Endkonzentration
TaqMan Puffer A 10x	5	1x
MgCl ₂ (25 mM)	14	7 mM
dATP (10 mM)	1	200 μ M
dCTP (10 mM)	1	200 μ M
dGTP (10 mM)	1	200 μ M
dUTP (20 mM)	1	400 μ M
Sense-Primer (2 μ M)	5	200 nM
Antisense-Primer (1 μ M)	5	200 nM
Sonde (2 μ M)	5	100 nM
AmpliTaqGold (5 U/ μ l)	0,25	1,25 U
DEPC-Wasser	1,75	
	40	

IL-10 TaqMan PCR MasterMix: Amplikongröße 83 bp

Komponente	Volumen (μ l)	
	Reaktionsansatz	Endkonzentration
TaqMan Puffer A 10x	5	1x
MgCl ₂ (25 mM)	11	5,5 mM
dATP (10 mM)	1	200 μ M
dCTP (10 mM)	1	200 μ M
dGTP (10 mM)	1	200 μ M
dUTP (20 mM)	1	400 μ M
Sense-Primer (2 μ M)	5	100 nM
Antisense-Primer (1 μ M)	5	100 nM
Sonde (2 μ M)	5	100 nM
AmpliTaqGold (5 U/ μ l)	0,25	1,25 U
DEPC-Wasser	4,75	
	40	

TaqMan Standardreihen

Für die Erstellung der Standardreihen wurde linearisierte Plasmid-DNA verwendet. Zu deren Herstellung wurden Bakterienkulturen mit dem pCR-TOPO-Vektor oder dem pCR-Script-Vektor, in die das gewünschte cDNA-Fragment subkloniert worden war, transformiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mittels Plasmid-Mini-Prep isoliert und durch enzymati-

sche Restriktion linearisiert. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde photometrisch durch die Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt und anhand der Plasmidlänge und des Plasmidgewichts die Kopienzahl pro μl errechnet. Die Plasmid-DNA wurde auf eine Konzentration von 10^7 Kopien/ μl verdünnt und bei -20°C eingefroren. Für jede Standardreihe wurde die DNA mit Wasser in logarithmischen Schritten verdünnt und jeweils 10 μl pro Vertiefung zum MasterMix pipettiert, so dass die Standardreihe Kopienzahlen von 10^7 bis 10 Kopien pro Vertiefung umfasste. Jede Kopienzahl wurde als Triplikat angesetzt.

Berechnung der Kopienzahl

Zur Auswertung der Standardkurve wurde der Schwellenzyklus so gewählt, dass er 10 Standardabweichungen über der Basisfluoreszenzlinie lag. Dabei erreichte der Standard mit 10^7 Kopien in der Regel bei Zyklus 15 den Schwellenzyklus, die weiteren Standardverdünnungen dann jeweils ca. 3,3 Zyklen später. Aus diesen Werten wurde eine Standardkurve errechnet, anhand derer dann die Anzahl der Kopien in den einzelnen Proben berechnet wurden. Dabei wurde eine Standardabweichung von maximal 10% innerhalb der einzelnen Triplikate toleriert.

Relative Quantifizierung der TaqMan Analysen

Da Zellen je nach ihrem Aktivierungsgrad und Zeitpunkt im Zellzyklus unterschiedlich hohe Transkriptionsraten haben, wurde als Normalisierungsfaktor das House-keeping Gen β -Actin in jeder Probe bestimmt, das in der Zelle kontinuierlich exprimiert wird und nur abhängig vom Zellvolumen ist. Die Anzahl der Zytokinkopien wurde jeweils bezogen auf 10^4 β -Actin Kopien dargestellt.

2.2.4 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse der ELISA-Messungen wurden als Mittelwerte und Standardabweichung der Triplikate der Zellkultur dargestellt. Die mRNA-Analysen sind als Anzahl der Zytokinkopien/ 10^4 β -Actin Kopien dargestellt. Für die statistische Auswertung wurden die Mittelwerte mit dem zweiseitigen Student's t-Test für verbundene Stichproben verglichen. Bei Vergleich mehrerer Datensätze wurde das ANOVA-Testverfahren zusammen mit einem weiteren Test nach Dunnett oder Bonferroni angewandt. Für Daten, die nicht normalverteilt waren, wurde bei unverbundenen Stichproben der Mann-Whitney-Test, für verbundene Stichproben der Wilcoxon matched pairs Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgesetzt, d.h. der Unterschied zwischen einer bestimmten Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe wurde als signifikant bezeichnet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) weniger als 5% betrug.

3. Ergebnisse

Im Folgenden soll ein Screening-System für immunmodulatorische Substanzen beschrieben werden, das sich durch die Stimulation der natürlichen und adaptiven Immunität zur Analyse der natürlichen Interaktionen auszeichnet, wobei auf weitgehend physiologische Stimulationsbedingungen Wert gelegt wurde. Als Basis des Screening-Systems wurden periphere mononukleäre Blut-Zellen (PBMC) verwendet, die mittels Dichtegradientenzentrifugation aus humanem Vollblut isoliert wurden. PBMC enthalten alle dem Blut entstammenden Zellen der natürlichen (Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen und geringe Anteile dendritischer Zellen) und adaptiven (Lymphozyten) Immunität. Die adaptive Immunität wurde analog zu der von Perussia et al. beschriebenen „mixed lymphocyte culture“ (MLC)¹⁴⁰ durch allogene PBMCs stimuliert. Zusätzlich wurde die natürliche Immunität mit Lipopolysaccharid (LPS) aktiviert. Diese Modifikation der klassischen MLC durch die kombinierte Aktivierung der natürlichen und adaptiven Immunität wird im Folgenden als modified MLC (MMLC) bezeichnet¹⁴¹.

3.1 Wirkung von LPS auf die IFN- γ Produktion in der MMLC

Um die Interaktionen von natürlicher und adaptiver Immunität zu untersuchen, wurden die PBMC einerseits mit LPS zur Aktivierung der angeborenen Immunität und andererseits mit allogenen Zellen zur Induktion einer spezifischen Immunantwort behandelt. Beide Stimuli induzierten eine Immunantwort von T_H1-Typ, dessen Marker-Zytokin Interferon- γ (IFN- γ) in den Kulturüberständen analysiert wurde.

Die basale IFN- γ Sekretion in der unstimulierten PBMC-Kultur lag unter 0,1 ng/ml und stieg über die gesamte Inkubationszeit von fünf Tagen nicht an, während die allogene Aktivierung in Form der modifizierten mixed lymphocyte culture („MMLC“) zu einer Stimulation der IFN- γ Freisetzung führte, die bis zum fünften Tag kontinuierlich auf Konzentrationen von ca. 7 ng/ml anstieg (Tab. 1). Durch die Aktivierung der natürlichen Immunität durch 10 ng/ml LPS stieg die IFN- γ Sekretion in den PBMC ebenfalls stetig bis Tag 5 auf 22 ± 1 ng/ml an. Die kombinierte Aktivierung der natürlichen und adaptiven Immunität durch Stimulation der MMLC mit LPS (0,1 ng/ml) führte zu einer weiteren signifikanten Steigerung der durch die Einzelstimulation erreichten Zytokinspiegel ($p < 0,01$ im Vergleich zur nativen MMLC). Obwohl die MMLC nur mit 1/100stel der LPS-Konzentration stimuliert wurde, die bei Aktivierung der PBMC verwendet wurde, erreichten die IFN- γ Spiegel in der LPS-stimulierten MMLC mit 74 ± 2 ng/ml annähernd die dreifache Konzentration. Bei der Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der IFN- γ Produktion zeigte sich, dass die Freisetzungskinetik in der MMLC durch die Zugabe von LPS nicht verändert wurde. Die Behandlung mit LPS führte nur zu einer Verstärkung der IFN- γ Sekretion, aber nicht zu einer Verschiebung des Maximums, so dass für die weiteren Analysen eine Inkubationszeit von 4-5 Tagen ausgewählt wurde.

Zeitpunkt	(A) PBMC		(B) PBMC + PBMC (MMLC)	
	Unbehandelt	LPS	Unbehandelt	LPS
24 h	0,06 ± 0,02	4,16 ± 1,07 *	0,10 ± 0,02	1,01 ± 0,01 ***
48 h	0,02 ± 0,003	8,63 ± 0,05 ***	0,24 ± 0,03	4,51 ± 0,04 ***
72 h	0,02 ± 0,001	8,10 ± 0,03 ***	0,70 ± 0,03	19,78 ± 1,38 **
96 h	0,02 ± 0,000	15,92 ± 3,38 *	7,14 ± 3,93	46,92 ± 1,45 **
120 h	0,02 ± 0,002	22,47 ± 0,95 ***	6,38 ± 0,09	73,91 ± 2,13 ***

Tabelle 1. Zeitverlauf der IFN- γ Produktion (ng/ml) in PBMC und MMLC nach Stimulation mit LPS. PBMC wurden entweder mit LPS (10 ng/ml) oder allogenen Zellen (PBMC + PBMC, entspricht der MMLC aus Zellen von zwei nicht-verwandten Spendern) stimuliert. Zusätzlich wurde die MMLC mit LPS (0,1 ng/ml) inkubiert. Alle Kulturen wurden in Triplikaten inkubiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung eines repräsentativen Experiments von drei gezeigt und wurden mit dem zweiseitigen Student's t-test für verbundene Stichproben analysiert (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ im Vergleich zur korrespondierenden LPS-unbehandelten Kultur).

Eine Analyse in 23 MMLC und den korrespondierenden 46 PBMC an Tag 4 zeigte eine große Variationsbreite der IFN- γ Spiegel.

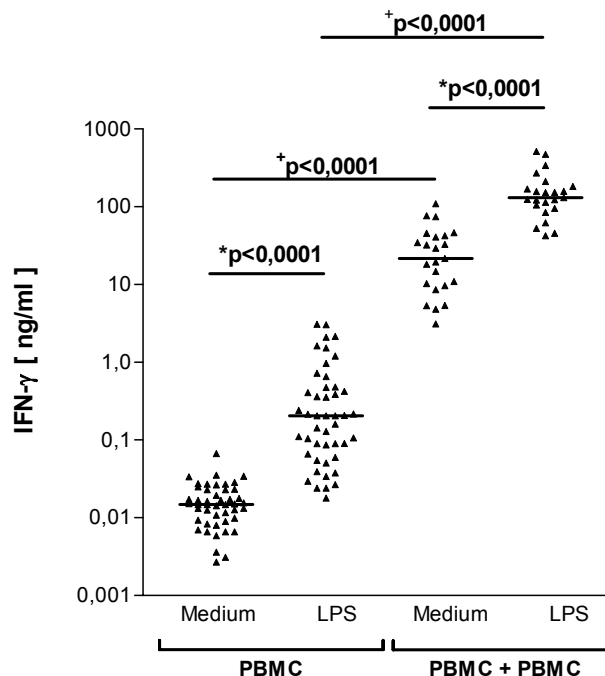


Abb. 4 IFN- γ Produktion in 23 MMLC und 46 PBMC ohne und mit LPS an Tag 4. PBMC oder MMLC wurden ohne und mit LPS (1 ng/ml) inkubiert und die Überstände nach 4 Tagen auf IFN- γ analysiert. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert des Triplikates von einem Kulturansatz, der waagerechte Balken gibt den Median jeder Gruppe an. Die Daten wurden mit dem Wilcoxon matched pairs Test (*) bzw. dem Mann-Whitney-Test (+) analysiert.

Die basalen Spiegel der unbehandelten PBMC lagen im Mittel bei $0,017 \pm 0,011$ ng/ml. Die LPS-Stimulation steigerte die IFN- γ Produktion auf $0,500 \pm 0,763$ ng/ml, wobei die Spanne der LPS-induzierten IFN- γ Spiegel mit $0,018 \pm 0,009$ bis $3,074 \pm 1,388$ ng/ml sehr groß war. (Abb. 4).

Wurden die in den PBMC erreichten IFN- γ Spiegel nach Spendern aufgeteilt, so konnte auch hier dieselbe breite Variation der IFN- γ Sekretion nach LPS-Stimulation beobachtet werden. Die IFN- γ Produktion der MLC schwankte ebenfalls stark ($3,1 \pm 0,6$ ng/ml bis $109,4 \pm 26,0$ ng/ml), hier konnte jedoch wie erwartet eine Abhängigkeit der Höhe der IFN- γ Spiegel von den Spenderkombinationen beobachtet werden. Es konnten zwei Gruppen von Spendern unterschieden werden. Spender der Gruppe 1 zeichneten sich durch hohe IFN- γ Spiegel in der LPS-unbehandelten MMLC aus, während Spender der Gruppe 2 weniger IFN- γ produzierten. Dabei war die IFN- γ Produktion in der Gruppe 1 signifikant höher als in der Gruppe 2 ($p < 0,01$; Abb. 5), während die MMLC aus Spendern beider Gruppen zwischen den Extremen lagen. Durch die zusätzliche Aktivierung mit LPS wurden diese Unterscheide wieder aufgehoben, die einzelnen Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

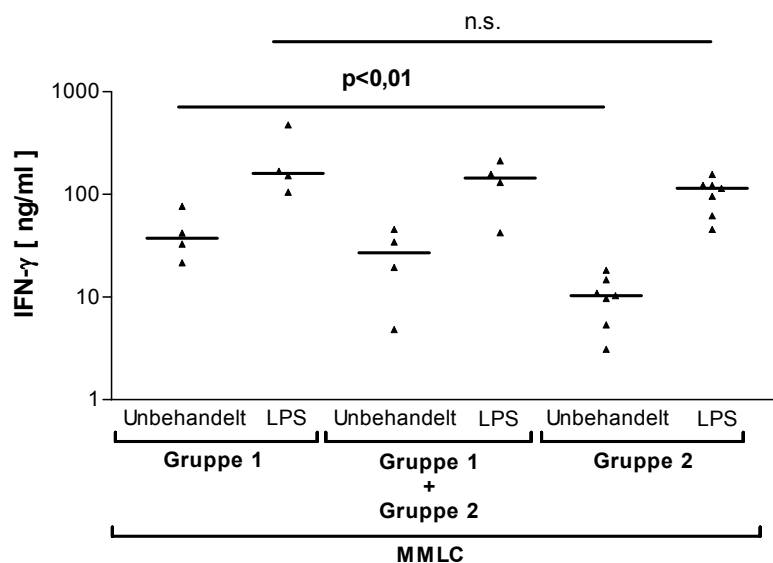


Abb. 5 IFN- γ Spiegel in der MMLC an Tag 4 nach Spendergruppen aufgeteilt. 15 MLC-Kulturen wurden ohne und mit LPS (1 ng/ml) über 4 Tage inkubiert und die Überstände auf IFN- γ analysiert. Dargestellt sind als Datenpunkte die Mittelwerte der Triplikate jeder Kultur und der Median der Gruppen als Balken. Die Gruppen setzen sich aus unterschiedlichen Spendern zusammen: Spender der Gruppe 1 mit hohen IFN- γ Spiegeln in der nativen MLC und Spender der Gruppe 2 mit niedrigen Spiegeln. Die Daten wurden mit dem Mann-Whitney-Test analysiert.

Wie schon beschrieben resultierte die Stimulation der MMLC durch LPS in einer weiteren Steigerung der IFN- γ Produktion von im Mittel $30,2 \pm 27,0$ ng/ml auf $168,6 \pm 123,8$ ng/ml,

wobei jedoch eine geringere Variationsbreite der Zytokinspiegel als in der nativen MLC und insbesondere in den LPS-behandelten PBMC zu beobachten war (Abb. 4).

Die Steigerung der IFN- γ Produktion der MMLC war spezifisch durch LPS bedingt, da die Vorinkubation mit Polymyxin B (PmB), einem selektiven LPS-Inhibitor, die zusätzliche IFN- γ Freisetzung vollständig blockieren konnte (Abb.6). Die Zugabe von PmB allein hatte keinen Einfluss auf die IFN- γ Sekretion während der gesamten Inkubationszeit von 5 Tagen.

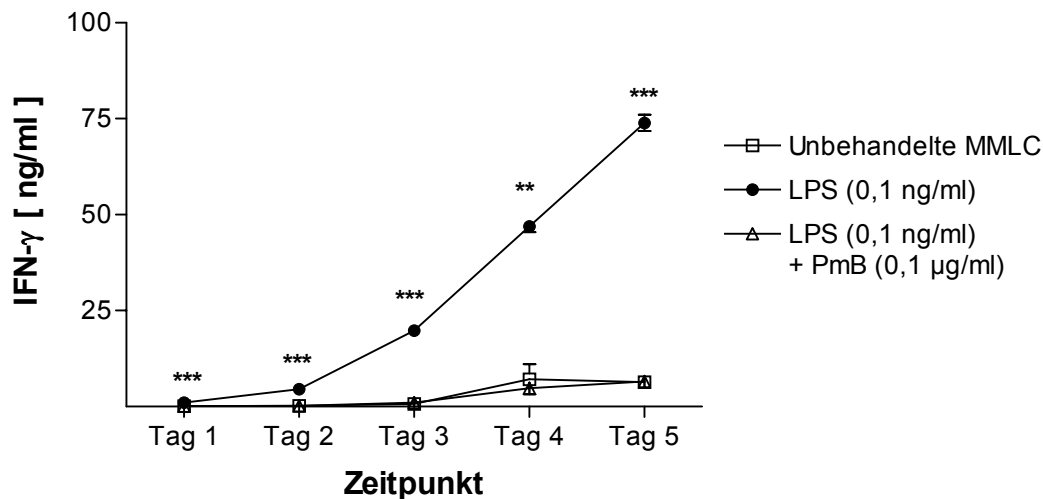


Abb. 6 Hemmung der LPS-induzierten IFN- γ Produktion in der MMLC durch Polymyxin B (PmB). LPS (0,1 ng/ml) wurde entweder ohne (schwarze Kreise) oder nach Vorinkubation mit PmB (0,1 μ g/ml; weiße Dreiecke) der MMLC zugegeben und parallel zur unbehandelten MMLC (weiße Quadrate) über einen Zeitraum von 5 Tagen inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Triplikate eines repräsentativen Experimentes von zwei, die mit ANOVA und Bonferroni's multiple comparison post test analysiert wurden (**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ im Vergleich zur unstimulierten MMLC).

Anschließend wurde untersucht, ob die LPS-bedingte Steigerung der IFN- γ Produktion eine Dosisabhängigkeit zeigt. Wie in Abbildung 7 dargestellt, führte die Zugabe von LPS in steigenden Konzentrationen zu einer deutlichen dosisabhängigen Steigerung der IFN- γ Sekretion an Tag 4. Dabei wurde in drei unabhängigen Experimenten der IFN- γ Spiegel durch 0,1, 1 und 10 ng/ml LPS im Mittel auf das 6,2, 10,1 bzw. 10,8fache erhöht ($p < 0,01$ für alle drei Konzentrationen). Die Zugabe von 0,01 ng/ml LPS führte nur zu einer 1,6fachen Steigerung, die nicht signifikant war. Für die weiteren Versuche wurden LPS-Konzentrationen von 0,1 bzw. 1 ng/ml ausgewählt, da sie einen möglichst physiologischen Reiz bei gleichzeitig gut messbarer IFN- γ Sekretion darstellten.

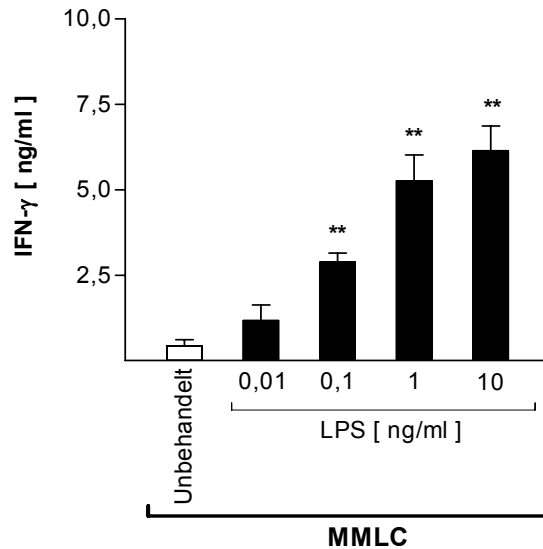


Abb. 7 Dosisabhängigkeit der LPS-induzierten IFN- γ Produktion an Tag 4. Die Zellen von zwei verschiedenen Spendern wurden gemischt und LPS in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Der Überstand wurde nach vier Tagen abgenommen und die Konzentration von IFN- γ bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der Triplikate eines repräsentativen Experimentes von drei (Analyse mit ANOVA und Dunnett's post test; **, $p < 0,01$ im Vergleich zur unbehandelten Kultur).

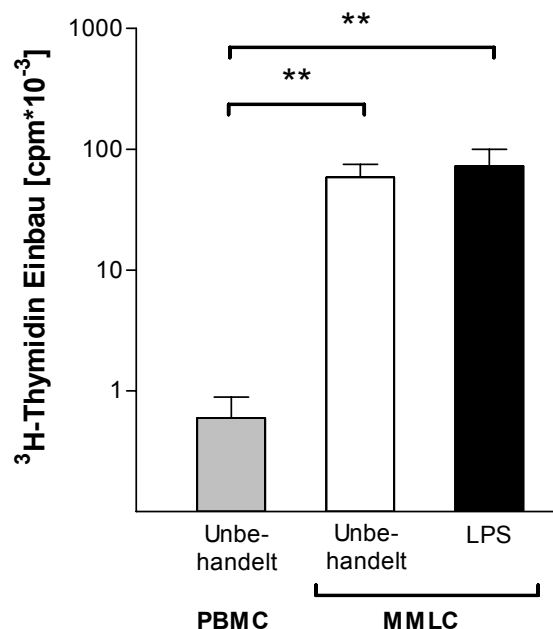


Abb. 8 Wirkung von allogener Stimulation und LPS auf die Proliferation der Zellen. LPS (0,1 ng/ml) wurde zu Beginn der Kultur zur MMLC zugegeben. Nach fünf Tagen wurden alle Kulturen mit $1\mu\text{Ci/well}$ ^3H -Thymidin beimpft und nach weiteren 18 Stunden Inkubation wurde die DNA gesammelt, gewaschen und im Zähler die Anzahl der radioaktiven Zerfälle gemessen. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Experimenten dargestellt und wurden mit ANOVA und Bonferroni's multiple comparison post test verglichen (**, $p < 0,01$).

Ob die vermehrte Sekretion von IFN- γ durch LPS auf einer Verstärkung der Proliferation der Zellen beruht, wurde anhand des ^3H -Thymidineinbaus in die DNA von unstimulierten PBMC, unbehandelter und LPS-behandelter MMLC untersucht. Die allogene Aktivierung resultierte in einem vermehrten Einbau von ^3H -Thymidin ($p < 0,01$ im Vergleich zur unbehandelten PBMC), während die Zugabe von LPS in vier unabhängigen Experimenten zu keiner weiteren Steigerung des Einbaus und damit der Proliferation führte (Abb. 8).

Zusätzlich wurde auch die Transkription der IFN- γ mRNA über einen Zeitraum von 5 Tagen untersucht. Dazu wurden parallele Kulturen für jeden Analysezeitpunkt angesetzt und einerseits die Überstände mittels ELISA analysiert, andererseits die mRNA der Zellen stabilisiert, isoliert und durch quantitative TaqMan PCR untersucht. Wie im Methodenteil beschrieben wurde die gemessene absolute Anzahl an IFN- γ mRNA Molekülen auf 10.000 Kopien des House-keeping Gen β -Actin normalisiert. In der unstimulierten MMLC stieg die basale IFN- γ mRNA-Expression nach 2 Stunden auf ca. 300 IFN- γ mRNA-Moleküle/10.000 β -Actin Moleküle im Vergleich zum Kulturbeginn an (Abb. 9).

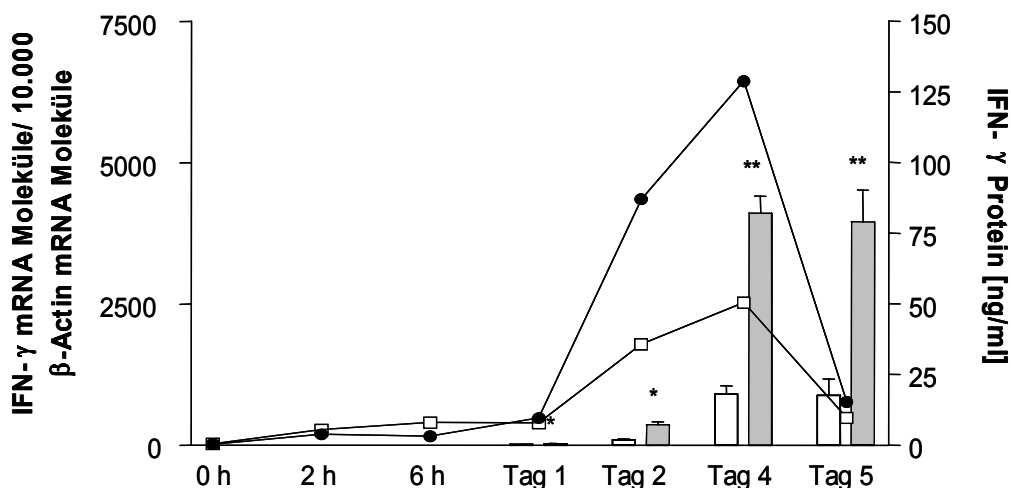


Abb. 9 IFN- γ Produktion in der MMLC auf Protein und mRNA-Ebene über 5 Tage. Die unbehandelte MMLC (weiße Balken/ Quadrate) und die mit 1 ng/ml LPS behandelte MMLC (graue Balken/schwarze Kreise) wurden bis zum angegebenen Zeitpunkt in Triplikaten inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf IFN- γ mRNA (Linien) und IFN- γ Proteinproduktion (Balken) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Triplikate eines Experimentes, die Analyse erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test für verbundene Stichproben (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ im Vergleich zur unbehandelten MMLC).

Erst am zweiten Tag kam es zu einem weiteren Anstieg der IFN- γ mRNA Spiegel, der an Tag 4 mit 2524 IFN- γ Molekülen/10.000 β -Actin Molekülen sein Maximum erreichte und bis zum fünften Tag wieder auf die basale Expressionsrate abfiel. Die Proteinproduktion stieg in der unbehandelten MMLC ebenfalls bis zum zweiten Tag nur gering an, das Maximum wurde

erst an Tag 4 bzw. 5 erreicht. Damit war auf mRNA- und Proteinebene der gleiche Verlauf der Zytokinexpression zu beobachten, wobei das Maximum der mRNA wie erwartet früher als Proteinmaximum lag. Die Zugabe von LPS zur Kultur führte zu einer zusätzlichen Steigerung der IFN- γ mRNA Produktion, wobei auch hier bis zum ersten Tag eine basale mRNA-Expression von 300 IFN- γ mRNA-Molekülen/10.000 β -Actin-Molekülen zu beobachten war. Simultan zur nativen MMLC stieg die mRNA-Expression von Tag 2 ab an und erreichte das Maximum am vierten Tag, die Spiegel waren jedoch 2,6mal so hoch wie die der unstimulierten Kultur.

3.2 Die LPS-induzierte IFN- γ Produktion in der MMLC wird durch IL-12 und IL-18 vermittelt

Um die Mediatoren der IFN- γ Produktion insbesondere in der LPS-behandelten MLC zu identifizieren, wurde zunächst die Beteiligung der beiden T_H1-induzierenden Zytokine IL-12 und IL-18 untersucht.

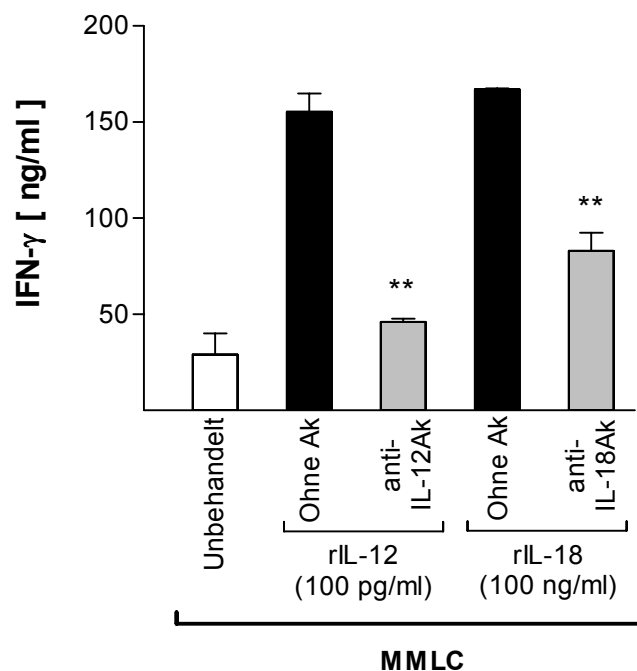


Abb. 10 Reduktion der IFN- γ Antwort auf rIL-12/rIL-18 durch die korrespondierenden neutralisierenden Antikörper. Zunächst wurde bei Ansatz der Kultur nur der neutralisierende Antikörper (Ak, 1 μ g/ml) zugegeben, das entsprechende rekombinante Zytokin wurde mit einem Abstand von 30 Minuten hinzugefügt. Der Überstand wurde nach vier Tagen abgenommen und analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Triplikate eines repräsentativen Experimentes von drei; die Analyse erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test für verbundene Stichproben (**, $p < 0,01$ im Vergleich zur Antikörper-unbehandelten Kultur).

Wie in Abbildung 10 dargestellt, führte die Zugabe von 100 pg/ml IL-12 bzw. 100 ng/ml IL-18 zur MMLC zu einer deutlichen Steigerung der IFN- γ Sekretion nach 4 Tagen auf $155,4 \pm 9,6$ ng/ml bzw. $167,1 \pm 0,5$ ng/ml, deren Höhe den LPS-induzierten IFN- γ Spiegeln vergleichbar war. Diese IFN- γ Produktion konnte durch den jeweiligen neutralisierenden Antikörper in einer Konzentration von 1 μ g/ml gehemmt werden, im Mittel auf $40,4 \pm 10,5$ % für den anti-IL-12 Antikörper ($p < 0,001$) bzw. $53,6 \pm 10,7$ % für den anti-IL-18 Antikörper ($p < 0,01$). Niedrigere Konzentrationen der Antikörper resultierten in einer weniger ausgeprägten Hemmung der IFN- γ Sekretion, eine Erhöhung der Antikörper-Konzentration führte zu keiner weiteren Steigerung der Hemmung. Deshalb wurde eine Konzentration von 1 μ g/ml neutralisierendem Antikörper für die weiteren Experimente ausgewählt.

Anschließend wurden die Wirkung beider Antikörper einzeln und in Kombination auf die IFN- γ Sekretion in der unbehandelten und LPS-stimulierten Kultur untersucht (Abb. 11).

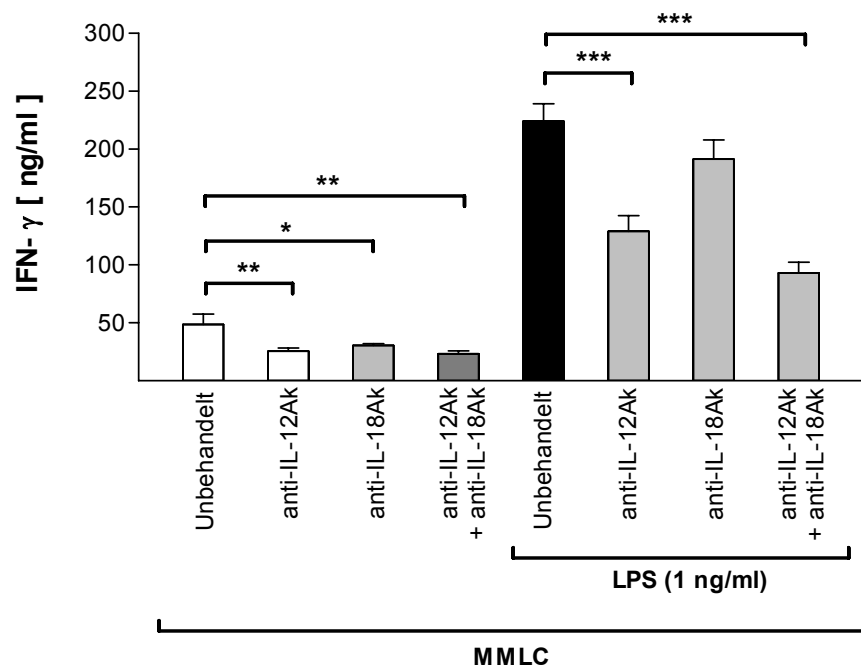


Abb. 11 Reduktion der IFN- γ Antwort in der MMLC durch neutralisierende Antikörper gegen IL-12 und IL-18. Zu Beginn der Kultur wurden LPS (1 ng/ml) und die neutralisierenden Antikörper (anti-IL-12Ak bzw. anti-IL-18Ak, 1 μ g/ml) einzeln oder in Kombination zugegeben und der Überstand an Tag 4 analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Triplikate eines repräsentativen Experimentes von drei; die Analyse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni's multiple comparison post test (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

In drei unabhängigen Experimenten erreichte die Reduktion der IFN- γ Freisetzung in der LPS-behandelten MLC durch den anti-IL-12 Antikörper im Mittel $57,4 \pm 1,4$ % der Maximalstimulation, während der anti-IL-18 Antikörper die Zytokinspiegel auf $83,4 \pm 1,7$ % senkte.

Nur die Reduktion durch den anti-IL-12 Antikörper war sowohl in den einzelnen Experimenten als auch in der gemeinsamen Auswertung signifikant ($p < 0,05$; ausgewertet mit repeated measures ANOVA und Dunnett's post test), während der anti-IL-18 Antikörper zwar stets zu einer leichten Reduktion der IFN- γ Spiegel führte, die jedoch keine Signifikanz erreichte. Die Kombination beider Antikörper führte zu einer Reduktion auf $51,6 \pm 8,8 \%$ ($p < 0,01$ ausgewertet mit repeated measures ANOVA und Dunnett's post test), diese unterschied sich aber nicht signifikant von der durch den anti-IL-12 Antikörper allein hervorgerufenen Reduktion. Das identische Inhibitionsmuster durch beide Antikörper fand sich auch in der unbehandelten MMLC. Anti-IL-12 Antikörper und anti-IL-18 Antikörper reduzierten die IFN- γ Freisetzung in den drei Experimenten um $55,9 \pm 23,7 \%$ ($p < 0,01$) bzw. $72,4 \pm 23,7 \%$ ($p < 0,05$). Die Kombination beider Antikörper führte zu einer Reduktion auf $47,6 \pm 15,4 \%$ ($p < 0,01$), so dass die Aktivierungswege in der unbehandelten und LPS-aktivierten MMLC ähnlich zu sein scheinen. Sie werden im Wesentlichen durch IL-12 und nur zu einem geringen Anteil durch IL-18 vermittelt.

Zusätzlich wurde die Wirkung der rekombinanten Zytokine IL-12 und IL-18 auf die Freisetzung von IFN- γ in der MLC untersucht (Abb. 12).

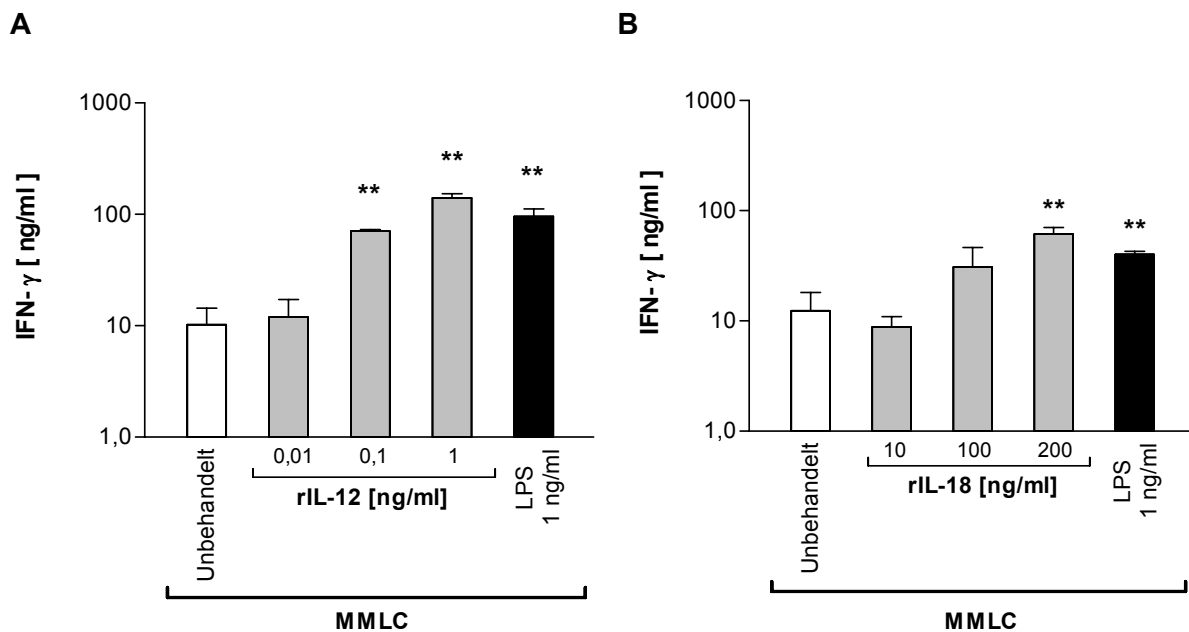


Abb. 12 Rekombinantes IL-12 (A) und IL-18 (B) erhöhen dosisabhängig die IFN- γ Produktion in der MMLC. Beide Zytokine wurden zu Beginn der Kultur zugegeben und der Überstand nach vier Tagen auf IFN- γ analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Triplikate eines repräsentativen Experimentes von drei; die Analyse erfolgte mittels ANOVA und Dunnett's post test (**, $p < 0,01$ im Vergleich zur unbehandelten MMLC).

Sowohl 0,1 ng/ml wie auch 1 ng/ml rekombinantes IL-12 führten dosisabhängig zu einer Steigerung der IFN- γ Produktion um das 5,6 bzw. 27,0fache (Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten; $p < 0,01$), während eine Konzentration von 0,01 ng/ml IL-12 keinen signifikanten Einfluss auf den IFN- γ Spiegel hatte. Auch die Addition von rekombinatem IL-18 resultierte in einer dosisabhängigen Erhöhung der Zytokinspiegel, wobei erst eine Konzentration von 200 ng/ml zu einer signifikanten Steigerung auf das 9,1fache ($p < 0,01$) führte. 100 ng/ml rekombinantes IL-18 steigerte zwar im Mittel die IFN- γ Sekretion auf das 4,1fache, ohne jedoch signifikant zu sein. Dabei wurden mit den höchsten Konzentrationen beider Zytokine jeweils IFN- γ Spiegel erreicht, die den durch LPS-Aktivierung hervorgerufenen vergleichbar waren.

Zur Überprüfung der Hypothese einer synergistischen Wirkung von IL-12 und IL-18 wurden diese in unterschiedlichen Konzentrationen einzeln und in Kombination zu Beginn der MMLC-Kultur zugefügt und die IFN- γ Spiegel nach vier Tagen analysiert (Abb. 13).

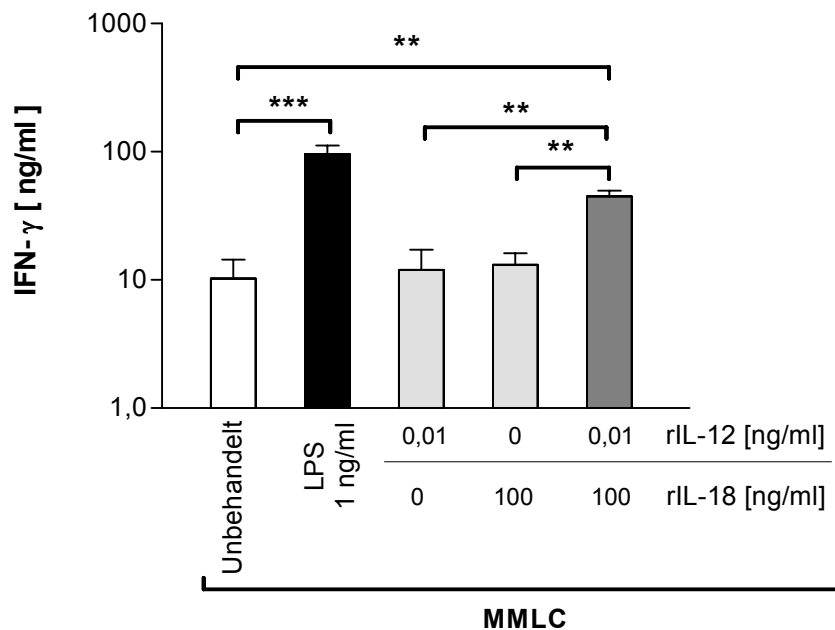


Abb.13 IL-12 und IL-18 steigern die IFN- γ Produktion in der MMLC. Beide Zytokine wurden zu Beginn der Kultur zugegeben und der Überstand nach vier Tagen analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Triplikate eines repräsentativen Experimentes von zwei; die Analyse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni's multiple comparison post test (**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Es zeigte sich, dass die Kombination von 10 pg/ml IL-12 und 100 ng/ml IL-18, die allein keine signifikante Steigerung der IFN- γ Sekretion induzieren konnten, zusammen zu einer hochsignifikanten Steigerung der IFN- γ Freisetzung gegenüber den einzelnen Zytokinen IL-12 und

IL-18 ($p < 0,01$) führten. Die Höhe der durch die Kombination von IL-12 und IL-18 bedingten IFN- γ Spiegel erreichte im Durchschnitt 50% der durch LPS bedingten IFN- γ Spiegel. Diese Potenzierung der Wirkungen beider Zytokine, IL-12 und IL-18, zeigt, dass diese synergistisch die IFN- γ Antwort in der MMLC induzieren und so die Wirkung von LPS nachahmen.

3.3 Beeinflussung der LPS-induzierten IFN- γ Freisetzung durch T_H2-Zytokine und Hydrokortison

Um zu untersuchen, ob T_H2 Zytokine die Sekretion des T_H1-Zytokins IFN- γ beeinflussen können, wurde IL-4 zunächst in einer Konzentration von 50 ng/ml zur unbehandelten und LPS-behandelten Kultur zugegeben und die Zytokinproduktion nach vier Tagen analysiert.

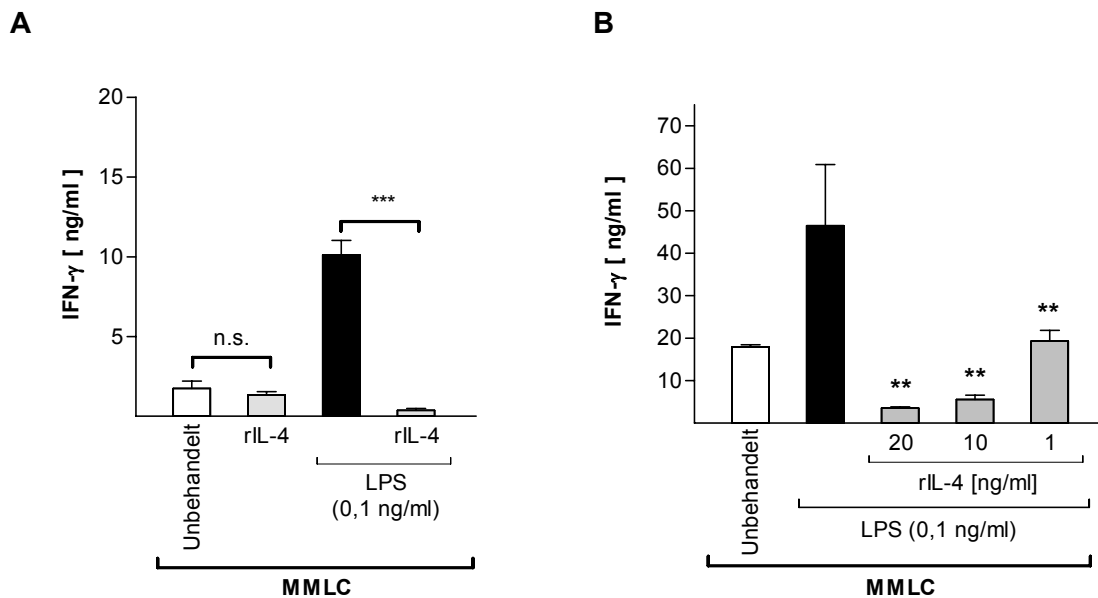


Abb. 14 Rekombinantes IL-4 inhibiert die IFN- γ Produktion in LPS-behandelter MLC. A rIL-4 (50 ng/ml) wurde zur unbehandelten und LPS-stimulierten Kultur zugegeben und der Überstand nach vier Tagen analysiert. **B** rIL-4 wurde in verschiedenen Konzentrationen simultan mit LPS bei Ansatz der Kultur zugegeben und der Überstand nach vier Tagen untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Triplikate eines repräsentativen Experimentes von drei; die Analyse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni's multiple comparison post test (**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ im Vergleich zur IL-4 unbehandelten Kultur).

Während die Addition von 50 ng/ml rekombinatem IL-4 zur unbehandelten MMLC keine signifikante Reduktion der IFN- γ Spiegel in drei unabhängigen Experimenten bewirkte (Reduktion auf $87,7 \pm 31,2$ % im Mittel), führte diese Konzentration in der LPS-behandelten MMLC fast zu einer Blockierung der Zytokinsekretion in allen drei Versuchen (Reduktion auf $5,1 \pm 1,3$ %; $p < 0,001$; Abb. 14 A). Diese Hemmung der LPS-induzierten IFN- γ Sekretion war dosisabhängig und betrug bei einer rIL-4 Konzentration von 1 ng/ml noch 60% ($p < 0,01$; Abb.

14 B). Bei Analyse des zeitlichen Verlaufs der Hemmung der IFN- γ Sekretion durch IL-4 zeigte sich, dass IL-4 die LPS-bedingte IFN- γ Produktion über die gesamte Zeitspanne von 5 Tagen blockierte (Abb. 15).

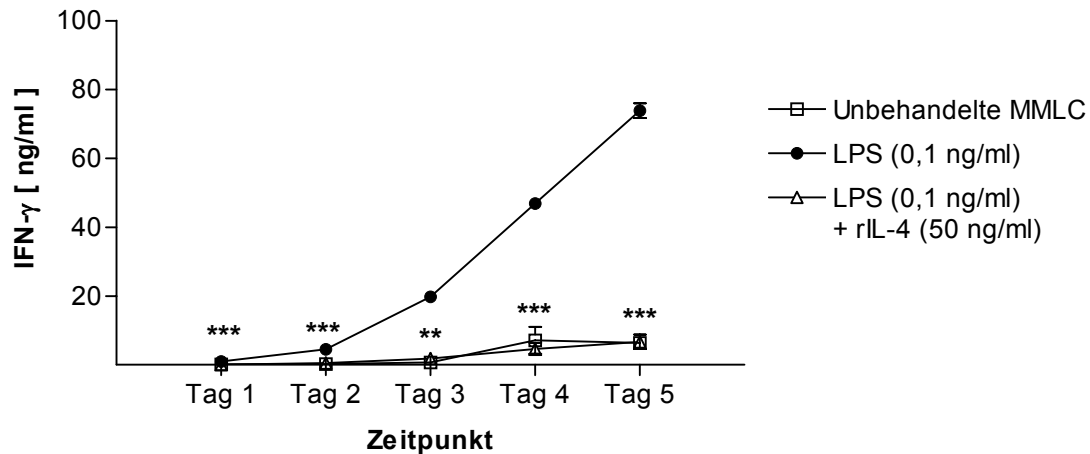


Abb. 15 Rekombinantes IL-4 inhibiert die IFN- γ Produktion in der MMLC über 5 Tage. Die LPS-stimulierte MMLC wurde ohne (schwarze Kreise) und mit rIL-4 (50 ng/ml, weiße Dreiecke) parallel zur unstimulierten MMLC (weiße Quadrate) über 5 Tage inkubiert und die Überstände auf IFN- γ analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Triplikate eines repräsentativen Experimentes von zwei; die Analyse erfolgte mittels des Student's t-test für verbundene Stichproben (**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ im Vergleich zur LPS-Kultur).

Des Weiteren wurde die Wirkung von Hydrokortison als generellem Immunsuppressivum auf die IFN- γ Freisetzung in der MMLC untersucht (Abb. 16). Wie erwartet hemmte auch Hydrokortison dosisabhängig die IFN- γ Produktion in der MMLC. Während eine Konzentration von 1 mg/ml Hydrokortison zu einer Hemmung der IFN- γ Sekretion in unbehandelter und LPS-aktivierter MMLC von 99 % ($p < 0,01$) führte, betrug die Hemmung bei 1 μ g/ml in der unbehandelten MMLC noch $98,9 \pm 0,6$ % ($p < 0,01$). In der LPS-stimulierten MMLC wurde nur eine Reduktion auf $86,8 \pm 0,5$ % ($p < 0,01$) erreicht. Demnach war im Gegensatz zu IL-4 in der unbehandelten MMLC eine größere Hemmung bei gleicher Konzentration des Hydrokortisons zu beobachten als in der LPS-behandelten MMLC, was eine Abhängigkeit der Inhibition vom Ausmaß der Aktivierung nahe legt.

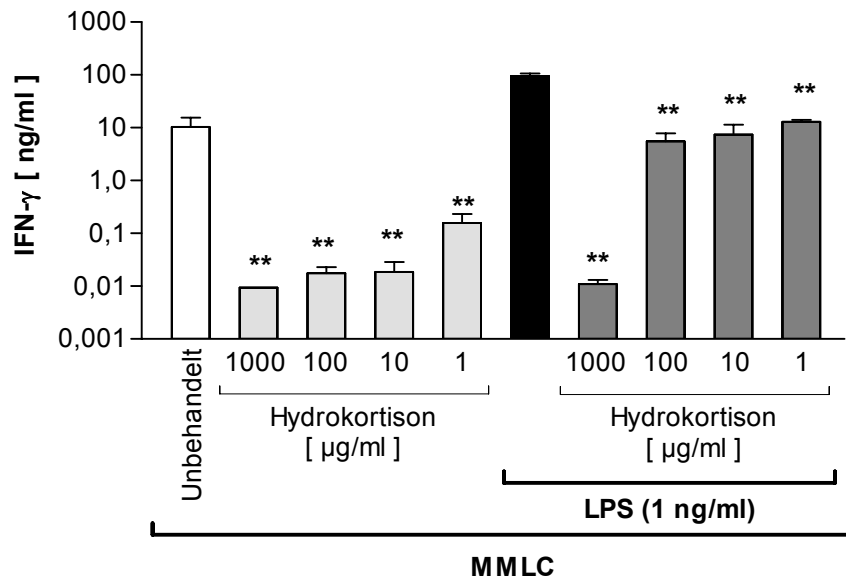


Abb. 16 Hydrokortison inhibiert die IFN- γ Produktion in der MMLC. Hydrokortison wurde in verschiedenen Konzentrationen zu Beginn der Kultur ohne und mit LPS (1 ng/ml) zugegeben und die Kulturüberstände nach vier Tagen auf IFN- γ analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Triplikate eines repräsentativen Experimentes von zwei; die Analyse erfolgte mittels ANOVA und Dunnett's post test (**, $p < 0,01$ im Vergleich zur entsprechenden Kultur ohne Hydrokortisonbehandlung).

3.4 Analysen weiterer Zytokine in der MMLC

3.4.1 Zeitverläufe von IL-6, IL-10 und TNF- α auf Protein- und mRNA-Ebene

Zusätzlich wurde auch die Beteiligung weiterer Zytokine in der MMLC auf Protein- und exemplarisch in einem Experiment auf mRNA-Ebene untersucht. Dafür wurde einerseits einer der physiologischen Gegenspieler von IFN- γ , das T_H2-Zytokin IL-10, ausgewählt. Andererseits wurden zwei Zytokine der angeborenen Immunität, IL-6 und TNF- α , selektiert, wobei TNF- α auch von T_H1-Zellen produziert werden kann.

IL-10

Die Analyse des Verlaufs der IL-10 Proteinproduktion zeigte einen Anstieg der Zytokinpiegel in der nativen MMLC von Tag 1 bis Tag 4. Durch die Zugabe von LPS wurde sowohl der Beginn als auch das Maximum der IL-10 Sekretion zeitlich vorgezogen, die höchsten Spiegel wurden schon nach 2 Tagen erreicht. Diese Kinetik spiegelte sich auch auf mRNA-Ebene wieder, hier lag das Maximum in der unstimulierten MMLC an Tag 2, während es durch LPS schon an Tag 1 erreicht wurde. Zusätzlich war bei der Untersuchung der mRNA-Spiegel eine hohe basale Transkription in beiden Kulturansätzen zu beobachten (33 bzw. 38 IL-10 Moleküle/10.000 β -Actin Moleküle), die nach 2 Stunden auf weniger als 10 IL-10 Moleküle/10.000

β -Actin Moleküle abfiel. Für diese erhöhte mRNA-Expression zu Beginn der Kultur fand sich kein Korrelat auf Proteinebene. Damit zeigten die IL-10 Spiegel in der nativen MMLC mit einem Maximum nach 4 Tagen einen ähnlichen Verlauf wie IFN- γ , während das Sekretionsmaximum durch die LPS-Aktivierung vorgezogen wurde (Abb. 17A).

IL-6

Im Gegensatz zu diesem Zeitverlauf der Zytokinproduktion stieg die IL-6 Produktion in der nativen MMLC bis Tag 5 kontinuierlich auf $0,07 \pm 0,04$ ng/ml bei insgesamt sehr niedrigen IL-6 Spiegeln im Überstand an. Die Stimulation mit LPS führte zu einer deutlichen Steigerung der IL-6 Produktion, die schon nach 2 Stunden $1,2 \pm 0,04$ ng/ml betrug und das Maximum nach 4 Tagen erreichte (247 ± 6 ng/ml). Auf mRNA-Ebene war im Gegensatz zur Proteinproduktion in der unstimulierten Kultur nur eine Schwankung um die basale Konzentration von 23 ± 8 IL-6 Molekülen/10.000 β -Actin Molekülen zu beobachten, während es nach LPS-Behandlung zu einem steilen Anstieg der mRNA Expression mit einem Maximum an Tag 1 kam (3600 IL-6 Moleküle/10.000 β -Actin-Moleküle). Die IL-6 Produktion wurde durch LPS stark aktiviert, während in der nativen MMLC nur eine geringe Expression zu beobachten war (Abb. 17B).

TNF- α

In der unstimulierten MMLC war ein Anstieg der TNF- α Spiegel im Kulturüberstand ab dem ersten Tag zu beobachten, das Maximum der Sekretion lag am vierten Tag. Demgegenüber führte die Behandlung der MMLC mit LPS zu einem zweiten Maximum der Zytokinproduktion nach 6 Stunden, das höhere Spiegel als das spätere erreichte ($763,8 \pm 26,1$ pg/ml vs. $571,0 \pm 55,1$ pg/ml). Dieser doppelgipflige Verlauf der Zytokinspiegel in der MMLC war auch auf mRNA-Ebene zu beobachten, die Maxima der TNF- α mRNA-Expression lagen bei 2-6 Stunden und an Tag 2, wobei wiederum das erste Maximum das höhere war ($102,0$ vs. $52,4$ TNF- α mRNA Moleküle/10.000 β -Actin Moleküle). Analog, nur mit niedrigeren Spiegeln, verlief die mRNA-Expression von TNF- α in der nativen MMLC, wobei sich für das erste Maximum bei 6 Stunden kein Korrelat auf Proteinebene ausmachen ließ (Abb. 17C).

Aufgrund dieser Zeitverläufe konnten für weitere Experimente die günstigsten Analysezeitpunkte ausgewählt werden: Tag 4 für IL-6 und TNF- α , Tag 2 für IL-10 und gegebenenfalls zusätzlich für TNF- α der 4- oder 6-Stunden-Wert.

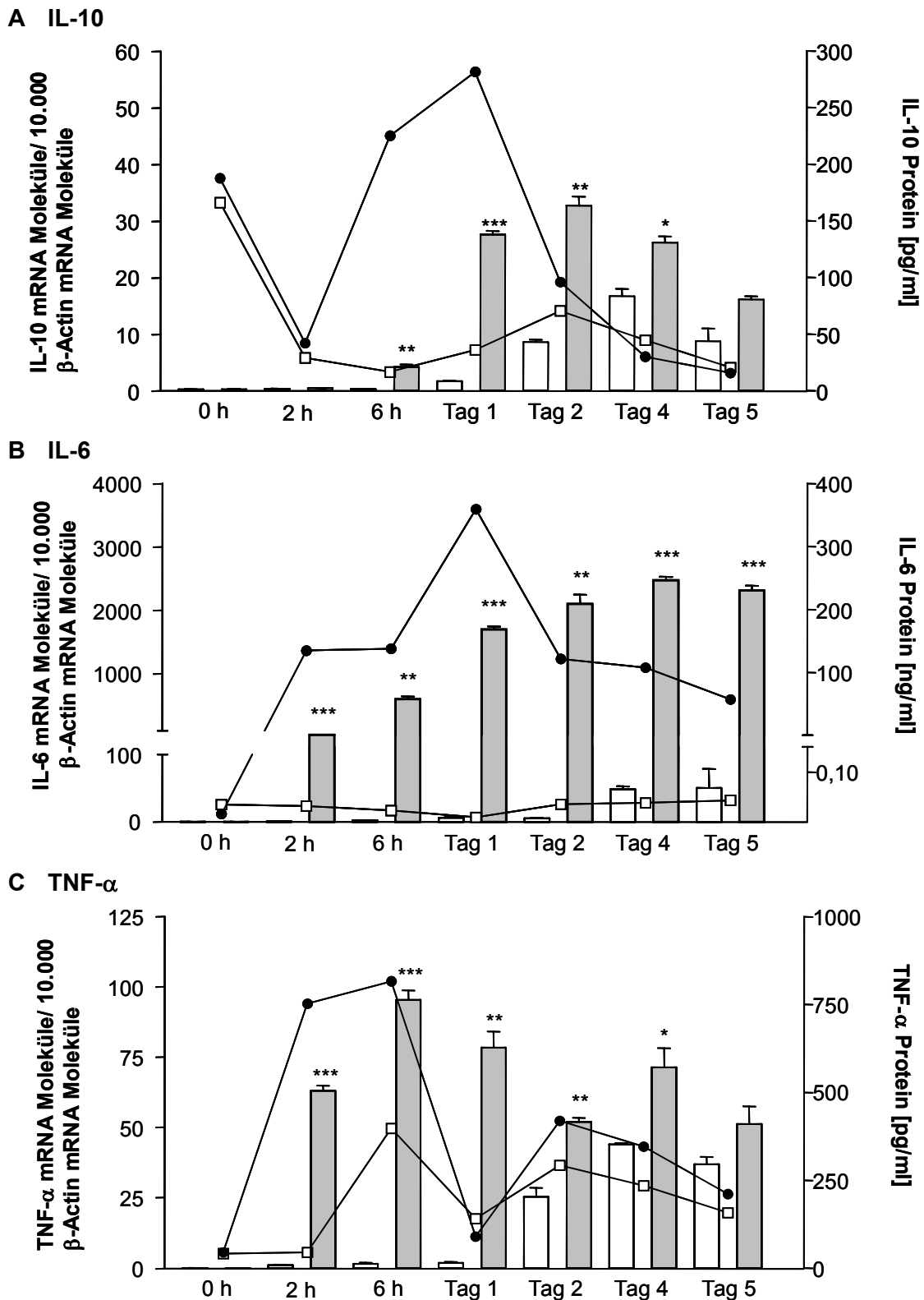


Abb. 14 Kinetik der Zytokine IL-10, IL-6 und TNF- α in der MMLC. LPS (1 ng/ml; graue Balken/ schwarze Kreise) oder Medium (weiße Balken/ Quadrate) wurden zu Beginn der Kultur zugegeben und bis zum angegebenen Zeitpunkt in Triplikaten inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Zytokin-mRNA (Linien) und Proteinproduktion (Balken) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen eines Experimentes, die Analyse erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-test für verbundene Stichproben (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ im Vergleich zur unbehandelten MMLC).

3.4.2 Modulation von IL-6, IL-10 und TNF- α durch das T_H2-Zytokin IL-4 und Hydrokortison

Zusätzlich wurde untersucht, ob IL-4 als T_H2 Zytokin neben IFN- γ auch die Sekretion der anderen zuvor analysierten T_H1- und T_H2-Zytokine beeinflussen konnte. Dazu wurden die Zytokinspiegel im Kulturüberstand an den zuvor festgelegten Zeitpunkten gemessen. Es zeigte sich, dass IL-4 bei allen drei Zytokinen die durch LPS hervorgerufene Steigerung der Expression hemmen konnte.

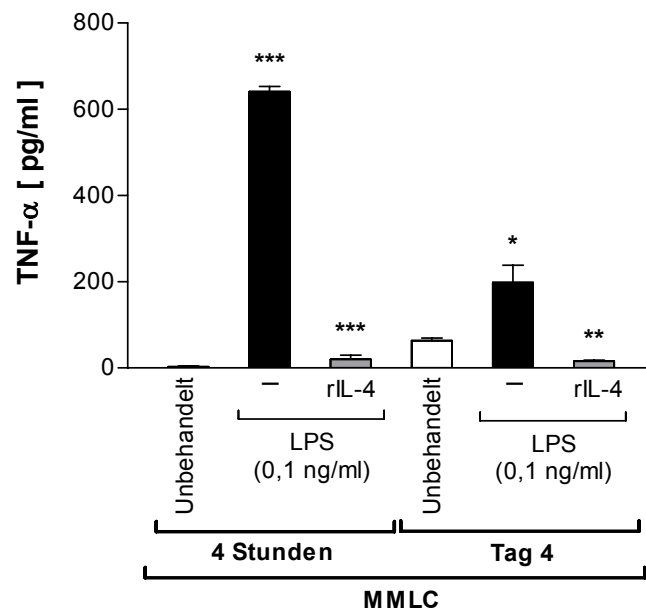


Abb. 18 Wirkung von IL-4 auf die Freisetzung von TNF- α in der MMLC. Rekombinantes IL-4 wurde in verschiedenen Konzentrationen simultan mit LPS zu Beginn der Kultur zugegeben und der Überstand auf TNF- α nach 4 Stunden bzw. 4 Tagen analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Triplikate eines repräsentativen Experimentes von zwei; die Analyse erfolgte mittels des Student's t-test für verbundene Stichproben (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Die durch LPS ausgelöste Steigerung der TNF- α Produktion nach 4 Stunden wurde durch IL-4 im Mittel um $96 \pm 1,4$ % ($p < 0,01$ in zwei unabhängigen Experimenten, analysiert mit dem Student's t-test) gehemmt, während die Hemmung des zweiten Maximums mit $74,5 \pm 24,7$ % ($p < 0,05$) geringer war (Abb.18).

Bei der Analyse des Einflusses von IL-4 auf die Sekretion von IL-6 und IL-10 konnte außerdem die Dosisabhängigkeit der Hemmung nachgewiesen werden. Die IL-10 Sekretion am zweiten Tag der Zellkultur wurde durch 20 bzw. 10 ng/ml IL-4 auf $58,8 \pm 10$ % ($p < 0,01$ in zwei unabhängigen Experimenten, analysiert mittels ANOVA und Dunnett's post test) bzw.

52,0 ± 7,0 % ($p < 0,01$) reduziert, während eine Konzentration von 1 ng/ml keine Hemmung hervorrufen konnte (Abb. 19A).

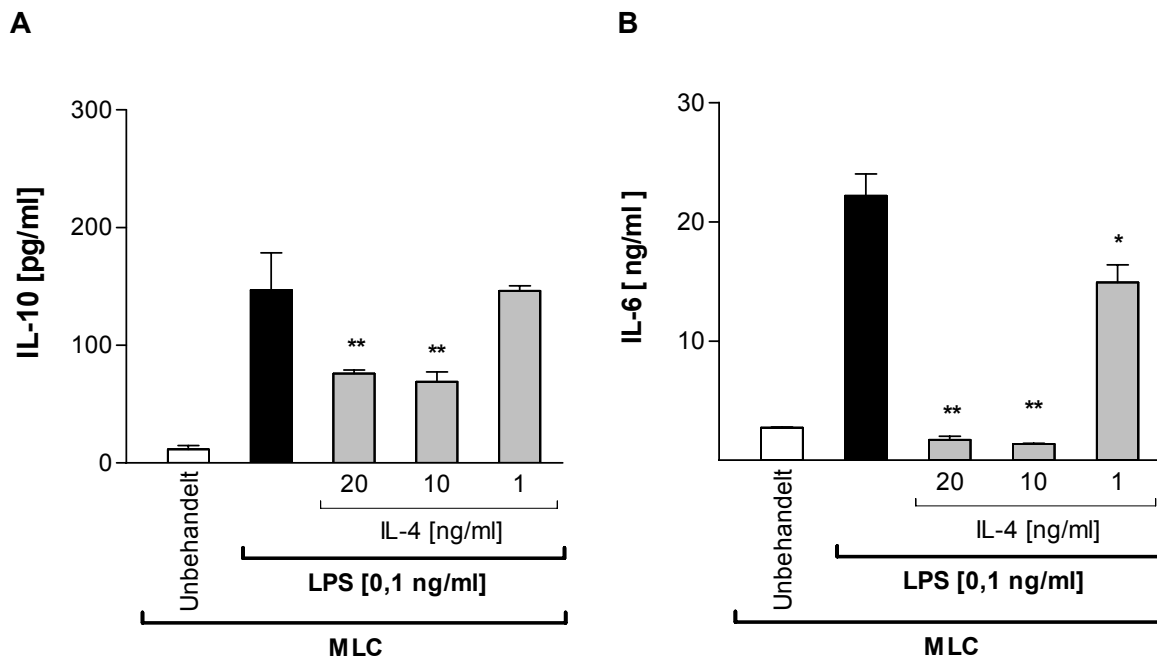


Abb. 19 Wirkung von IL-4 auf die Freisetzung von IL-10 (A) und IL-6 (B) in der MMLC. Rekombinantes IL-4 wurde in verschiedenen Konzentrationen simultan mit LPS zu Beginn der Kultur zugegeben und der Überstand auf IL-10 nach 2 Tagen und auf IL-6 nach 4 Tagen analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Triplikate eines repräsentativen Experimentes von zwei (IL-10) bzw. drei (IL-6); die Analyse erfolgte mittels ANOVA und Dunnett's post test für IL-6 und IL-10 (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$).

Dem gegenüber wurde die IL-6 Sekretion an Tag 4 wesentlich stärker reduziert als das bei IL-10 zu beobachten war: 20 und 10 ng/ml reduzierten die IL-6 Sekretion auf $7,8 \pm 0,2$ % ($p < 0,01$ in drei unabhängigen Experimenten, analysiert mittels ANOVA und Dunnett's post test) bzw. $8,2 \pm 1,8$ % ($p < 0,01$; Abb. 19B). Auch 1 ng/ml IL-4 führte noch zu einer signifikanten Hemmung der IL-6 Freisetzung auf $73 \pm 5,4$ % ($p < 0,05$). Damit ist die Hemmung der T_H1 -assoziierten Zytokine IL-6 und $TNF-\alpha$ durch IL-4 stärker ausgeprägt als die Reduktion des T_H2 -Zytokins IL-10.

Zusätzlich wurde auch der Effekt des generellen Immunsuppressivums Hydrokortison auf die Expression von IL-6 und IL-10 untersucht. Hydrokortison führte dabei zu einer dosisabhängigen Inhibition der IL-10 und IL-6 Produktion in der MMLC ohne LPS (Abb. 20). Dabei betrug die Hemmung bei einer Konzentration von 1 μ g/ml Hydrokortison noch 95,4 % für IL-6 ($p < 0,01$) bzw. 91,8 % ($p < 0,01$) für IL-10. Dem gegenüber war die Hemmung in der LPS-behandelten MMLC etwas schwächer ausgeprägt und betrug für die kleinste Konzentration Hydrokortison für IL-6 noch 72,1 % ($p < 0,01$), die maximale Hemmung bei 1 mg/ml Hydrokor-

tison führte zu einer Reduktion um 98,4 % ($p < 0,01$). Die Inhibition der IL-10 Produktion in der LPS-behandelten MMLC war noch geringer, sie betrug bei 1 mg/ml Hydrokortison zwar noch 98,3 % ($p < 0,01$), war aber schon bei 100 $\mu\text{g/ml}$ nicht mehr nachweisbar. Bei dieser Kultur wurde IL-10 jedoch nicht am Maximum der Zytokinproduktion an Tag 2 analysiert, sondern erst nach 4 Tagen Inkubation.

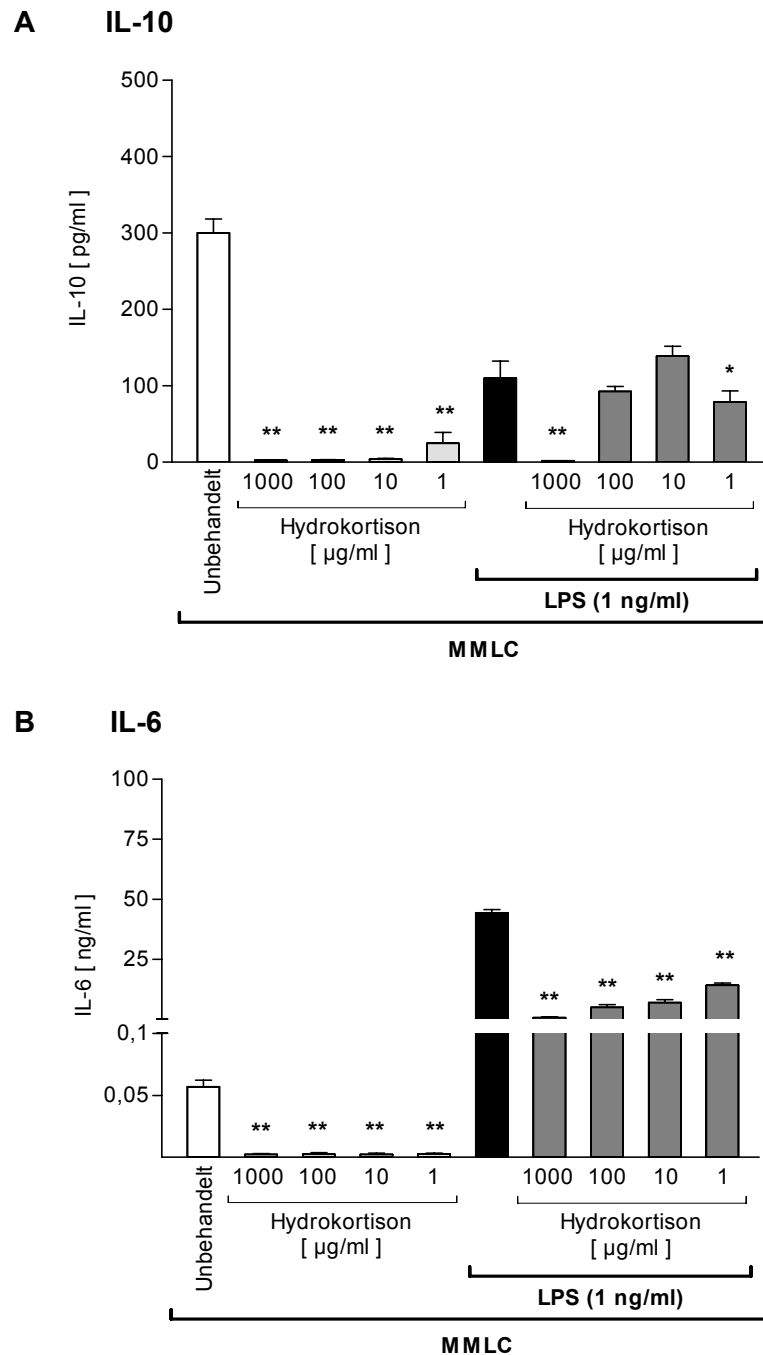


Abb. 20 Wirkung von Hydrokortison auf die Freisetzung von IL-10 (A) und IL-6 (B) in der MMLC. Hydrokortison wurde in verschiedenen Konzentrationen simultan mit LPS zu Beginn der Kultur zugegeben und der Überstand auf IL-10 und IL-6 nach 4 Tagen analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Triplikate eines Experimentes, die Analyse erfolgte mittels ANOVA und Dunnett's post test (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$).

4. Diskussion

4.1 Einführung: MMLC als Surrogatassay für komplexe Immunreaktionen

Die „mixed lymphocyte culture“ (MLC) war zunächst in der Form, wie sie von Perussia et al.¹⁴⁰ beschrieben wurde, als ein System zur Analyse und Prädiktion der Abstoßungsreaktion im Rahmen von Transplantationen vorgeschlagen worden. Die Rolle der MLC in der Vorhersage der Transplantatabstoßung ist jedoch umstritten. Cartwright et al. haben kürzlich zusätzlich zur Proliferation und HLA-Bestimmung auch die Freisetzung von T_H1-Zytokinen in der MLC analysiert und konnten so eine bessere Korrelation zum klinischen Verlauf feststellen¹⁴². Die Bestimmung der Zytokine im Serum der Empfänger ebenso wie die Messung der Proliferation in der MLC scheinen dagegen keine Prädiktion einer Transplantatabstoßung zu ermöglichen¹⁴²⁻¹⁴⁶. Im Einklang mit diesen Befunden konnte bisher ebenfalls keine eindeutige Beziehung zwischen der Anzahl der HLA-Differenzen und dem Ausmaß der IFN- γ Stimulation in der MLC festgestellt werden. Eine größere Anzahl der HLA-Differenzen scheint jedoch mit einer Verstärkung der IFN- γ Antwort assoziiert zu sein¹⁴⁷.

Da dieses komplexe System alle dem Blut entstammenden Zellen der natürlichen und adaptiven Immunität enthält, eignet es sich für die Analyse von immunologischen Vorgängen unter weitgehend physiologischen Bedingungen, bei denen das Zusammenspiel der einzelnen Komponenten des Abwehrsystems von Bedeutung ist und die ansonsten nur durch in vivo Experimente untersucht werden könnten. Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer modifizierten MLC (MMLC), die sowohl zur Charakterisierung immunmodulatorischer Eigenschaften von bekannten Medikamenten als auch zum Screening von neuen therapeutischen Substanzen eingesetzt werden kann, welche im Rahmen der Behandlung der Arteriosklerose und des Diabetes mellitus Typ 2 mit ihren Folgeerkrankungen von Interesse sind.

4.2 Wirkungen von LPS in der MLC

Für die klassische MLC werden die PBMC von zwei nicht-verwandten Spendern zusammen kultiviert, wobei typischerweise die bestrahlten Antigen-präsentierenden Zellen (APC) des einen Spenders als Stimulus für die Immunzellen des zweiten Spenders dienen¹⁴⁰. Dabei wird als vorherrschendes Zytokin von den aktivierten T-Lymphozyten und NK-Zellen Interferon- γ (IFN- γ) sezerniert^{148;149}. Da in unserem experimentellen Ansatz eine Differenzierung in Spender- und Empfängerreaktion in der MLC nicht notwendig und das Ziel die Entwicklung eines möglichst physiologischen Testsystems war, wurde auf die Bestrahlung der PBMC verzichtet.

Um zusätzlich zur adaptiven Immunität, die durch die allogenen Zellen aktiviert wurde, auch die natürliche Immunantwort zu stimulieren, wurden der MLC-Kultur niedrige Konzentrationen von Lipopolysaccharid (LPS) zugesetzt. Die LPS-Konzentrationen von maximal 1 ng/ml

lagen in einem Bereich, der auch unter physiologischen Bedingungen erreicht werden kann¹⁵⁰. LPS ist ein membranständiges Glykolipid der Zellmembran von Gram-negativen Bakterien, das an CD14 binden kann, einem vorwiegend auf der Zelloberfläche von myeloischen Zellen exprimierten Protein. Eine vorherige Bindung an das lösliche LPS-binding protein (LBP) erhöht die Bindungsaffinität von LPS an CD14. Im Anschluss bildet CD14 mit dem Toll-like-receptor 4 (TLR-4) einen Komplex, der zur Aktivierung von intrazellulären Signalwegen und des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt, wodurch die Transkription verschiedener Zytokingene induziert wird¹⁵¹⁻¹⁵⁴. Dabei scheint die Art der induzierten Immunreaktion wie auch die Wechselwirkung mit dem TLR-4 von der räumlichen Konfiguration des LPS-Moleküls abhängig zu sein, die je nach Herkunft des LPS aus unterschiedlichen Bakterienstämmen verschieden ist¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Die Aktivierung durch LPS aus *E. coli* führt in Makrophagen zur Sekretion von IL-6, IL-1 β und der T_H1-induzierenden Zytokine IL-12 und IL-18^{9,26}. Diese Zytokine der natürlichen Immunität führen zu einer Aktivierung und weiteren Zytokinsekretion durch APC und T-Lymphozyten⁹.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass der erwartete Anstieg der Zytokinproduktion durch die Kokultivierung der PBMC der beiden nicht-verwandten Spender durch die Zugabe von niedrigen Konzentrationen LPS (100 pg/ml entsprechend 50 pg/10⁶ Zellen) dosisabhängig gesteigert wurde. Durch Ko-Inkubation mit Polymyxin B, das durch die Bindung an die Lipid A-Komponente des LPS-Moleküls eine Aktivierung der Immunzellen durch LPS verhindert, wurde die Spezifität der LPS-induzierten Steigerung der Zytokinproduktion belegt^{157;158}.

Diese zusätzliche Stimulation der IFN- γ Produktion beruht auf einer gesteigerten Transkription des IFN- γ Gens durch LPS, da die Proliferation der Zellen nicht verändert wurde. Diese Ergebnisse scheinen im Widerspruch zu den Daten von Spear et al.^{159;160} zu stehen, der eine Steigerung der Proliferation in der klassischen MLC durch niedrige Dosen von 5 pg/ml LPS (entsprechend 20 pg LPS/10⁶ Zellen) beschrieben hat. Diese Unterschiede könnten durch eine unterschiedliche Zusammensetzung der Zellkulturmedien zu erklären sein. In dieser Arbeit wurde das Kulturmedium mit 5 % Humanserum angereichert, das aufgrund seiner geringen stimulierenden Aktivität in der MLC speziell ausgewählt wurde und damit möglicherweise den Schwellenwert für die Proliferationsinduktion durch LPS hebt.

Es zeigte sich außerdem, dass die kombinierte Aktivierung von adaptiver und natürlicher Immunität zu einer konstanten Zytokinantwort mit relativ geringer Variationsbreite führte, während insbesondere bei der Stimulation von PBMC mit LPS eine große Variabilität der IFN- γ Produktion zu beobachten war. Dabei konnte im Gegensatz zu den Ergebnissen von Mattern et al.¹⁶¹ keine Unterscheidung in LPS-sensible und nicht-sensible Personen in der Gruppe von 6 Spendern bei mindestens 3 unabhängigen Experimenten je Spender getroffen werden. Da bei den in der vorliegenden Arbeit dargestellten Experimenten die Zellen der

Spender immer frisch aus Vollblut isoliert wurden, lagen die Blutabnahmen unter Umständen Wochen auseinander. Je nach aktueller Abwehrlage des jeweiligen Probanden könnte daraus die unterschiedliche Sensibilität auf die gleiche LPS-Konzentration zu erklären sein. Möglicherweise kann die Aufteilung in Responder und Non-Responder auch aufgrund der geringen Anzahl der Probanden nicht getroffen werden. Es wurden jedoch Unterschiede in der Höhe der IFN- γ Produktion in der klassischen MLC beobachtet, die mit bestimmten Spenderkombinationen korrelierten und möglicherweise im Einklang mit der Beobachtung von Cantell et al.¹⁴⁷ auf einer größeren Anzahl an HLA-Differenzen beruhen.

4.3 Mediatoren der LPS-induzierten IFN- γ Produktion

Es konnte gezeigt werden, dass der durch LPS vermittelte Anstieg der Zytokinproduktion in der MMLC hauptsächlich durch IL-12 und nur zu einem geringeren Anteil durch IL-18 vermittelt wurde. Beide Zytokine haben wichtige funktionelle Eigenschaften gemeinsam. IL-12 wird als das Schlüsselzytokin der IFN- γ Induktion in T-Zellen angesehen und führt damit zu der Entwicklung einer T_H1-Immunantwort¹². IL-18 unterstützt diese T_H1-Differenzierung in Anwesenheit von IL-12 synergistisch²⁷, kann jedoch allein keine T_H1-Antwort induzieren^{28;38}. IL-18 bewirkt in Abwesenheit von IL-12 im Zusammenspiel mit einer T-Zell-Rezeptor Stimulation sogar eine Differenzierung in Richtung der T_H2-Antwort, andererseits kann IL-18 unabhängig von IL-12 die Zytotoxizität von NK-Zellen erhöhen²⁸. Beide Zytokine werden von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen produziert^{13;23;28} und sind durch LPS induzierbar^{11;26;162}. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit berichteten Kohka et al. über die komplette Blockierung der LPS-induzierten IFN- γ Freisetzung in der MLC durch neutralisierende Antikörper gegen IL-12 und IL-18¹⁶³. Jedoch wurde in dieser MLC eine unphysiologische Hochdosis-Stimulation mit LPS (5 μ g/ml LPS entsprechend 20 μ g LPS/10⁶ Zellen) eingesetzt. Die Mechanismen der IFN- γ Aktivierung könnten sich aufgrund dieser extremen Stimulation von denen einer physiologischen niedrig-dosierten LPS-Stimulation unterscheiden und so die Differenzen in den Ergebnissen erklären.

Die Annahme, dass die optimale IFN- γ Induktion durch allogene Stimulation ohne und mit Beteiligung von LPS in der MMLC neben IL-12 und IL-18 noch von weiteren Mediatoren getriggert wird, ist naheliegend. Interessanterweise wurden erst kürzlich regulatorische T-Zellen (T_{reg}) beschrieben, die TLR-4 exprimieren und unabhängig von den Zellen der natürlichen Immunität auf die Stimulation mit LPS reagieren¹⁶⁴. Zusätzlich produzieren LPS-aktivierte Monozyten neben anderen Zytokinen IL-15, das zusammen mit IL-12 zur optimalen IFN- γ Produktion von NK-Zellen beiträgt¹⁶⁵. Damit spiegelt die hier beschriebene MMLC die Komplexität der physiologischen in vivo Situation mit dem Wechselspiel aus interzellulären Kontakten und Zytokininteraktionen wider und sollte so für die Untersuchung von immunmodulatorischen Substanzen geeignet sein. Durch eine möglichst physiologische Stimula-

tionssituation können außerdem auch Faktoren aktiv werden, deren Einfluss oder Existenz noch nicht bekannt ist und die in anderen in vitro Stimulationssystemen durch die Separation einzelner Zelltypen und den Einsatz artifizieller Stimuli wie PHA oder anti-CD3-Antikörper nicht berücksichtigt werden können.

4.4 Modulationsmöglichkeiten der IFN- γ Sekretion in der MMLC

Für die Eignung als Testsystem sollte das MMLC-System nicht nur durch Substanzen stimulierbar, sondern auch gegenüber hemmenden Einflüssen sensibel sein. Diese Eigenschaft wurde für die MMLC durch den Einsatz von verschiedenen Dosen des T_H2-Zytokins IL-4 sowie durch das immunsupprimierende Medikament Hydrokortison untersucht. IL-4, das vor allem von T_H2-Lymphozyten sezerniert wird und zu einer T_H2-Differenzierung naiver T-Zellen mit gleichzeitiger Hemmung der T_H1-Aktivierung führt, ist einer der zentralen Gegenspieler der beiden T_H1-fördernden Zytokine IFN- γ und IL-12^{166;167}. In der vorliegenden Arbeit konnte durch rekombinantes IL-4 nur eine geringe Hemmung der klassischen MLC auf 87% beobachtet werden, während die LPS-induzierte IFN- γ Sekretion durch IL-4 nahezu vollständig blockiert wurde. Danzer et al. beschrieben auch in der klassischen MLC eine Hemmung der IFN- γ Freisetzung auf im Mittel 80% durch vergleichbare IL-4-Konzentrationen¹⁶⁸. Dabei wurde wie in der vorliegenden Arbeit auf eine Bestrahlung der Zellen eines Spenders verzichtet. Das notwendige Serum wurde jedoch in Form von 10% fötalem Kälberserum (FCS) zugesetzt, während in unseren Experimenten 5 % eines speziell selektierten, gering-stimulierenden Humanserums verwendet wurden. Möglicherweise führt FCS durch das enthaltene Fremdprotein zu einer diskreten, LPS-ähnlichen Aktivierung der MLC, bei der die Hemmung durch rIL-4 im Einklang mit unseren Ergebnissen stärker ausgeprägt wäre.

IL-4 hemmt die T_H1-Aktivierung auf verschiedenen Ebenen. Es reduziert die CD14-Expression in Monozyten und damit die Bindung und Aktivierung durch LPS¹⁶⁹. Auf diese Weise wird auch die CD14-abhängige Freisetzung von IL-18²⁶ ebenso wie die LPS-induzierte Expression der IL-12 p40 Untereinheit gehemmt, was zu einer reduzierten Freisetzung von bioaktivem IL-12 p70 führt²³. Der IL-12-abhängige Aktivierungsweg der T_H1-Differenzierung wird zusätzlich durch die verminderte Expression des hochaffinen IL-12-Rezeptors auf T-Zellen beeinflusst⁴⁵. Somit erschwert IL-4 einerseits die primäre Aktivierung von Monozyten und Makrophagen durch LPS, andererseits wird die Zytokinkaskade, die zu einer Aktivierung von T-Zellen und deren T_H1-Differenzierung führt, durch die Blockade der wichtigen Zytokine IL-12 und IL-18 unterbrochen. Des Weiteren scheint die T_H1 Differenzierung im Gegensatz zum T_H2-Phänotyp nicht stabil zu sein. Ausdifferenzierte T_H2-Zellen haben die Fähigkeit verloren, auf IL-12 zu reagieren, während die Empfindlichkeit der T_H1-Zellen gegenüber IL-4 erhalten bleibt. Ist jedoch IFN- γ während der T_H2-Differenzierung anwesend, können auch ausdifferenzierte T_H2-Zellen für eine IL-12-medierte Konversion zum T_H1-Phänotyp sensibel

bleiben¹⁶⁶.

Ähnlich wie niedrigdosiertes IL-4 blockierten auch geringe Konzentration von 1 µg/ml Hydrokortison die Freisetzung von IFN-γ in der LPS-aktivierten MMLC. Hydrokortison bindet im Zytoplasma an den Glukokortikoid-Rezeptor (GK) und wird danach in den Zellkern transloziert. Die Homodimere aus dem Komplex von Kortison und GK binden an bestimmte „Response elements“ in den Promotorregionen, was die Transkription von antiinflammatorischen Genen verstärken kann. Gleichzeitig kann Hydrokortison die Transkription proinflammatorischer Zytokine hemmen, einerseits durch die direkte Bindung und Inhibition von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF-κB^{110;114;115;170}, andererseits durch verstärkte Expression von IκB, das einen Proteinkomplex mit NFκB bildet und dessen Aktivität auf diese Weise beendet¹¹⁵. Sowohl AP-1 wie auch NF-κB sind in die Transkription von IFN-γ^{38;171}, IL-12¹⁷² und IL-18¹⁶² involviert. Zusätzlich führt Hydrokortison zu einer unspezifischen Hemmung der Transkription durch eine erschwerte Ablösung und Abwicklung der DNA von den Histonen, wodurch die Bindung von Transkriptionsfaktoren und der DNA-Polymerase behindert wird¹¹⁵.

4.5 Untersuchung T_H1- und T_H2-assoziierter Zytokine in der MMLC

Um eine mögliche differentielle Regulation durch immunmodulatorische Substanzen analysieren zu können, wurde auch die Sekretion von weiteren T_H1- und T_H2-assozierten Zytokinen untersucht. Dazu wurden die Zytokine IL-6 und TNF-α ausgewählt, die beide im Rahmen der Akut-Phase-Reaktion von Monozyten und Makrophagen sezerniert werden und außerdem mit der chronischen Entzündungsreaktion im Rahmen der Arteriosklerose und deren Folgeerkrankungen sowie des Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert sind^{83;173-175}.

Wie erwartet zeigte sich dabei eine starke Stimulation von IL-6 durch die LPS-Aktivierung der MMLC, während die IL-6 Sekretion in der nativen MMLC nur gering war. IL-6 wird im Rahmen einer bakteriellen Infektion von Makrophagen ausgeschüttet und aktiviert in der Leber die Synthese von Akut-Phase-Proteinen wie CRP, Fibrinogen und SAA^{9;176}. Des Weiteren führt IL-6 zur Aktivierung von Lymphozyten und zur Proliferation und Differenzierung von T-Lymphozyten.

TNF-α gehört funktionell zur gleichen Gruppe von Zytokinen und wird ebenfalls in der frühen Phase einer bakteriellen Infektion produziert. Es induziert die Wanderung und Differenzierung von unreifen dendritischen Zellen in der Peripherie zu reifen dendritischen Zellen in den Lymphknoten, die durch Antigenpräsentation T-Lymphozyten aktivieren¹³³. Zusammen mit IL-12 stimuliert TNF-α die Freisetzung von IFN-γ aus NK-Zellen²⁴. Zusätzlich wird es auch von ausdifferenzierten T_H1-Lymphozyten produziert und führt zu einer Aktivierung von Makrophagen¹⁷⁷. Diese Dualität der TNF-α Produktion von Makrophagen einerseits und T_H1-Lymphozyten andererseits spiegelt sich im Sekretionsmuster der nativen und LPS-behan-

delten MMLC wieder. Während in der unbehandelten MMLC die Stimulation der Zellen der angeborenen Immunität nur gering ist, steigt die TNF- α Produktion erst im Rahmen der T_H1-Differenzierung nach 2 Tagen an. LPS stellt dagegen einen starken Stimulus der natürlichen Immunität dar, woraus die Ausbildung eines zweiten Maximums der TNF- α Sekretion schon nach wenigen Stunden resultiert.

Als dritter Parameter wurde das T_H2-Zytokin IL-10 untersucht, das die T_H1-Differenzierung und die Produktion von IFN- γ hemmt und auf diese Weise die Immunantwort terminiert^{11;62}. Die IL-10 Produktion stieg in der unstimulierten MMLC bis Tag 4 an, während die Zugabe von LPS zu einer schnelleren und ausgeprägteren Zytokinsekretion führte. Bei diesem Anstieg der IL-10 Spiegel sowohl in der klassischen als auch in der LPS-aktivierten MMLC könnte es sich um eine Gegenregulation als Reaktion auf die starke Aktivierung von T_H1-fördernden Zytokinen handeln, die bei der stärkeren Aktivierung durch LPS ebenfalls intensiver ausfällt^{54;178}. Daftarian et al. konnten zeigen, dass die IL-10 Sekretion in PHA-stimulierten T-Zellen durch IL-6 und IL-12 synergistisch gesteigert wird, und TNF- α unabhängig von anderen Stimuli IL-10 in ruhenden Monozyten induziert¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Auch Gram-negative Bakterien und deren Bestandteile, insbesondere LPS aus *E.coli*, führen neben der IL-12 Freisetzung zu einer deutlichen Stimulation der IL-10 Sekretion in Monozyten^{57;181}. Im komplexen System der MMLC können beide Mechanismen aktiviert werden: Einerseits induziert LPS direkt eine IL-10 Sekretion in Monozyten im Sinne einer direkten negativen Rückkopplung, andererseits führt die gesteigerte Produktion von TNF- α , IL-6 und IL-12 zu einer zusätzlichen Induktion der IL-10 Freisetzung aus Monozyten, Makrophagen und T-Zellen. Durch die fehlende direkte Induktion von IL-10 durch LPS wird in der unbehandelten MMLC das Sekretionsmaximum erst parallel zu IFN- γ erreicht. Bis auf die hohen initialen IL-10 mRNA-Spiegel folgt die Kinetik der Transkription der Proteinsekretion. Die konstitutive Expression von IL-10 mRNA wurde in vielen Zellarten beschrieben. Durch eine große Anzahl von mRNA-destabilisierenden Elementen in der IL-10 Sequenz kommt es jedoch nicht zur Translation und Proteinfreisetzung^{54;182}, so dass die Regulation der IL-10 Sekretion vorwiegend auf der Steuerung der effektiven Translation beruht.

Damit repräsentiert die MMLC ein komplexes, weitgehend physiologisches Zytokinnetzwerk, in dem die Wechselwirkungen immunmodulatorischer Substanzen mit verschiedenen Zytokinen der natürlichen und adaptiven Immunität näher charakterisiert werden können.

4.6 Modulation von IL-6, IL-10 und TNF- α durch T_H2-Zytokine und Hydrokortison

Es wurde des Weiteren der Einfluss der Immunmodulatoren IL-4 und Hydrokortison auf die Freisetzung von IL-6, IL-10 und TNF- α untersucht. Analog zu den Ergebnissen von te Velde et al.¹⁸³, die über die Inhibition der IL-6 und TNF- α Produktion in Monozyten durch IL-4 berichteten, konnte das T_H2-Zytokin im hier beschriebenen Testsystem der MMLC die Sekretion von IL-6 und TNF- α über den gesamten Kulturzeitraum nahezu blockieren. Becher et al.¹⁸⁴ konnten durch den Einsatz eines löslichen TNF- α R p75-IgG Fusionsproteins, das freies TNF- α bindet und neutralisiert, die TNF- α -Abhängigkeit der Produktion von bioaktivem IL-12 p70 und IFN- γ in einer MLC aus APC und T-Zellen nachweisen. IL-4 kann sowohl die LPS-bedingte TNF- α und IL-12 Produktion⁵³, als auch die durch eine Kombination von IL-12 und IL-18 induzierte IFN- γ Sekretion²² in Makrophagen inhibieren. Auch die Transkription und Sekretion von IL-6 wird durch IL-4 reduziert¹⁸⁵. Andererseits ist die TNF- α Produktion in der MLC im Sinne einer positiven Rückkopplung von IFN- γ abhängig¹⁶⁸. IL-4 scheint damit schon früh in die Zytokinkaskade der Immunaktivierung modulierend einzugreifen und könnte auf diese Weise die primäre Induktion von TNF- α , IL-12 und IFN- γ verhindern, wodurch die Entwicklung einer T_H1-Antwort beeinträchtigt werden kann. Dadurch würde nicht nur die positive Rückkopplung auf die TNF- α Produktion inhibiert, sondern auch die negative Rückkopplung in Form der IL-10 Induktion durch Zytokine der natürlichen Immunität reduziert. Durch diesen Mechanismus wäre die Inhibition der IL-10 Spiegel in der MMLC um ca. 50 % durch rekombinantes IL-4 zu erklären.

Die Zugabe von Hydrokortison führte in der MMLC zu einer über 90%igen Inhibition der IL-6 Zytokinsekretion, während die IL-10 Freisetzung nur in der unbehandelten MMLC effektiv gehemmt werden konnte. Die Transkription von IL-10 wird durch die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 kontrolliert¹⁸⁶. Viele Zellarten exprimieren konstitutiv IL-10 mRNA, aber sezernieren kein IL-10 Protein. Die Regulation der Proteinsekretion erfolgt durch posttranskriptionale Mechanismen, die die Halbwertszeit der IL-10 mRNA verlängern und auf diese Weise erst die effektive Umsetzung der mRNA in Protein ermöglichen¹⁸². Bisher ist keine Interaktion von Hydrokortison mit den beiden Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 beschrieben, so dass die Transkriptionshemmung durch Hydrokortison wahrscheinlich nur durch die unspezifische Inhibition der DNA-Entwindung von den Histonen erfolgt. Die posttranskriptionale Regulation der IL-10 Sekretion wird durch Hydrokortison anscheinend kaum beeinflusst, so dass die LPS-bedingte Induktion von IL-10 erhalten bleibt.

Im Gegensatz dazu wird die Genaktivität von IL-6 durch NF- κ B gesteuert^{110;185}, über dessen Hydrokortison-bedingte Hemmung die Expression der IL-6 mRNA direkt reduziert wird.

4.7 Abschließende Betrachtungen zum Testsystem der MMLC

Bei genauer Betrachtung imitiert die LPS-aktivierte MMLC den Zustand von Patienten mit Knochenmarkstransplantation nach Behandlung mit einem Standard-Therapiekonzept, das eine Ganzkörper-Bestrahlung beinhaltet. Die Toxizität der radioaktiven Strahlung an der intestinalen Mukosa führt zusammen mit der Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie IL-12 im Rahmen einer Graft-versus-Host-Reaktion (GvHD) zu einer Schrankenstörung im Bereich des Darmes und dem nachfolgenden Übertritt von LPS in den Kreislauf^{187;188}. Analysen eines GvHD-Modells in der Maus ergaben, dass LPS in der Leber und Milz akkumulierte und Serumkonzentrationen von bis zu 6 ng/ml erreichen konnte¹⁵⁰.

Diese Arbeit untersucht die Aktivierungsmechanismen der MMLC, die eine kombinierte Stimulation der natürlichen und adaptiven Immunität durch den Einsatz von allogenen Zellen und niedrigdosiertem LPS von 0,1 bis 1 ng/ml repräsentiert (Abb. 21).

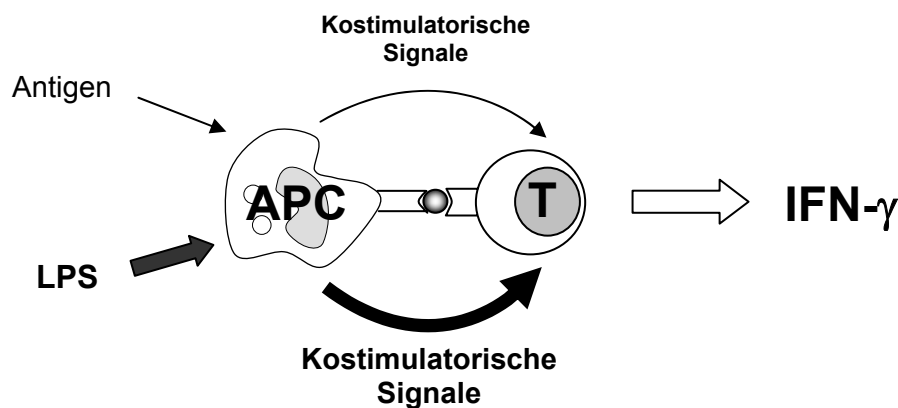


Abb. 21 Schematische Darstellung der Interaktion von natürlicher und adaptiver Immunität in der MMLC. Durch die allogene Stimulation wird die natürliche und vor allem die adaptive Immunität stimuliert. Die Ausbildung kostimulatorischer Signale in Form von Oberflächenproteinen und Zytokinen wie IL-12 und IL-18 ist nur gering ausgeprägt. Zusammen mit der direkten Aktivierung der T-Zellen induzieren sie eine IFN- γ Produktion. Durch die Zugabe von LPS werden die Zellen der natürlichen Immunität stärker aktiviert und verstärken so die IFN- γ Freisetzung durch vermehrte Expression kostimulatorischer Signale. Modifiziert nach Rose et al. 2004¹⁴¹

Es konnte gezeigt werden, dass IL-12 und zu einem geringeren Anteil IL-18 wichtige Mediatoren der Aktivierung sind und wahrscheinlich von Zellen der natürlichen Immunität freigesetzt werden. Die nachfolgende Aktivierung der T_H1 -Antwort der adaptiven Immunität kann anhand des Zytokins IFN- γ gemessen werden. Immunmodulatorische Substanzen wie IL-4 und Hydrokortison beeinflussen schon in geringen Konzentrationen das Wechselspiel

zwischen natürlicher und adaptiver und Immunität mit daraus resultierender Veränderung der Zytokinfreisetzung. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, durch die Analysen weiterer Zytokine wie IL-6, TNF- α und IL-10 die Beeinflussung der natürlichen Immunität sowie die Ausbildung einer gegenregulatorischen Antwort durch LPS und modulatorische Substanzen zu untersuchen.

Während bisher nur die Summe der Zytokinproduktion in der MMLC analysiert wurde, die nach Freisetzung aus den Zellen und Bindung an Rezeptoren frei im Überstand bleibt, könnte durch weitere Analysen von Zelloberflächenmarkern mittels FACS (Fluorescence-activated cell sorting) zusätzliche Informationen über den Aktivierungsgrad der Zellen gewonnen werden. Durch diese Technik ist ebenfalls eine intrazelluläre Darstellung von Zytokinen möglich, so dass durch die kombinierte Markierung von Zytokinen und zelltypischen Oberflächenmarkern wie CD4, CD8 und CD14 eine Aussage über die Herkunft der im Überstand gemessenen Zytokine möglich wäre. Dadurch könnten die Wechselwirkungen immunmodulatorischer Substanzen mit einzelnen Zelltypen näher charakterisiert werden, ohne diese aus dem System mit seinen physiologischen Interaktionen zu isolieren. Durch Analyse weiterer Zytokine und Chemokine wäre es möglich, den Aktivierungsmechanismus und damit auch dessen Modulationsmöglichkeiten näher zu beschreiben.

Die Erkenntnisse über die dominante Rolle einer chronischen Entzündungsreaktion bei der Pathogenese der Arteriosklerose und des Typ-2-Diabetes eröffnen die Möglichkeit, neue Formen der Intervention bei Erkrankungen des „arteriosklerotischen Formenkreises“ zu entwickeln, die sich vorwiegend auf die präventive Modulation der Immunbalance konzentrieren würden. Bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom konnten erhöhte systemische Spiegel von Fibrinogen oder C-reaktiven Protein (CRP) nachgewiesen werden. Dabei scheinen die Serumspiegel von CRP und IL-6 einen prädiktiven Wert in Bezug auf kardiovaskuläre Ereignisse wie den Herzinfarkt zu haben und repräsentieren somit möglicherweise die aktuelle Aktivität der subklinischen Entzündung^{173;189-191}. Die Modulation inflammatorischer Prozesse hat wahrscheinlich entscheidenden Einfluss auf den Verlauf und die Schwere der Arteriosklerose und ihrer Folgeerscheinungen. Nach der Aktivierung von Monozyten und Makrophagen vor allem durch oxidiertes LDL werden eine Vielzahl proinflammatorischer Mediatoren freigesetzt, unter anderen M-CSF (macrophage colony stimulating factor), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), TNF- α und IL-1 β ¹⁹². Zusätzlich führt die Antigenpräsentation zu einer Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen¹⁹³, unterstützt durch eine vermehrte ICAM-1 Expression auf den Endothelzellen¹⁹⁴. Außerdem scheint die CD40-abhängige Kostimulation von T-Zellen und Makrophagen eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung und Verstärkung der subklinischen Entzündungsreaktion zu spielen¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. Untersuchungen in Knock-out-Mäusen haben ergeben, dass durch die Unterbrechung der Immunaktivierung mittels Elimination von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1¹⁹⁸ oder

Blockierung des CD40-vermittelten Signalweges¹⁹⁹ die Größe von arteriosklerotischen Läsionen vermindert werden konnte.

Interessanterweise konnte für einige schon in der Therapie der Arteriosklerose und des Typ-2-Diabetes genutzten Cholesterinsenker, den HMG-CoA-Reduktase-Hemmern oder Statinen, gezeigt werden, dass diese zusätzlich zu ihrer metabolischen Wirkung die Serumspiegel des C-reaktiven Proteins (CRP) reduzieren können²⁰⁰⁻²⁰³ und somit neben ihrem lipidsenkendem auch einen immunologischen Effekt haben²⁰⁴. Statine vermindern die Sekretion von MCP-1²⁰⁵, das in arteriosklerotischen Plaques durch oxidiertes LDL vermehrt gebildet wird und die chronische Entzündungsreaktion durch Anlockung weiterer Monozyten fördert¹⁹². Während diese Beobachtung wahrscheinlich auf die Reduktion des LDL-Spiegels im Blut und damit auf die verminderte Bildung von oxidiertem LDL durch Hemmung der Cholesterinbiosynthese zurückzuführen ist, haben Statine aber auch eine von der HMG-CoA-Hemmung unabhängige immunologische Komponente.

Erst kürzlich konnten Weiz-Schmidt et al. nachweisen, dass einige Statine an LFA-1 binden, ein Oberflächenprotein, das vor allem auf T-Zellen exprimiert wird²⁰⁶. Die Bindung von LFA-1 an das auf APCs exprimierte Protein ICAM-1 sorgt für einen stabilen Kontakt zwischen APC und T-Zelle, der für die effektive Bindung des TCR an den MHC-Komplex und die nachfolgenden Aktivierungsvorgänge essentiell ist. Durch die Bindung der Statine an LFA-1 wird die Interaktion mit ICAM-1 behindert, woraus eine reduzierte Aktivierung von T-Zellen resultieren könnte^{206;207}. In welchem Umfang dieser Effekt bei den therapeutisch eingesetzten Konzentrationen der Statine eine Rolle spielt, bleibt strittig. Neu entwickelte Substanzen könnten dieses Wirkungsprinzip gezielt nutzen und so möglichst selektiv in die Aktivierung und Aufrechterhaltung der pathologischen Immunreaktion eingreifen^{192;204-207}. Durch die weitgehend physiologischen Bedingungen in der MMLC könnten die immunologischen Eigenschaften der Statine näher charakterisiert und die Auswirkungen auf die Interaktion zwischen natürlicher und adaptiver Immunität untersucht werden.

In diesem Zusammenhang ist auch eine weitere Substanzgruppe, die Proteasen, von Interesse, da sie als selektive Immunmodulatoren dienen könnten. Roep et al. konnten zeigen, dass Proteasen wie zum Beispiel Bromelain, Chymotrypsin oder Papain die Expression von Oberflächenproteinen und proinflammatorischen Zytokinen in APCs und T-Zellen vermindern und damit die Aktivität von autoreaktiven T-Zellen verringern können²⁰⁸. Diese Hemmung war auch bei *in vivo* erreichbaren Konzentrationen zu beobachten. Dabei ist der Mechanismus, über den die Proteasen die Zytokinexpression und T-Zell-Aktivität vermindern, noch nicht hinreichend geklärt. Durch den Einsatz der Proteasen in der MMLC, gegebenenfalls in Kombination mit Untersuchungen mittels FACS zur Analyse von Oberflächenproteinen könnte der Wirkmechanismus der Proteasen weiter analysiert werden.

Durch die Charakterisierung von bisher unerkannten, immunmodulatorischen Eigenschaften bekannter Medikamente sollte es zur Entwicklung neuer Substanzen kommen, die durch ihren günstigen Einfluss auf die subklinische Entzündungsreaktion die Entwicklung der chronischen, oft lebensverkürzenden Folgen des Diabetes mellitus und der Arteriosklerose vermindern könnten.

5. Literaturverzeichnis

1. Janeway, C.A., Jr., P. Travers, M. Walport, and M. Shlomchik. 2001. **Basic concepts in immunology.** *In Immunobiology.* Garland publishing, New York. 1-34.
2. Zinkernagel, R.M. 1998. **Grundlagen der Immunologie.** *In Medizinische Mikrobiologie.* F.H. Kayser, K.A. Bienz, J. Eckert, and R.M. Zinkernagel, editors. Thieme-Verlag, Stuttgart; New York. 43-130.
3. Mosmann, T.R., H. Cherwinski, M.W. Bond, M.A. Giedlin, and R.L. Coffman. 1986. **Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.** *J. Immunol.* 136:2348-2357.
4. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman. 1989. **TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties.** *Annu. Rev. Immunol.* 7:145-173.
5. Fiorentino, D.F., M.W. Bond, and T.R. Mosmann. 1989. **Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones.** *J. Exp. Med.* 170:2081-2095.
6. Mosmann, T.R. and S. Sad. 1996. **The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more.** *Immunol. Today* 17:138-146.
7. Chen, Y., V.K. Kuchroo, J. Inobe, D.A. Hafler, and H.L. Weiner. 1994. **Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis.** *Science* 265:1237-1240.
8. Sad, S., R. Marcotte, and T.R. Mosmann. 1995. **Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines.** *Immunity.* 2:271-279.
9. Fearon, D.T. and R.M. Locksley. 1996. **The instructive role of innate immunity in the acquired immune response.** *Science* 272:50-53.
10. Kobayashi, M., L. Fitz, M. Ryan, R.M. Hewick, S.C. Clark, S. Chan, R. Loudon, F. Sherman, B. Perussia, and G. Trinchieri. 1989. **Identification and purification of**

- natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes.** *J Exp.Med.* 170:827-845.
11. D'Andrea,A., M.Aste-Amezaga, N.M.Valiante, X.Ma, M.Kubin, and G.Trinchieri. 1993. **Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells.** *J.Exp.Med.* 178:1041-1048.
 12. Trinchieri,G. 1995. **Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity.** *Annu.Rev.Immunol.* 13:251-276.
 13. Heufler,C., F.Koch, U.Stanzl, G.Topar, M.Wysocka, G.Trinchieri, A.Enk, R.M.Steinman, N.Romani, and G.Schuler. 1996. **Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells.** *Eur.J.Immunol.* 26:659-668.
 14. Gillessen,S., D.Carvajal, P.Ling, F.J.Podlaski, D.L.Stremlo, P.C.Familletti, U.Gubler, D.H.Presky, A.S.Stern, and M.K.Gately. 1995. **Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist.** *Eur.J Immunol.* 25:200-206.
 15. Ling,P., M.K.Gately, U.Gubler, A.S.Stern, P.Lin, K.Hollfelder, C.Su, Y.C.Pan, and J.Hakimi. 1995. **Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity.** *J Immunol.* 154:116-127.
 16. Piccotti,J.R., S.Y.Chan, K.Li, E.J.Eichwald, and D.K.Bishop. 1997. **Differential effects of IL-12 receptor blockade with IL-12 p40 homodimer on the induction of CD4+ and CD8+ IFN-gamma-producing cells.** *J Immunol.* 158:643-648.
 17. D'Andrea,A., M.Rengaraju, N.M.Valiante, J.Chehimi, M.Kubin, M.Aste, S.H.Chan, M.Kobayashi, D.Young, E.Nickbarg, and . 1992. **Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells.** *J Exp.Med.* 176:1387-1398.
 18. Hsieh,C.S., S.E.Macatonia, C.S.Tripp, S.F.Wolf, A.O'Garra, and K.M.Murphy. 1993. **Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages.** *Science* 260:547-549.

19. Macatonia, S.E., N.A.Hosken, M.Litton, P.Vieira, C.S.Hsieh, J.A.Culpepper, M.Wysocka, G.Trinchieri, K.M.Murphy, and A.O'Garra. 1995. **Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells.** *J Immunol.* 154:5071-5079.
20. Wu, C.Y., C.Demeure, M.Kiniwa, M.Gately, and G.Delespesse. 1993. **IL-12 induces the production of IFN-gamma by neonatal human CD4 T cells.** *J Immunol.* 151:1938-1949.
21. Chan, S.H., M.Kobayashi, D.Santoli, B.Perussia, and G.Trinchieri. 1992. **Mechanisms of IFN-gamma induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12). Role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2.** *J Immunol.* 148:92-98.
22. Schindler, H., M.B.Lutz, M.Rollinghoff, and C.Bogdan. 2001. **The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4.** *J.Immunol.* 166:3075-3082.
23. Snijders, A., C.M.Hilkens, van der Pouw Kraan TC, M.Engel, L.A.Aarden, and M.L.Kapsenberg. 1996. **Regulation of bioactive IL-12 production in lipopolysaccharide- stimulated human monocytes is determined by the expression of the p35 subunit.** *J.Immunol.* 156:1207-1212.
24. Jewett, A. and B.Bonavida. 1994. **Activation of the human immature natural killer cell subset by IL-12 and its regulation by endogenous TNF-alpha and IFN-gamma secretion.** *Cell Immunol.* 154:273-286.
25. Okamura, H., H.Tsutsi, T.Komatsu, M.Yutsudo, A.Hakura, T.Tanimoto, K.Torigoe, T.Okura, Y.Nukada, K.Hattori, and . 1995. **Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells.** *Nature* 378:88-91.
26. Manigold, T., U.Bocker, P.Traber, T.Dong-Si, M.Kurimoto, C.Hanck, M.V.Singer, and S.Rossol. 2000. **Lipopolysaccharide/endotoxin induces IL-18 via CD14 in human peripheral blood mononuclear cells in vitro.** *Cytokine* 12:1788-1792.
27. Stoll, S., H.Jonuleit, E.Schmitt, G.Muller, H.Yamauchi, M.Kurimoto, J.Knop, and A.H.Enk. 1998. **Production of functional IL-18 by different subtypes of murine**

- and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development.** *Eur.J Immunol.* 28:3231-3239.
28. Nakanishi,K., T.Yoshimoto, H.Tsutsui, and H.Okamura. 2001. **Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses.** *Annu.Rev.Immunol.* 19:423-474.
29. Akita,K., T.Ohtsuki, Y.Nukada, T.Tanimoto, M.Namba, T.Okura, R.Takakura-Yamamoto, K.Torigoe, Y.Gu, M.S.Su, M.Fujii, M.Satoh-Itoh, K.Yamamoto, K.Kohno, M.Ikeda, and M.Kurimoto. 1997. **Involvement of caspase-1 and caspase-3 in the production and processing of mature human interleukin 18 in monocytic THP.1 cells.** *J.Biol.Chem.* 272:26595-26603.
30. Ghayur,T., S.Banerjee, M.Huginin, D.Butler, L.Herzog, A.Carter, L.Quintal, L.Sekut, R.Talanian, M.Paskind, W.Wong, R.Kamen, D.Tracey, and H.Allen. 1997. **Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production.** *Nature* 386:619-623.
31. Singer,I.I., S.Scott, J.Chin, E.K.Bayne, G.Limjuco, J.Weidner, D.K.Miller, K.Chapman, and M.J.Kostura. 1995. **The interleukin-1 beta-converting enzyme (ICE) is localized on the external cell surface membranes and in the cytoplasmic ground substance of human monocytes by immuno-electron microscopy.** *J Exp.Med.* 182:1447-1459.
32. Micallef,M.J., T.Ohtsuki, K.Kohno, F.Tanabe, S.Ushio, M.Namba, T.Tanimoto, K.Torigoe, M.Fujii, M.Ikeda, S.Fukuda, and M.Kurimoto. 1996. **Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production.** *Eur.J.Immunol.* 26:1647-1651.
33. Kohno,K., J.Kataoka, T.Ohtsuki, Y.Suemoto, I.Okamoto, M.Usui, M.Ikeda, and M.Kurimoto. 1997. **IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12.** *J.Immunol.* 158:1541-1550.
34. Hunter,C.A., J.Timans, P.Pisacane, S.Menon, G.Cai, W.Walker, M.Aste-Amezaga, R.Chizzonite, J.F.Bazan, and R.A.Kastelein. 1997. **Comparison of the effects of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and interferon-gamma-inducing factor on**

- the production of interferon-gamma by natural killer.** *Eur.J Immunol.* 27:2787-2792.
35. Kunikata,T., K.Torigoe, S.Ushio, T.Okura, C.Ushio, H.Yamauchi, M.Ikeda, H.Ikegami, and M.Kurimoto. 1998. **Constitutive and induced IL-18 receptor expression by various peripheral blood cell subsets as determined by anti-hIL-18R monoclonal antibody.** *Cell Immunol.* 189:135-143.
36. Yoshimoto,T., K.Takeda, T.Tanaka, K.Ohkusu, S.Kashiwamura, H.Okamura, S.Akira, and K.Nakanishi. 1998. **IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production.** *J Immunol.* 161:3400-3407.
37. Chang,J.T., B.M.Segal, K.Nakanishi, H.Okamura, and E.M.Shevach. 2000. **The costimulatory effect of IL-18 on the induction of antigen-specific IFN-gamma production by resting T cells is IL-12 dependent and is mediated by up-regulation of the IL-12 receptor beta2 subunit.** *Eur.J Immunol.* 30:1113-1119.
38. Okamura,H., S.Kashiwamura, H.Tsutsui, T.Yoshimoto, and K.Nakanishi. 1998. **Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18.** *Curr opin immunol.* 10:259-264.
39. Yoshimoto,T., H.Mizutani, H.Tsutsui, N.Noben-Trauth, K.Yamanaka, M.Tanaka, S.Izumi, H.Okamura, W.E.Paul, and K.Nakanishi. 2000. **IL-18 induction of IgE: dependence on CD4+ T cells, IL-4 and STAT6.** *Nat.Immunol.* 1:132-137.
40. Hoshino,T., R.H.Wiltrot, and H.A.Young. 1999. **IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response.** *J Immunol.* 162:5070-5077.
41. Wheelock,E.F. 1965. **Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin.** *Science* 149:310-311.
42. Boehm,U., T.Klamp, M.Groot, and J.C.Howard. 1997. **Cellular responses to interferon-gamma.** *Annu.Rev.Immunol.* 15:749-795.
43. Belardelli,F. 1995. **Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response.** *APMIS* 103:161-179.

44. Renz,H., K.Jujo, K.L.Bradley, J.Domenico, E.W.Gelfand, and D.Y.Leung. 1992. **Enhanced IL-4 production and IL-4 receptor expression in atopic dermatitis and their modulation by interferon-gamma.** *J Invest Dermatol.* 99:403-408.
45. Gollob,J.A., H.Kawasaki, and J.Ritz. 1997. **Interferon-gamma and interleukin-4 regulate T cell interleukin-12 responsiveness through the differential modulation of high-affinity interleukin-12 receptor expression.** *Eur.J.Immunol.* 27:647-652.
46. Romagnani,S. 2000. **T-cell subsets (Th1 versus Th2).** *Ann.Allergy Asthma Immunol.* 85:9-18.
47. Howard,M., J.Farrar, M.Hilfiker, B.Johnson, K.Takatsu, T.Hamaoka, and W.E.Paul. 1982. **Identification of a T cell-derived b cell growth factor distinct from interleukin 2.** *J.Exp.Med.* 155:914-923.
48. Yoshimoto,T. and W.E.Paul. 1994. **CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3.** *J.Exp.Med.* 179:1285-1295.
49. Paul,W.E. 1991. **Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine.** *Blood* 77:1859-1870.
50. Paul,W.E. 1997. **Interleukin 4: signalling mechanisms and control of T cell differentiation.** *Ciba Found.Symp.* 204:208-216.
51. Janeway,C.A., Jr., P.Travers, M.Walport, and M.Shlomchik. 2001. **The course of the adaptive response to infection.** *In Immunobiology.* Garland Publishing, New York. 381-423.
52. Chen,H. and W.E.Paul. 1997. **Cultured NK1.1+ CD4+ T cells produce large amounts of IL-4 and IFN-gamma upon activation by anti-CD3 or CD1.** *J Immunol.* 159:2240-2249.
53. Levings,M.K. and J.W.Schrader. 1999. **IL-4 inhibits the production of TNF-alpha and IL-12 by STAT6-dependent and -independent mechanisms.** *J.Immunol.* 162:5224-5229.

54. Moore, K.W., M.R. de Waal, R.L. Coffman, and A.O'Garra. 2001. **Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor.** *Annu.Rev.Immunol.* 19:683-765.
55. Liu, Y., S.H. Wei, A.S. Ho, M.R. de Waal, and K.W. Moore. 1994. **Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor.** *J.Immunol.* 152:1821-1829.
56. Fiorentino, D.F., A. Zlotnik, T.R. Mosmann, M. Howard, and A.O'Garra. 1991. **IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages.** *J.Immunol.* 147:3815-3822.
57. de Waal, M.R., J. Abrams, B. Bennett, C.G. Figdor, and J.E. de Vries. 1991. **Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes.** *J.Exp.Med.* 174:1209-1220.
58. de Waal, M.R., J. Haanen, H. Spits, M.G. Roncarolo, V.A. te, C. Figdor, K. Johnson, R. Kastelein, H. Yssel, and J.E. de Vries. 1991. **Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression.** *J Exp.Med.* 174:915-924.
59. Ding, L., P.S. Linsley, L.Y. Huang, R.N. Germain, and E.M. Shevach. 1993. **IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression.** *J.Immunol.* 151:1224-1234.
60. Willems, F., A. Marchant, J.P. Delville, C. Gerard, A. Delvaux, T. Velu, M. de Boer, and M. Goldman. 1994. **Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes.** *Eur.J.Immunol.* 24:1007-1009.
61. Kubin, M., M. Kamoun, and G. Trinchieri. 1994. **Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells.** *J Exp.Med.* 180:211-222.
62. Fiorentino, D.F., A. Zlotnik, P. Vieira, T.R. Mosmann, M. Howard, K.W. Moore, and A.O'Garra. 1991. **IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells.** *J.Immunol.* 146:3444-3451.
63. Sher, A. and R.L. Coffman. 1992. **Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines.** *Annu.Rev.Immunol.* 10:385-409.

64. Sypek, J.P., C.L.Chung, S.E.Mayor, J.M.Subramanyam, S.J.Goldman, D.S.Sieburth, S.F.Wolf, and R.G.Schaub. 1993. **Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response.** *J Exp.Med.* 177:1797-1802.
65. Yamamura, M., K.Uyemura, R.J.Deans, K.Weinberg, T.H.Rea, B.R.Bloom, and R.L.Modlin. 1991. **Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions.** *Science* 254:277-279.
66. Martin, S. and H.Kolb. 2001. **Typ-1-Diabetes. Immunpathogenese, Immunintervention und Immunprävention.** In *Diabetologie kompakt. Grundlagen und Praxis.* H.Schatz, editor. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, Wien. 45-52.
67. Andre-Schmutz, I., C.Hindelang, C.Benoist, and D.Mathis. 1999. **Cellular and molecular changes accompanying the progression from insulinitis to diabetes.** *Eur.J Immunol.* 29:245-255.
68. Yoon, J.W., H.S.Jun, and P.Santamaria. 1998. **Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of beta cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells.** *Autoimmunity* 27:109-122.
69. Rothe, H., A.Hausmann, K.Casteels, H.Okamura, M.Kurimoto, V.Burkart, C.Mathieu, and H.Kolb. 1999. **IL-18 inhibits diabetes development in nonobese diabetic mice by counterregulation of Th1-dependent destructive insulinitis.** *J Immunol.* 163:1230-1236.
70. Rabinovitch, A. and W.L.Suarez-Pinzon. 1998. **Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus.** *Biochem.Pharmacol.* 55:1139-1149.
71. Ross, R. 1999. **Atherosclerosis--an inflammatory disease.** *N.Engl.J.Med.* 340:115-126.
72. Jonasson, L., J.Holm, O.Skalli, G.Bondjers, and G.K.Hansson. 1986. **Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque.** *Arteriosclerosis* 6:131-138.

73. van der Wal, A.C., P.K.Das, v.d.B.Bentz, C.M.van der Loos, and A.E.Becker. 1989. **Atherosclerotic lesions in humans. In situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response.** *Lab Invest* 61:166-170.
74. Hansson, G.K., J.Holm, and L.Jonasson. 1989. **Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque.** *Am.J.Pathol.* 135:169-175.
75. Frostegard, J., A.K.Ulfgren, P.Nyberg, U.Hedin, J.Swedenborg, U.Andersson, and G.K.Hansson. 1999. **Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines.** *Atherosclerosis* 145:33-43.
76. Nagano, H., R.N.Mitchell, M.K.Taylor, S.Hasegawa, N.L.Tilney, and P.Libby. 1997. **Interferon-gamma deficiency prevents coronary arteriosclerosis but not myocardial rejection in transplanted mouse hearts.** *J.Clin.Invest* 100:550-557.
77. Grainger, D.J., P.R.Kemp, J.C.Metcalf, A.C.Liu, R.M.Lawn, N.R.Williams, A.A.Grace, P.M.Schofield, and A.Chauhan. 1995. **The serum concentration of active transforming growth factor-beta is severely depressed in advanced atherosclerosis.** *Nat.Med.* 1:74-79.
78. McCaffrey, T.A., B.Du, S.Consigli, P.Szabo, P.J.Bray, L.Hartner, B.B.Weksler, T.A.Sanborn, G.Bergman, and H.L.Bush, Jr. 1997. **Genomic instability in the type II TGF-beta1 receptor gene in atherosclerotic and restenotic vascular cells.** *J.Clin.Invest* 100:2182-2188.
79. Amento, E.P., N.Ehsani, H.Palmer, and P.Libby. 1991. **Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells.** *Arterioscler.Thromb.* 11:1223-1230.
80. Galis, Z.S., M.Muszynski, G.K.Sukhova, E.Simon-Morrissey, E.N.Unemori, M.W.Lark, E.Amento, and P.Libby. 1994. **Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion.** *Circ.Res.* 75:181-189.
81. Galis, Z.S., G.K.Sukhova, M.W.Lark, and P.Libby. 1994. **Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques.** *J.Clin.Invest* 94:2493-2503.

82. Pickup, J.C. and M.A. Crook. 1998. **Is Type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system?** *Diabetologia* 41:1241-1248.
83. Pickup, J.C., M.B. Mattock, G.D. Chusney, and D. Burt. 1997. **NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X.** *Diabetologia* 40:1286-1292.
84. Kellner, M., A. Hennige, and H.U. Haering. 2001. **Typ-2-Diabetes. Pathogenese des Typ-2-Diabetes.** In *Diabetologie kompakt. Grundlagen und Praxis.* H. Schatz, editor. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, Wien. 105-113.
85. Mohamed-Ali, V., S. Goodrick, A. Rawesh, D.R. Katz, J.M. Miles, J.S. Yudkin, S. Klein, and S.W. Coppack. 1997. **Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo.** *J Clin Endocrinol. Metab* 82:4196-4200.
86. Gordon, E.S. 1960. **Non-esterified fatty acids in blood of obese and lean subjects.** *Am J Clin Nutr* 8:740-747.
87. Reaven, G.M., C. Hollenbeck, C.Y. Jeng, M.S. Wu, and Y.D. Chen. 1988. **Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM.** *Diabetes* 37:1020-1024.
88. Boden, G. and G.I. Shulman. 2002. **Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction.** *Eur. J. Clin. Invest* 32 Suppl 3:14-23.
89. Lam, T.K., A. Carpentier, G.F. Lewis, W.G. van de, I.G. Fantus, and A. Giacca. 2003. **Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production.** *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 284:E863-E873.
90. Boden, G. 1997. **Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM.** *Diabetes* 46:3-10.
91. Grill, V. and E. Qvigstad. 2000. **Fatty acids and insulin secretion.** *Br. J. Nutr.* 83 Suppl 1:S79-S84.

92. Tripathy,D., P.Mohanty, S.Dhindsa, T.Syed, H.Ghanim, A.Aljada, and P.Dandona. 2003. **Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects.** *Diabetes* 52:2882-2887.
93. Sampson,M.J., I.R.Davies, J.C.Brown, V.Morgan, T.Richardson, A.J.James, A.P.Sampson, and D.A.Hughes. 2001. **n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation, monocyte adhesion molecule expression and pro-inflammatory mediators in Type 2 diabetes mellitus.** *Diabet.Med.* 18:51-58.
94. Fernandez-Real,J.M., M.Broch, J.Vendrell, and W.Ricart. 2003. **Insulin resistance, inflammation, and serum fatty acid composition.** *Diabetes Care* 26:1362-1368.
95. Hotamisligil,G.S. and B.M.Spiegelman. 1994. **Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link.** *Diabetes* 43:1271-1278.
96. Hotamisligil,G.S., P.Peraldi, A.Budavari, R.Ellis, M.F.White, and B.M.Spiegelman. 1996. **IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance.** *Science* 271:665-668.
97. Kellerer,M., K.Rett, W.Renn, L.Groop, and H.U.Haring. 1996. **Circulating TNF-alpha and leptin levels in offspring of NIDDM patients do not correlate to individual insulin sensitivity.** *Horm.Metab Res.* 28:737-743.
98. Hotamisligil,G.S., P.Arner, J.F.Caro, R.L.Atkinson, and B.M.Spiegelman. 1995. **Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance.** *J.Clin.Invest* 95:2409-2415.
99. Hube,F. and H.Hauner. 1999. **The role of TNF-alpha in human adipose tissue: prevention of weight gain at the expense of insulin resistance?** *Horm.Metab Res.* 31:626-631.
100. Muller,S., S.Martin, W.Koenig, P.Hanifi-Moghaddam, W.Rathmann, B.Haastert, G.Giani, T.Illig, B.Thorand, and H.Kolb. 2002. **Impaired glucose tolerance is associated with increased serum concentrations of interleukin 6 and co-regulated acute-phase proteins but not TNF-alpha or its receptors.** *Diabetologia* 45:805-812.

101. Pradhan,A.D., J.E.Manson, N.Rifai, J.E.Buring, and P.M.Ridker. 2001. **C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus.** *JAMA* 286:327-334.
102. Kubaszek,A., J.Pihlajamaki, V.Komarovski, V.Lindi, J.Lindstrom, J.Eriksson, T.T.Valle, H.Hamalainen, P.Ilanne-Parikka, S.Keinanen-Kiukaanniemi, J.Tuomilehto, M.Uusitupa, and M.Laakso. 2003. **Promoter polymorphisms of the TNF-alpha (G-308A) and IL-6 (C-174G) genes predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the Finnish Diabetes Prevention Study.** *Diabetes* 52:1872-1876.
103. Kubaszek,A., J.Pihlajamaki, K.Punnonen, P.Karhapaa, I.Vauhkonen, and M.Laakso. 2003. **The C-174G promoter polymorphism of the IL-6 gene affects energy expenditure and insulin sensitivity.** *Diabetes* 52:558-561.
104. Fernandez-Real,J.M., M.Broch, J.Vendrell, C.Gutierrez, R.Casamitjana, M.Pugeat, C.Richart, and W.Ricart. 2000. **Interleukin-6 gene polymorphism and insulin sensitivity.** *Diabetes* 49:517-520.
105. Rosen,P., P.P.Nawroth, G.King, W.Moller, H.J.Tritschler, and L.Packer. 2001. **The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society.** *Diabetes Metab Res.Rev.* 17:189-212.
106. Dimitriadis,E., M.Griffin, D.Owens, A.Johnson, P.Collins, and G.H.Tomkin. 1995. **Oxidation of low-density lipoprotein in NIDDM: its relationship to fatty acid composition.** *Diabetologia* 38:1300-1306.
107. Williams,S.B., J.A.Cusco, M.A.Roddy, M.T.Johnstone, and M.A.Creager. 1996. **Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus.** *J.Am.Coll.Cardiol.* 27:567-574.
108. Schiekofer,S., M.Andrassy, J.Chen, G.Rudofsky, J.Schneider, T.Wendt, N.Stefan, P.Humpert, A.Fritsche, M.Stumvoll, E.Schleicher, H.U.Haring, P.P.Nawroth, and A.Bierhaus. 2003. **Acute hyperglycemia causes intracellular formation of CML and activation of ras, p42/44 MAPK, and nuclear factor kappaB in PBMCs.** *Diabetes* 52:621-633.

109. Morohoshi,M., K.Fujisawa, I.Uchimura, and F.Numano. 1996. **Glucose-dependent interleukin 6 and tumor necrosis factor production by human peripheral blood monocytes in vitro.** *Diabetes* 45:954-959.
110. Barnes,P.J. and M.Karin. 1997. **Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases.** *N.Engl.J.Med.* 336:1066-1071.
111. Bierhaus,A., S.Chevion, M.Chevion, M.Hofmann, P.Quehenberger, T.Illmer, T.Luther, E.Berentshtein, H.Tritschler, M.Muller, P.Wahl, R.Ziegler, and P.P.Nawroth. 1997. **Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells.** *Diabetes* 46:1481-1490.
112. Pockley,A.G. 2003. **Heat shock proteins as regulators of the immune response.** *Lancet* 362:469-476.
113. Uemura,S., H.Matsushita, W.Li, A.J.Glassford, T.Asagami, K.H.Lee, D.G.Harrison, and P.S.Tsao. 2001. **Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress.** *Circ.Res.* 88:1291-1298.
114. Refojo,D., A.C.Liberman, D.Giacomini, N.A.Carbia, M.Graciarena, C.Echenique, P.M.Paez, G.Stalla, F.Holsboer, and E.Arzt. 2003. **Integrating systemic information at the molecular level: cross-talk between steroid receptors and cytokine signaling on different target cells.** *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 992:196-204.
115. Barnes,P.J. 1998. **Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms.** *Clin.Sci.(Lond)* 94:557-572.
116. Aarbakke,J., G.Janka-Schaub, and G.B.Elion. 1997. **Thiopurine biology and pharmacology.** *Trends Pharmacol.Sci.* 18:3-7.
117. Shulman,L.N. 1993. **The biology of alkylating-agent cellular injury.** *Hematol.Oncol.Clin North Am* 7:325-335.
118. Zhu,L.P., T.R.Cupps, G.Whalen, and A.S.Fauci. 1987. **Selective effects of cyclophosphamide therapy on activation, proliferation, and differentiation of human B cells.** *J Clin Invest* 79:1082-1090.

119. Allison,A.C. 2000. **Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward.** *Immunopharmacology* 47:63-83.
120. Janeway,C.A., Jr., P.Travers, M.Walport, and M.Shlomchik. 2001. **Manipulation of the immune response.** *In Immunobiology.* Garland publishing, New York. 553-596.
121. Morris,R. 1994. **Modes of action of FK506, cyclosporin A, and rapamycin.** *Transplant.Proc.* 26:3272-3275.
122. Crabtree,G.R. 1999. **Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT.** *Cell* 96:611-614.
123. Halloran,P.F., L.Kung, and J.Noujaim. 1998. **Calcineurin and the biological effect of cyclosporine and tacrolimus.** *Transplant.Proc.* 30:2167-2170.
124. Corry,D.B. and F.Kheradmand. 1999. **Induction and regulation of the IgE response.** *Nature* 402:B18-B23.
125. Holt,P.G., C.Macaubas, P.A.Stumbles, and P.D.Sly. 1999. **The role of allergy in the development of asthma.** *Nature* 402:B12-B17.
126. Varga,E.M., K.Nouri-Aria, S.J.Till, and S.R.Durham. 2003. **Immunomodulatory treatment strategies for allergic diseases.** *Curr.Drug Targets.Inflamm.Allergy* 2:31-46.
127. Barnes,P.J. 1999. **Therapeutic strategies for allergic diseases.** *Nature* 402:B31-B38.
128. Friedman,A. 1996. **Induction of anergy in Th1 lymphocytes by oral tolerance. Importance of antigen dosage and frequency of feeding.** *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 778:103-110.
129. Strobel,S. and A.M.Mowat. 1998. **Immune responses to dietary antigens: oral tolerance.** *Immunol.Today* 19:173-181.
130. Van Houten,N. and S.F.Blake. 1996. **Direct measurement of anergy of antigen-specific T cells following oral tolerance induction.** *J Immunol.* 157:1337-1341.

131. Levings, M.K. and M.G. Roncarolo. 2000. **T-regulatory 1 cells: a novel subset of CD4 T cells with immunoregulatory properties.** *J Allergy Clin Immunol.* 106:S109-S112.
132. Feldmann, M., M.J. Elliott, J.N. Woody, and R.N. Maini. 1997. **Anti-tumor necrosis factor-alpha therapy of rheumatoid arthritis.** *Adv. Immunol.* 64:283-350.
133. Janeway, C.A., Jr., P. Travers, M. Walport, and M. Shlomchik. 2001. **Innate Immunity.** *In Immunobiology.* Garland publishing, New York. 35-91.
134. Ehlers, S., S. Kutsch, E.M. Ehlers, J. Benini, and K. Pfeffer. 2000. **Lethal granuloma disintegration in mycobacteria-infected TNFRp55^{-/-} mice is dependent on T cells and IL-12.** *J. Immunol.* 165:483-492.
135. Flynn, J.L., M.M. Goldstein, J. Chan, K.J. Triebold, K. Pfeffer, C.J. Lowenstein, R. Schreiber, T.W. Mak, and B.R. Bloom. 1995. **Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice.** *Immunity.* 2:561-572.
136. Neumann, B., T. Machleidt, A. Lifka, K. Pfeffer, D. Vestweber, T.W. Mak, B. Holzmann, and M. Kronke. 1996. **Crucial role of 55-kilodalton TNF receptor in TNF-induced adhesion molecule expression and leukocyte organ infiltration.** *J. Immunol.* 156:1587-1593.
137. Böyum, A. 1968. **Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g.** *Scand. J. Clin. Lab Invest Suppl* 97:77-89.
138. Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. **Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.** *Science* 230:1350-1354.
139. Snider, J. 1999. **Whole Cell Assays.** *In PCR Applications - Protocols for functional genomics.* M.A. Innis, D.H. Gelfand, and J. Sninsky, editors. Academic press, 329-339.

140. Perussia,B., L.Mangoni, H.D.Engers, and G.Trinchieri. 1980. **Interferon production by human and murine lymphocytes in response to alloantigens.** *J.Immunol.* 125:1589-1595.
141. Rose,B., C.Herder, H.Loffler, H.Kolb, and S.Martin. 2004. **Combined activation of innate and T cell immunity for recognizing immunomodulatory properties of therapeutic agents.** *J Leukoc.Biol.* 75:624-630.
142. Cartwright,N.H., A.G.Demaine, N.J.Hurlock, R.J.McGonigle, P.A.Rowe, J.F.Shaw, R.M.Szydlo, and E.R.Kaminski. 2000. **Cytokine secretion in mixed lymphocyte culture: a prognostic indicator of renal allograft rejection in addition to HLA mismatching.** *Transpl.Immunol.* 8:109-114.
143. Cullen,P.R., S.Lester, J.Rouch, and P.J.Morris. 1977. **Mixed lymphocyte reaction and graft survival in forty cadaveric renal transplants.** *Clin.Exp.Immunol.* 28:218-222.
144. Steinmann,J., J.Kaden, G.May, K.Schroder, C.Herwartz, and W.Muller-Ruchholtz. 1994. **Failure of in vitro T-cell assays to predict clinical outcome after human kidney transplantation.** *J.Clin.Lab Anal.* 8:157-162.
145. Burke,G.W., M.Allouch, R.Cirocco, M.Markou, C.Gomez, N.Contreras, V.Esquenazi, D.Roth, J.Nery, and J.Miller. 1994. **Rejection in HLA-identical living related donor kidney transplants: lack of predictive immunologic parameters.** *Transplantation* 57:750-751.
146. Harmon,W.E., R.Parkman, P.T.Lavin, W.E.Grupe, J.R.Ingelfinger, E.J.Yunis, and R.H.Levey. 1982. **Comparison of cell-mediated lympholysis and mixed lymphocyte culture in the immunologic evaluation for renal transplantation.** *J.Immunol.* 129:1573-1577.
147. Cantell,K., S.Koskimies, and S.Hirvonen. 1990. **Production of interferon in mixed leukocyte cultures from two individuals.** *J.Interferon Res.* 10:331-335.
148. Novelli,F., M.Giovarelli, R.Reber-Liske, G.Virgallita, G.Garotta, and G.Forni. 1991. **Blockade of physiologically secreted IFN-gamma inhibits human T lymphocyte and natural killer cell activation.** *J.Immunol.* 147:1445-1452.

149. Danzer,S.G., C.aCampo, and L.Rink. 1996. **Interferon-gamma plays a key role in the human mixed lymphocyte culture.** *Bone Marrow Transplant.* 18:991-996.
150. Price,K.S., F.P.Nestel, and W.S.Lapp. 1997. **Progressive accumulation of bacterial lipopolysaccharide in vivo during murine acute graft-versus-host disease.** *Scand.J.Immunol.* 45:294-300.
151. Ulevitch,R.J. and P.S.Tobias. 1995. **Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin.** *Annu.Rev.Immunol.* 13:437-457.
152. Akira,S. and K.Hoshino. 2003. **Myeloid differentiation factor 88-dependent and - independent pathways in toll-like receptor signaling.** *J.Infect.Dis.* 187 Suppl 2:S356-S363.
153. Yang,R.B., M.R.Mark, A.Gray, A.Huang, M.H.Xie, M.Zhang, A.Goddard, W.I.Wood, A.L.Gurney, and P.J.Godowski. 1998. **Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling.** *Nature* 395:284-288.
154. Netea,M.G., M.van Deuren, B.J.Kullberg, J.M.Cavaillon, and J.W.Van der Meer. 2002. **Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll- like receptors?** *Trends Immunol.* 23:135-139.
155. Pulendran,B., P.Kumar, C.W.Cutler, M.Mohamadzadeh, T.Van Dyke, and J.Banchereau. 2001. **Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo.** *J.Immunol.* 167:5067-5076.
156. Hirschfeld,M., J.J.Weis, V.Toshchakov, C.A.Salkowski, M.J.Cody, D.C.Ward, N.Qureshi, S.M.Michalek, and S.N.Vogel. 2001. **Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages.** *Infect.Immun.* 69:1477-1482.
157. Yin,N., R.L.Marshall, S.Matheson, and P.B.Savage. 2003. **Synthesis of lipid A derivatives and their interactions with polymyxin B and polymyxin B nonapeptide.** *J.Am.Chem.Soc.* 125:2426-2435.
158. Jacobs,D.M. and D.C.Morrison. 1977. **Inhibition of the mitogenic response to lipopolysaccharide (LPS) in mouse spleen cells by polymyxin B.** *J.Immunol.* 118:21-27.

159. Spear,G.T. and M.Teodorescu. 1984. **Enhancement of human MLR by very low concentrations of lipopolysaccharide and blocking of this enhancement by polymyxin B.** *J.Immunol.Methods* 73:321-327.
160. Spear,G.T., P.Marshall, and M.Teodorescu. 1986. **Increase in proliferation and cytotoxic cell development in human mixed lymphocyte cultures in the presence of very low concentrations of LPS: role of IL-1 and prostaglandin E2.** *Clin.Immunol.Immunopathol.* 38:32-46.
161. Mattern,T., H.D.Flad, L.Brade, E.T.Rietschel, and A.J.Ulmer. 1998. **Stimulation of human T lymphocytes by LPS is MHC unrestricted, but strongly dependent on B7 interactions.** *J Immunol.* 160:3412-3418.
162. Tone,M., S.A.Thompson, Y.Tone, P.J.Fairchild, and H.Waldmann. 1997. **Regulation of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) gene expression.** *J Immunol.* 159:6156-6163.
163. Kohka,H., H.Iwagaki, T.Yoshino, K.Kobashi, N.Urushihara, T.Yagi, T.Tanimoto, M.Kurimoto, T.Akagi, and N.Tanaka. 1999. **Involvement of interleukin-18 (IL-18) in mixed lymphocyte reactions (MLR).** *J.Interferon Cytokine Res.* 19:1053-1057.
164. Caramalho,I., T.Lopes-Carvalho, D.Ostler, S.Zelenay, M.Haury, and J.Demengeot. 2003. **Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide.** *J.Exp.Med.* 197:403-411.
165. Carson,W.E., M.E.Ross, R.A.Baiocchi, M.J.Marien, N.Boiani, K.Grabstein, and M.A.Caligiuri. 1995. **Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro.** *J.Clin.Invest* 96:2578-2582.
166. Paludan,S.R. 1998. **Interleukin-4 and interferon-gamma: the quintessence of a mutual antagonistic relationship.** *Scand.J.Immunol.* 48:459-468.
167. Hamilton,T.A., Y.Ohmori, J.M.Tebo, and R.Kishore. 1999. **Regulation of macrophage gene expression by pro- and anti-inflammatory cytokines.** *Pathobiology* 67:241-244.

-
168. Danzer,S.G., H.Kirchner, and L.Rink. 1994. **Cytokine interactions in human mixed lymphocyte culture.** *Transplantation* 57:1638-1642.
169. Ruppert,J., D.Friedrichs, H.Xu, and J.H.Peters. 1991. **IL-4 decreases the expression of the monocyte differentiation marker CD14, paralleled by an increasing accessory potency.** *Immunobiology* 182:449-464.
170. Aljada,A., H.Ghanim, E.Assian, P.Mohanty, W.Hamouda, R.Garg, and P.Dandona. 1999. **Increased IkappaB expression and diminished nuclear NF-kappaB in human mononuclear cells following hydrokortisone injection.** *J.Clin.Endocrinol.Metab* 84:3386-3389.
171. Barbulescu,K., C.Becker, J.F.Schlaak, E.Schmitt, K.H.Meyer zum Buschenfelde, and M.F.Neurath. 1998. **IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN-gamma promoter in primary CD4+ T lymphocytes.** *J Immunol.* 160:3642-3647.
172. Murphy,T.L., M.G.Cleveland, P.Kulesza, J.Magram, and K.M.Murphy. 1995. **Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF-kappa B half-site.** *Mol.Cell Biol.* 15:5258-5267.
173. Ridker,P.M., N.Rifai, M.J.Stampfer, and C.H.Hennekens. 2000. **Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men.** *Circulation* 101:1767-1772.
174. Pickup,J.C., G.D.Chusney, S.M.Thomas, and D.Burt. 2000. **Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and blood cytokine production in type 2 diabetes.** *Life Sci.* 67:291-300.
175. Ridker,P.M., N.Rifai, M.Pfeffer, F.Sacks, S.Lepage, and E.Braunwald. 2000. **Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction.** *Circulation* 101:2149-2153.
176. Ramadori,G. and B.Christ. 1999. **Cytokines and the hepatic acute-phase response.** *Semin.Liver Dis.* 19:141-155.
177. Janeway,C.A., Jr., P.Travers, M.Walport, and M.Shlomchik. 2001. **T Cell-mediated immunity.** *In Immunobiology.* Garland Publishing, New York. 295-340.

178. Daftarian,P.M., A.Kumar, M.Kryworuchko, and F.Diaz-Mitoma. 1996. **IL-10 production is enhanced in human T cells by IL-12 and IL-6 and in monocytes by tumor necrosis factor-alpha.** *J.Immunol.* 157:12-20.
179. Meyaard,L., E.Hovenkamp, S.A.Otto, and F.Miedema. 1996. **IL-12-induced IL-10 production by human T cells as a negative feedback for IL-12-induced immune responses.** *J.Immunol.* 156:2776-2782.
180. Barsig,J., S.Kusters, K.Vogt, H.D.Volk, G.Tiegs, and A.Wendel. 1995. **Lipopolysaccharide-induced interleukin-10 in mice: role of endogenous tumor necrosis factor-alpha.** *Eur.J.Immunol.* 25:2888-2893.
181. Hesse,C., B.Andersson, and A.E.Wold. 2000. **Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic interleukin-12 (IL-12) while gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production.** *Infect.Immun.* 68:3581-3586.
182. Powell,M.J., S.A.Thompson, Y.Tone, H.Waldmann, and M.Tone. 2000. **Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region.** *J.Immunol.* 165:292-296.
183. te Velde,A.A., R.J.Huijbens, K.Heije, J.E.de Vries, and C.G.Figdor. 1990. **Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and IL-6 by human monocytes.** *Blood* 76:1392-1397.
184. Becher,B., M.Blain, P.S.Giacomini, and J.P.Antel. 1999. **Inhibition of Th1 polarization by soluble TNF receptor is dependent on antigen-presenting cell-derived IL-12.** *J.Immunol.* 162:684-688.
185. Takeshita,S., J.R.Gage, T.Kishimoto, D.L.Vredevoe, and O.Martinez-Maza. 1996. **Differential regulation of IL-6 gene transcription and expression by IL-4 and IL-10 in human monocytic cell lines.** *J.Immunol.* 156:2591-2598.
186. Tone,M., M.J.Powell, Y.Tone, S.A.Thompson, and H.Waldmann. 2000. **IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3.** *J.Immunol.* 165:286-291.

187. Hill,G.R., T.Teshima, A.Gerbitz, L.Pan, K.R.Cooke, Y.S.Brinson, J.M.Crawford, and J.L.Ferrara. 1999. **Differential roles of IL-1 and TNF-alpha on graft-versus-host disease and graft versus leukemia.** *J.Clin.Invest* 104:459-467.
188. Yabe,M., H.Yabe, K.Hattori, T.Shimizu, M.Matsumoto, T.Morimoto, Y.Yasuda, H.Inoue, S.Kato, and T.Nishimura. 1999. **Role of interleukin-12 in the development of acute graft-versus-host disease in bone marrow transplant patients.** *Bone Marrow Transplant.* 24:29-34.
189. Koenig,W., M.Sund, M.Frohlich, H.G.Fischer, H.Lowel, A.Doring, W.L.Hutchinson, and M.B.Pepys. 1999. **C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992.** *Circulation* 99:237-242.
190. Ridker,P.M., C.H.Hennekens, J.E.Buring, and N.Rifai. 2000. **C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women.** *N.Engl.J.Med.* 342:836-843.
191. Toss,H., B.Lindahl, A.Siegbahn, and L.Wallentin. 1997. **Prognostic influence of increased fibrinogen and C-reactive protein levels in unstable coronary artery disease.** *Circulation* 96:4204-4210.
192. Quinn,M.T., S.Parthasarathy, L.G.Fong, and D.Steinberg. 1987. **Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84:2995-2998.
193. Stemme,S., B.Faber, J.Holm, O.Wiklund, J.L.Witztum, and G.K.Hansson. 1995. **T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92:3893-3897.
194. Nagel,T., N.Resnick, W.J.Atkinson, C.F.Dewey, Jr., and M.A.Gimbrone, Jr. 1994. **Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells.** *J.Clin.Invest* 94:885-891.

195. Mach,F., U.Schonbeck, G.K.Sukhova, T.Bourcier, J.Y.Bonnefoy, J.S.Pober, and P.Libby. 1997. **Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:1931-1936.
196. Mach,F., U.Schonbeck, J.Y.Bonnefoy, J.S.Pober, and P.Libby. 1997. **Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor.** *Circulation* 96:396-399.
197. Schonbeck,U., F.Mach, J.Y.Bonnefoy, H.Loppnow, H.D.Flad, and P.Libby. 1997. **Ligation of CD40 activates interleukin 1beta-converting enzyme (caspase-1) activity in vascular smooth muscle and endothelial cells and promotes elaboration of active interleukin 1beta.** *J Biol Chem.* 272:19569-19574.
198. Hynes,R.O. and D.D.Wagner. 1996. **Genetic manipulation of vascular adhesion molecules in mice.** *J Clin Invest* 98:2193-2195.
199. Mach,F., U.Schonbeck, G.K.Sukhova, E.Atkinson, and P.Libby. 1998. **Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling.** *Nature* 394:200-203.
200. Ridker,P.M., N.Rifai, M.Pfeffer, F.Sacks, and E.Braunwald. 1999. **Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators.** *Circulation* 100:230-235.
201. Plenge,J.K., T.L.Hernandez, K.M.Weil, P.Poirier, G.K.Grunwald, S.M.Marcovina, and R.H.Eckel. 2002. **Simvastatin lowers C-reactive protein within 14 days.** *Circulation* 106:1447-1452.
202. Kinlay,S. and A.P.Selwyn. 2003. **Effects of statins on inflammation in patients with acute and chronic coronary syndromes.** *Am.J.Cardiol.* 91:9B-13B.
203. van de Ree,M.A., M.V.Huisman, H.M.Princen, A.E.Meinders, and C.Kluft. 2003. **Strong decrease of high sensitivity C-reactive protein with high-dose atorvastatin in patients with type 2 diabetes mellitus.** *Atherosclerosis* 166:129-135.

-
204. Vaughan,C.J., M.B.Murphy, and B.M.Buckley. 1996. **Statins do more than just lower cholesterol.** *Lancet* 348:1079-1082.
205. Romano,M., L.Diomedede, M.Sironi, L.Massimiliano, M.Sottocorno, N.Polentarutti, A.Guglielmotti, D.Albani, A.Bruno, P.Fruscella, M.Salmona, A.Vecchi, M.Pinza, and A.Mantovani. 2000. **Inhibition of monocyte chemotactic protein-1 synthesis by statins.** *Lab Invest* 80:1095-1100.
206. Weitz-Schmidt,G., K.Welzenbach, V.Brinkmann, T.Kamata, J.Kallen, C.Bruns, S.Cottens, Y.Takada, and U.Hommel. 2001. **Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site.** *Nat.Med.* 7:687-692.
207. Kallen,J., K.Welzenbach, P.Ramage, D.Geyl, R.Kriwacki, G.Legge, S.Cottens, G.Weitz-Schmidt, and U.Hommel. 1999. **Structural basis for LFA-1 inhibition upon lovastatin binding to the CD11a I-domain.** *J Mol Biol* 292:1-9.
208. Roep,B.O., N.K.van den Engel, A.G.van Halteren, G.Duinkerken, and S.Martin. 2002. **Modulation of autoimmunity to beta-cell antigens by proteases.** *Diabetologia* 45:686-692.

Abkürzungsverzeichnis

AGE	<u>A</u> dvanced <u>g</u> lycation <u>e</u> nd products
Ak	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zellen
bp	Basenpaare
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (~acid)
CRP	C-reaktives Protein
Da	Dalton (Molekulargewicht)
dATP	Desoxyadenintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
dNTP	äquimolare Mischung aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
ELISA	<u>E</u> nzyme <u>l</u> inked <u>i</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>a</u> ssay
FCS	Fötales Kälberserum
FFS	Freie Fettsäuren
HLA	Human leukocyte antigen
HRP	Horse radish peroxidase
Hsp	Hitzeschockprotein
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
ICE	Interleukin-1 converting enzyme
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1RA	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
LDL	Low density lipoprotein
LFA-1	Leukocyte functional antigen-1
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MHC	Major histocompatibility complex
MLC	mixed lymphocyte culture

MMLC	modifizierte mixed lymphocyte culture
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (~ acid)
NF κ B	Nuclear factor κ B
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NOD-Maus	Non-obese-diabetic-Maus
oxLDL	oxidiertes Low-density-Lipoprotein
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PHA	Phytohämagglutinin
PmB	Polymyxin B
RAGE	<u>R</u> ezeptor für <u>A</u> dvanced <u>g</u> lycation <u>e</u> nd products
RNAsin	Ribonuklease-Inhibitor
RT	Reverse Transkription
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
T _C -Zellen	Zytotoxische T-Zellen
TGF- β	Transforming growth factor- β
T _H 1-Zellen	T-Helfer-Typ-1-Zellen
T _H 2-Zellen	T-Helfer-Typ-2-Zellen
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TNFR	TNF-Rezeptor
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaureat

7. Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stephan Martin für die Überlassung des Themas, seine zahlreichen Anregungen und weiterführenden Diskussionen. Sein Vertrauen in meine Ideen und Fähigkeiten waren immer wieder ein Ansporn.

Herrn Prof. Dr. Hubert Kolb danke ich für seine immer interessanten und weiterführenden Anregungen im Rahmen kleiner und großer Diskussionen.

Frau Heike Löffler möchte ich für die große Hilfe in technischen Fragen und für die hervorragende Teamarbeit danken.

Herrn Dr. Markus Walz und Frau Tanja Wader danke ich für die Einarbeitung in die Zellkultur und den ELISA.

Frau Dipl.-biol. Sylvia Müller-Scholze möchte ich für die vielen, aufschlussreichen Diskussionen über den ein oder anderen misslungenen ELISA danken. Ihre Lebendigkeit wird mir in Zukunft im Labor sehr fehlen.

Herrn Dr. Christian Herder danke ich für die Betreuung meines Projektes während des letzten Jahres und für die hilfreichen Diskussionen und Vorschläge beim „Zusammenschreiben“.

Allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Martin, Kolb, Burkart und Schloot möchte ich für ihr offenes Ohr bei Fragen, die vielen kleinen und großen Hilfen im täglichen Laborbetrieb und vor allem für das einzigartig gute Klima danken. Sie haben wesentlich dazu beigetragen, dass mir die Arbeit so viel Freude bereitet hat.

Angaben zur Person

Name Bettina Anne-Marie Rose

Wohnort Im Loh 13
42859 Remscheid
Tel.: 0 21 91- 32 20 4

Geburtsdatum und –ort 04.04.1978 in Remscheid

Familienstand ledig

Nationalität deutsch

Schulbildung

1984 – 1988 Mannesmann-Grundschule Remscheid

1988 – 1997 Leibniz-Gymnasium Remscheid

Abschluss: Abitur (Note: 1,4)

Hochschulstudium

10/1997 – 9/1999 Vorklinisches Studium an der HHU Düsseldorf

10/1999 – 3/2003 Klinisches Studium an der HHU Düsseldorf

04/2003 – 03/2004 Praktisches Jahr am Marienhospital Düsseldorf

19.4.2004 Abschluss: Ärztliche Prüfung (Note: gut)

Berufliche Tätigkeit

1.6. – 30.9.2004 Ärztin im Praktikum
am Deutschen Diabetes-Forschungsinstitut Düsseldorf

Seit 1.10.2004 Assistenzärztin
am Deutschen Diabetes-Zentrum Düsseldorf

Zusammenfassung

Die MMLC als immunologisches Testsystem der kombinierten Aktivierung von natürlicher und adaptiver Immunität zur Analyse immunmodulatorischer Eigenschaften therapeutisch genutzter Substanzen

Bettina Rose

Eine große Anzahl von Erkrankungen wie das Asthma bronchiale, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, die rheumatoide Arthritis und Autoimmunerkrankungen wie der Typ-1-Diabetes mellitus sind mit einer Dysregulation des Immunsystems verbunden. In den letzten Jahren haben sich die Hinweise dafür vermehrt, dass auch komplexe Erkrankungen wie der Typ-2-Diabetes und die Arteriosklerose mit einer subklinischen Entzündungsreaktion verbunden sind, die sowohl die natürliche wie auch die adaptive Immunität betrifft. Diese Erkenntnisse bieten die Möglichkeit, neue Therapiestrategien zur kausalen Behandlung der Erkrankungen zu entwickeln, die auf einer Modulation der gestörten Immunregulation basieren.

Die momentan eingesetzten immunologischen Testsysteme verwenden meist nur einzelne Zelltypen der natürlichen oder adaptiven Immunität wie Makrophagen, dendritische Zellen oder spezielle T-Zelllinien. Zusätzlich sind starke und unphysiologische Stimuli nötig, um eine messbare Immunreaktion zu induzieren. Auf der anderen Seite sind in vivo Modelle zwar zur Analyse von Wechselwirkungen einer Substanz mit allen Geweben des Körpers geeignet, aber für Screeningzwecke zu aufwendig.

Dem gegenüber vereint die hier beschriebene modifizierte „Mixed Lymphocyte Culture“ (MMLC) alle Zellen der natürlichen und adaptiven Immunität unter weitgehend physiologischen Bedingungen. Durch die gleichzeitige Aktivierung der adaptiven Immunität durch allogene Zellen und der natürlichen Immunität durch niedrigdosierte Lipopolysaccharid-Stimulation wurde eine deutliche Zytokinantwort hervorgerufen, die unter anderem zur Freisetzung von Interleukin (IL) -12 und IL-18 führte, die beide synergistisch den Analyseparameter IFN- γ induzierten. Durch den Einsatz des T_H2-Zytokins IL-4 und des Immunsuppressivums Hydrokortison konnte die Sensitivität des Testsystems gegenüber immunmodulatorischen Einflüssen nachgewiesen werden. Die differentielle Regulation der Immunantwort durch IL-4 und Hydrokortison konnte durch die Analyse weiterer T_H1-Zytokine wie TNF- α und IL-6 sowie des T_H2-Zytokins IL-10 dargestellt werden.

Damit handelt es sich bei der MMLC um ein einfaches, valides Testsystem, in dem die möglichen immunmodulatorischen Eigenschaften von bekannten und neu entwickelten Substanzen unter möglichst physiologischen Bedingungen analysiert werden können.