

Urologische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Hartung)

Wirkung von einigen nicht-immunologischen Liganden und Immunmodulatoren auf die Aktivität von peripheren Lymphozyten (PBMCs)

Maximilian Alexander Graw

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. R. Hartung (schriftl. Beurteilung)
Priv.-Doz. Dr. U. R. Treiber (mündl. Prüfung)
2. Univ.-Prof. Dr. G. A. Häcker

Die Dissertation wurde am 30.08.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.11.2006 angenommen.

Widmung

**Meinen Eltern
und meiner Oma**

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Fragestellung dieser Arbeit	1
1.2	Allgemeine Einführung	1
1.3	Das Immunsystem – historischer Überblick	4
1.4	Aufbau, Funktion und Entwicklung des Immunsystems	5
1.5	TH 1- und TH 2- vermittelte Immunantwort	7
1.6	Monozytäre Zellen	10
1.7	Natürliche Killerzellen	12
1.8	Dendritische Zellen	13
1.9	Zytokine	15
1.9.1	Interleukin 4	15
1.9.2	Interleukin 10	17
1.9.3	Interleukin 12	18
1.9.4	Tumor-Nekrose Faktor alpha	20
1.9.5	Interferon- γ	21
1.10	Aktivierung von T-Zellen	23
1.11	Lektine	25
1.11.1	Die Biologie der Lektine	25
1.11.2	Wirkungsweise mitogener Lektine im Vergleich zu Antigenen	26
1.11.3	Weitere Aktivatoren der Lymphozyten	27
2	Material und Methoden	29
2.1	Materialien	29
2.2	Methoden	31
2.2.1	Zellkultur	31
2.2.1.1	Suspensionskultur mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC)	31
2.2.1.2	Die gemischte Leukozytenreaktion (MLR): Versuchsaufbau	32
2.2.1.3	Phytohämagglutinin P -Testansatz (PHA-Proliferationstest)	33
2.2.1.4	Testansatz mit „ruhenden Zellen“ (48-Stunden Test)	34
2.2.2	Bestimmung von Zellzahl und Zellaktivität	34
2.2.3	Bestimmung der Zellproliferation	34
2.2.4	Statistische Methoden	36
3	Eigene Ergebnisse	38
3.1	Einführung	38
3.2	Graphische Darstellung	39
3.3	Spenderindividualität	40
3.4	Vergleich der Testansätze	40
3.4.1	Allgemeines	40
3.4.2	Die verschiedenen Testansätze	41
3.5	Messgenauigkeit der durchgeführten Tests	43
3.6	Testung von Pharmaka	46
3.6.1	DMPX (Antagonist des purinergen Rezeptors)	46
3.6.2	Atenolol, Metoprolol und Propranolol (beta-Adrenorezeptor Antagonisten)	48
3.6.3	Cimetidin (H ₂ -Rezeptor Antagonist)	55

3.6.4	ASS, Indomethacin und Diclofenac (PGE ₂ -Rezeptor Antagonisten)	57
3.6.5	Sulpirid und Cyproheptadin (Serotonin/5HT-Rezeptorantagonisten)	65
3.6.6	SKF-83566 (Dopamin-Rezeptorantagonist)	71
3.7	Testung von Immunmodulatoren	73
3.7.1	Aminosäuren L-Arginin und D-/L-Cystein	73
3.7.2	Das cAMP- System beeinflussende Substanzen Zaprinast und 8-Bromo-cGMP	76
3.7.3	Das NO/ ROI- System beeinflussende Substanzen L-Canavanine und DiethylamineNONOate	80
4	Diskussion.....	84
4.1	Allgemeines	84
4.2	Methoden und Testverfahren	84
4.3	Etablierung des Testsystems	85
4.4	Wirkung der Substanzen	86
4.4.1	Rezeptorantagonisten	86
4.4.1.1	DMPX (Antagonist des purinergen Rezeptors)	86
4.4.1.2	Atenolol, Metoprolol und Propranolol (beta-adrenozeptor Antagonisten)	86
4.4.1.3	H ₂ -Rezeptor-, Serotonin/5HT-Rezeptor, D-Rezeptorantagonisten	87
4.4.1.3.1	Cimetidin (H ₂ -Rezeptor, Antagonist)	89
4.4.1.3.2	Cyproheptadin (Serotonin/ 5 HT- Rezeptor, Antagonist)	89
4.4.1.3.3	Sulpirid und SKF 83566 (Dopaminrezeptorantagonisten)	89
4.4.1.4	PGE ₂ -Rezeptor Antagonisten/ Metabolite des Arachidonsäurestoffwechsels	90
4.4.1.4.1	Acetylsalicylsäure (ASS)	90
4.4.1.4.2	Indomethacin und Diclofenac	90
4.4.2	Immunmodulatoren	93
4.4.2.1	L- Arginin	93
4.4.2.2	D-/L-Cystein	94
4.4.2.3	Zaprinast und 8-Bromo-cGMP	94
4.5	Das TH1 / TH2-Zellkonzept	95
4.6	Die zelluläre Signaltransduktion	96
4.6.1	G-Proteine	96
4.6.2	Second Messenger	97
4.6.3	Das NO/cGMP-System	99
5	Zusammenfassung	101
	Literaturverzeichnis	102

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Umwandlung von Tetrazolium Salz WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzol-disulfonat) in Formazan (EC = Elektron koppelndes Agens; RS = mitochondriales Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System).....36
- Abbildung 2a: Vergleich 48-Stunden-Test und PHA-Proliferationstest. Auf der Ordinate sind die durchschnittlichen Messwerte aus vier verschiedenen Experimenten (Zahlen 1-4) aufgetragen. Auf der Abszisse ist die Zellproliferation (gemessen bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 650 nm) dargestellt.....41
- Abbildung 2b: Vergleich PHA-Proliferationstest (48 Stunden) und PHA-Proliferationstest (120Stunden). Auf der Ordinate sind die durchschnittlichen Messwerte aus vier verschiedenen Experimenten (Zahlen 1-4) aufgetragen. Auf der Abszisse ist die Zellproliferation (gemessen bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 650 nm) dargestellt..42
- Abbildung 2c: Vergleich PHA-Proliferationstest (120 Stunden) und MLC-Test (120 Stunden). Auf der Ordinate sind die durchschnittlichen Messwerte aus vier verschiedenen Experimenten (Zahlen 1-4) aufgetragen. Auf der Abszisse ist die Zellproliferation (gemessen bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 650 nm) dargestellt.43
- Abbildung 3a: Proliferation von PBMCs im 48-Stunden-Test bei drei verschiedenen Konzentrationen (A1-A3) der Testsubstanz NG-Monomethyl-L-Arginin (A). A4 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Substanz. Dargestellt sind die Einzelmesswerte aus sechs Parallelmessungen.....44
- Abbildung 3b: Proliferation von PBMCs im MLC-II-Test bei drei verschiedenen Konzentrationen (A1-A3) der Testsubstanz NG-Monomethyl-L-Arginin (A). A4 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Substanz. Dargestellt sind die Einzelmesswerte aus sechs Parallelmessungen.....44
- Abbildung 4a: Proliferation von PBMCs im 48-Stunden-Test bei drei verschiedenen Konzentrationen (B1-B3) der Testsubstanz Quazinone (B). B4 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Substanz. Dargestellt sind die Einzelmesswerte aus sechs Parallelmessungen.....45
- Abbildung 4b: Proliferation von PBMCs im MLC-II-Test bei drei verschiedenen Konzentrationen (B1-B3) der Testsubstanz Quazinone (B). B4 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Substanz. Dargestellt sind die Einzelmesswerte aus sechs Parallelmessungen.....45
- Abbildung 5a: Vergleich der Beeinflussbarkeit von ruhenden (C1 und C2) und allogentstimulierten (C3) PBMCs durch die Testsubstanz DMPX (D), gemessen bei verschiedenen Konzentrationen (D1-D4). Jeweils ist eine Referenzmessung ohne Testsubstanz (D5) mit aufgeführt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.47
- Abbildung 5b: Einfluss von unterschiedlichen Zellkonzentrationen (E1 und E2) auf die PBMC-Aktivität in Anwesenheit der Testsubstanz DMPX (D) in verschiedenen Konzentrationen (D1-D4). D5 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Testsubstanz. E3 ist fiktiv die doppelte Zellzahl von E1, das heißt der Messwert bei der Konzentration von E1 wird mit dem Faktor 2 multipliziert und im Vergleich zum tatsächlichen Messwert bei doppelter Zellzahl (E2) dargestellt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.47
- Abbildung 6a: Vergleich der Beeinflussbarkeit von ruhenden (C1 und C2) und allogentstimulierten (C3) PBMCs durch die Testsubstanz Atenolol (F), gemessen bei verschiedenen

Konzentrationen (F1-F4). Jeweils ist eine Referenzmessung ohne Testsubstanz (F5) mit aufgeführt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	49
Abbildung 6b: Einfluss von unterschiedlichen Zellkonzentrationen (E1 und E2) auf die PBMC-Aktivität in Anwesenheit der Testsubstanz Atenolol (F) in verschiedenen Konzentrationen (F1-F4). F5 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Testsubstanz. E3 ist fiktiv die doppelte Zellzahl von E1, dass heißt der Messwert bei der Konzentration von E1 wird mit dem Faktor 2 multipliziert und im Vergleich zum tatsächlichen Messwert bei doppelter Zellzahl (E2) dargestellt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	50
Abbildung 7a: Vergleich der Beeinflussbarkeit von ruhenden (C1 und C2) und allogen-stimulierten (C3) PBMCs durch die Testsubstanz Metoprolol (G), gemessen bei verschiedenen Konzentrationen (G1-G4). Jeweils ist eine Referenzmessung ohne Testsubstanz (G5) mit aufgeführt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	51
Abbildung 7b: Einfluss von unterschiedlichen Zellkonzentrationen (E1 und E2) auf die PBMC-Aktivität in Anwesenheit der Testsubstanz Metoprolol (G) in verschiedenen Konzentrationen (G1-G4). G5 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Testsubstanz. E3 ist fiktiv die doppelte Zellzahl von E1, dass heißt der Messwert bei der Konzentration von E1 wird mit dem Faktor 2 multipliziert und im Vergleich zum tatsächlichen Messwert bei doppelter Zellzahl (E2) dargestellt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	51
Abbildung 8a: Vergleich der Beeinflussbarkeit von ruhenden (C1 und C2) und allogen-stimulierten (C3) PBMCs durch die Testsubstanz Propranolol (H), gemessen bei verschiedenen Konzentrationen (H1-H4). Jeweils ist eine Referenzmessung ohne Testsubstanz (H5) mit aufgeführt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	52
Abbildung 8b: Einfluss von unterschiedlichen Zellkonzentrationen (E1 und E2) auf die PBMC-Aktivität in Anwesenheit der Testsubstanz Propranolol (H) in verschiedenen Konzentrationen (H1-H4). H5 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Testsubstanz. E3 ist fiktiv die doppelte Zellzahl von E1, dass heißt der Messwert bei der Konzentration von E1 wird mit dem Faktor 2 multipliziert und im Vergleich zum tatsächlichen Messwert bei doppelter Zellzahl (E2) dargestellt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	53
Abbildung 9: Vergleich verschiedener β -Blocker Atenolol (F), Metoprolol (G) und Propranolol (H) im MLC-II-Test (A+B) bei den verschiedenen Substanzkonzentrationen I-IV. Die Messwerte sind prozentual zur Referenzmessung dargestellt.	54
Abbildung 10a: 1×10^{-5} M	54
Abbildung 10b: 1×10^{-9} M	54
Abbildung 10c: 1×10^{-12} M	55
Abbildung 10d: 1×10^{-15} M	55
Abbildung 10 a-d: Einfluss verschiedener β -Blocker Atenolol (F), Metoprolol (G) und Propranolol (H) auf die allogene Stimulierbarkeit (MLC-II-Test) von PBMCs. In den Diagrammen a-d wird dieser Einfluss für jede der vier Substanzkonzentrationen (1×10^{-5} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-12} M und 1×10^{-15} M) einzeln dargestellt. Die Messwerte sind prozentual zur Referenzmessung dargestellt.	55

Abbildung 11a: Vergleich der Beeinflussbarkeit von ruhenden (C1 und C2) und allogenstimulierten (C3) PBMCs durch die Testsubstanz Cimetidin (I), gemessen bei verschiedenen Konzentrationen (I1-I4). Jeweils ist eine Referenzmessung ohne Testsubstanz (I5) mit aufgeführt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	56
Abbildung 11b: Einfluss von unterschiedlichen Zellkonzentrationen (E1 und E2) auf die PBMC-Aktivität in Anwesenheit der Testsubstanz Cimetidin (I) in verschiedenen Konzentrationen (I1-I4). I5 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Testsubstanz. E3 ist fiktiv die doppelte Zellzahl von E1, das heißt der Messwert bei der Konzentration von E1 wird mit dem Faktor 2 multipliziert und im Vergleich zum tatsächlichen Messwert bei doppelter Zellzahl (E2) dargestellt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	57
Abbildung 12a: Vergleich der Beeinflussbarkeit von ruhenden (C1 und C2) und allogenstimulierten (C3) PBMCs durch die Testsubstanz ASS (J), gemessen bei verschiedenen Konzentrationen (J1-J4). Jeweils ist eine Referenzmessung ohne Testsubstanz (J5) mit aufgeführt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	59
Abbildung 12b: Einfluss von unterschiedlichen Zellkonzentrationen (E1 und E2) auf die PBMC-Aktivität in Anwesenheit der Testsubstanz ASS (J) in verschiedenen Konzentrationen (J1-J4). J5 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Testsubstanz. E3 ist fiktiv die doppelte Zellzahl von E1, das heißt der Messwert bei der Konzentration von E1 wird mit dem Faktor 2 multipliziert und im Vergleich zum tatsächlichen Messwert bei doppelter Zellzahl (E2) dargestellt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	59
Abbildung 13a: Vergleich der Beeinflussbarkeit von ruhenden (C1 und C2) und allogenstimulierten (C3) PBMCs durch die Testsubstanz Indomethacin (K), gemessen bei verschiedenen Konzentrationen (K1-K4). Jeweils ist eine Referenzmessung ohne Testsubstanz (K5) mit aufgeführt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	60
Abbildung 13b: Einfluss von unterschiedlichen Zellkonzentrationen (E1 und E2) auf die PBMC-Aktivität in Anwesenheit der Testsubstanz Indomethacin (K) in verschiedenen Konzentrationen (K1-K4). K5 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Testsubstanz. E3 ist fiktiv die doppelte Zellzahl von E1, das heißt der Messwert bei der Konzentration von E1 wird mit dem Faktor 2 multipliziert und im Vergleich zum tatsächlichen Messwert bei doppelter Zellzahl (E2) dargestellt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	61
Abbildung 14a: Vergleich der Beeinflussbarkeit von ruhenden (C1 und C2) und allogenstimulierten (C3) PBMCs durch die Testsubstanz Diclofenac (L), gemessen bei verschiedenen Konzentrationen (L1-L4). Jeweils ist eine Referenzmessung ohne Testsubstanz (L5) mit aufgeführt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	61
Abbildung 14b: Einfluss von unterschiedlichen Zellkonzentrationen (E1 und E2) auf die PBMC-Aktivität in Anwesenheit der Testsubstanz Diclofenac (L) in verschiedenen Konzentrationen (L1-L4). L5 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Testsubstanz. E3 ist fiktiv die doppelte Zellzahl von E1, das heißt der Messwert bei der Konzentration von E1 wird mit dem Faktor 2 multipliziert und im Vergleich zum tatsächlichen Messwert bei doppelter Zellzahl (E2) dargestellt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	62

Abbildung 15: Vergleich PGE2-Rezeptor Antagonisten: ASS (J), Indomethacin (K) und Diclofenac (L) im MLC-II-Test (A+B) bei den verschiedenen Substanzkonzentrationen (I-IV). Die Messwerte sind prozentual zur Referenzmessung dargestellt.	63
Abbildung 16a: 1×10^{-5} M	64
Abbildung 16b: 1×10^{-9} M	64
Abbildung 16c: 1×10^{-12} M	64
Abbildung 16d: 1×10^{-15} M	65
Abbildung 16 a-d: Einfluss verschiedener PGE2-Rezeptor Antagonisten ASS(J), Indomethacin(K) und Diclofenac(L) auf die allogene Stimulierbarkeit (MLC-II-Test) von PBMCs. In den Diagrammen a-d wird dieser Einfluss für jede der vier Substanzkonzentrationen (1×10^{-5} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-12} M und 1×10^{-15} M) einzeln dargestellt. Die Messwerte sind prozentual zur Referenzmessung dargestellt.	65
Abbildung 17a: Vergleich der Beeinflussbarkeit von ruhenden (C1 und C2) und allogen-stimulierten (C3) PBMCs durch die Testsubstanz Sulpirid (M), gemessen bei verschiedenen Konzentrationen (M1-M4). Jeweils ist eine Referenzmessung ohne Testsubstanz (M5) mit aufgeführt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	67
Abbildung 17b: Einfluss von unterschiedlichen Zellkonzentrationen (E1 und E2) auf die PBMC-Aktivität in Anwesenheit der Testsubstanz Sulpirid (M) in verschiedenen Konzentrationen (M1-M4). M5 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Testsubstanz. E3 ist fiktiv die doppelte Zellzahl von E1, das heißt der Messwert bei der Konzentration von E1 wird mit dem Faktor 2 multipliziert und im Vergleich zum tatsächlichen Messwert bei doppelter Zellzahl (E2) dargestellt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	67
Abbildung 18a: Vergleich der Beeinflussbarkeit von ruhenden (C1 und C2) und allogen-stimulierten (C3) PBMCs durch die Testsubstanz Cyproheptadin (N), gemessen bei verschiedenen Konzentrationen (N1-N4). Jeweils ist eine Referenzmessung ohne Testsubstanz (N5) mit aufgeführt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	68
Abbildung 18b: Einfluss von unterschiedlichen Zellkonzentrationen (E1 und E2) auf die PBMC-Aktivität in Anwesenheit der Testsubstanz Cyproheptadin (N) in verschiedenen Konzentrationen (N1-N4). N5 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Testsubstanz. E3 ist fiktiv die doppelte Zellzahl von E1, das heißt der Messwert bei der Konzentration von E1 wird mit dem Faktor 2 multipliziert und im Vergleich zum tatsächlichen Messwert bei doppelter Zellzahl (E2) dargestellt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	68
Abbildung 19: Vergleich Serotonin/5HT-Rezeptorantagonisten Cyproheptadin (N) und Sulpirid (M) im MLC-II-Test (A+B) bei den verschiedenen Substanzkonzentrationen O1-O4. Die Messwerte sind prozentual zur Referenzmessung dargestellt.	69
Abbildung 20a: 1×10^{-5} M	70
Abbildung 20b: 1×10^{-9} M	70
Abbildung 20c: 1×10^{-12} M	70
Abbildung 20d: 1×10^{-15} M	71
Abbildung 21a: Vergleich der Beeinflussbarkeit von ruhenden (C1 und C2) und allogen-stimulierten (C3) PBMCs durch die Testsubstanz SKF 83566 (O), gemessen bei verschiedenen Konzentrationen (O1-O4). Jeweils ist eine Referenzmessung ohne Testsubstanz (O5) mit	

aufgeführt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	72
Abbildung 21b: Einfluss von unterschiedlichen Zellkonzentrationen (E1 und E2) auf die PBMC-Aktivität in Anwesenheit der Testsubstanz SKF 83566 (O) in verschiedenen Konzentrationen (O1-O4). O5 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Testsubstanz. E3 ist fiktiv die doppelte Zellzahl von E1, das heißt der Messwert bei der Konzentration von E1 wird mit dem Faktor 2 multipliziert und im Vergleich zum tatsächlichen Messwert bei doppelter Zellzahl (E2) dargestellt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	72
Abbildung 22a: Proliferation peripherer Lymphozyten ohne Stimulation (T1), nach mitogener Stimulation (T2) und nach allogener Stimulation (T3) in Anwesenheit der Testsubstanz L-Arginin (S) in zwei verschiedenen Substanzkonzentrationen (S1 und S2), sowie eine Referenzmessung ohne Substanz (S3). Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	74
Abbildung 22b: Einfluss des Lektins PHA auf PBMCs in Anwesenheit der Substanz L-Arginin bei den Konzentrationen (1×10^{-5} M und 1×10^{-9} M). In diesem Diagramm werden zwei Referenzmessungen dargestellt: ohne Substanz und ohne PHA (R1), und mit PHA aber ohne Substanz (R2). Es handelt sich um die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	74
Abbildung 23a: Proliferation peripherer Lymphozyten ohne Stimulation (T1), nach mitogener Stimulation (T2) und nach allogener Stimulation (T3) in Anwesenheit der Testsubstanz D-/L-Cystein (U) in zwei verschiedenen Substanzkonzentrationen (U1 und U2), sowie eine Referenzmessung ohne Substanz (U3). Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	75
Abbildung 23b: Einfluss des Lektins PHA auf PBMCs in Anwesenheit der Substanz D-/L-Cystein bei den Konzentrationen (1×10^{-5} M und 1×10^{-9} M). In diesem Diagramm werden zwei Referenzmessungen dargestellt: ohne Substanz und ohne PHA (R1), und mit PHA aber ohne Substanz (R2). Es handelt sich um die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	75
Abbildung 24: Vergleich des Einflusses von L-Arginin (S) und D-/L-Cystein (U) auf die Aktivität unstimulierter (T1), mitogen-stimulierter (T2) und auf allogen-stimulierter (T3) PBMCs bei jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen (S1 und S2, sowie U1 und U2). Die Messwerte sind prozentual zur Referenzmessung dargestellt.	76
Abbildung 25a: Proliferation peripherer Lymphozyten ohne Stimulation (T1), nach mitogener Stimulation (T2) und nach allogener Stimulation (T3) in Anwesenheit der Testsubstanz 8-Bromo-cGMP (V) in zwei verschiedenen Substanzkonzentrationen (V1 und V2), sowie eine Referenzmessung ohne Substanz (V3). Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	77
Abbildung 25b: Einfluss des Lektins PHA auf PBMCs in Anwesenheit der Substanz 8-Bromo-cGMP bei den Konzentrationen (1×10^{-5} M und 1×10^{-9} M). In diesem Diagramm werden zwei Referenzmessungen dargestellt: ohne Substanz und ohne PHA (R1), und mit PHA aber ohne Substanz (R2). Es handelt sich um die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	78
Abbildung 26a: Proliferation peripherer Lymphozyten ohne Stimulation (T1), nach mitogener Stimulation (T2) und nach allogener Stimulation (T3) in Anwesenheit der Testsubstanz Zaprinast (W) in zwei verschiedenen Substanzkonzentrationen (W1 und W2), sowie eine Referenzmessung ohne Substanz (W3). Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	78

Abbildung 26b: Einfluss des Lektins PHA auf PBMCs in Anwesenheit der Substanz Zaprinast bei den Konzentrationen (1×10^{-5} M und 1×10^{-9} M). In diesem Diagramm werden zwei Referenzmessungen dargestellt: ohne Substanz und ohne PHA (R1), und mit PHA aber ohne Substanz (R2). Es handelt sich um die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	79
Abbildung 27: Vergleich des Einflusses der Testsubstanzen Zaprinast und 8-Bromo-cGMP auf die Aktivität unstimulierter (T1), mitogen-stimulierter (T2) und auf allogene-stimulierter (T3) PBMCs bei jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen (V1 und V2, sowie W1 und W2). Die Messwerte sind prozentual zur Referenzmessung dargestellt.	79
Abbildung 28a: Proliferation peripherer Lymphozyten ohne Stimulation (T1), nach mitogener Stimulation (T2) und nach allogener Stimulation (T3) in Anwesenheit der Testsubstanz L-Canavanine (X) in zwei verschiedenen Substanzkonzentrationen (X1 und X2), sowie eine Referenzmessung ohne Substanz (X3). Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	81
Abbildung 28b: Einfluss des Lektins PHA auf PBMCs in Anwesenheit der Substanz L-Canavanine bei den Konzentrationen (1×10^{-5} M und 1×10^{-9} M). In diesem Diagramm werden zwei Referenzmessungen dargestellt: ohne Substanz und ohne PHA (R1), und mit PHA aber ohne Substanz (R2). Es handelt sich um die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	81
Abbildung 29a: Proliferation peripherer Lymphozyten ohne Stimulation (T1), nach mitogener Stimulation (T2) und nach allogener Stimulation (T3) in Anwesenheit der Testsubstanz DiethylamineNONOate (Y) in zwei verschiedenen Substanzkonzentrationen (Y1 und Y2), sowie eine Referenzmessung ohne Substanz (Y3). Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	82
Abbildung 29b: Einfluss des Lektins PHA auf PBMCs in Anwesenheit der Substanz DiethylamineNONOate bei den Konzentrationen (1×10^{-5} M und 1×10^{-9} M). In diesem Diagramm werden zwei Referenzmessungen dargestellt: ohne Substanz und ohne PHA (R1), und mit PHA aber ohne Substanz (R2). Es handelt sich um die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.	82
Abbildung 30: Vergleich des Einflusses der Testsubstanzen L-Canavanine und DiethylamineNONOate auf die Aktivität unstimulierter (T1), mitogen-stimulierter (T2) und auf allogene-stimulierter (T3) PBMCs bei jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen (X1 und X2, sowie Y1 und Y2). Die Messwerte sind prozentual zur Referenzmessung dargestellt.	83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die am häufigsten verwendeten Lektine	26
Tabelle 2: Pipettierschema zur Herstellung der verwendeten Kulturmedien. Hitzeinaktivierung des FKS im Wasserbad bei 56°C für 30 Minuten. Da RPMI 1640 ohne Phenolrot kein L-Glutamin enthält, wurde dies in entsprechender Menge ersetzt.	32
Tabelle 3: Pipettierschema und Inkubationszeiten für die Proliferationstests des MLR und PHA.....	36

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin
ADCC	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
APC	antigenpräsentierende Zellen
BSF-1	B-Zell-stimulierender Faktor
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CLMF	cytotoxic lymphocyte maturation factor
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
CSI	Cyclooxygenase-spezifische Inhibitoren
CSIF	Zytokin-Synthese-inhibierender Faktor
CTL	zytotoxische T-Zellen
C α , C β , C γ	katalytische Einheit
DAG	Diacylglycerin
DMPX	3,7- Dimethyl-1-prophargylxanthin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonucleinsäure
DTH	delayed type of hypersensitivity
DZ	Dendritische Zellen
EDRF	endothelium derived relaxing factor
FACS	flußzytometrische Analysen
FKS	fetales Kälberserum
G _I	inhibierendes G-Protein
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonien-bildender Faktor
G-Proteine	GTP bindende Proteine
G _S	stimulierendes G-Protein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GvHD	graft-versus-host disease
GvL	graft-versus-leukemia
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Leukocyte Antigene
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP ₃	Inositoltriphosphat
kD	Kilodalton

Abkürzungsverzeichnis

LBP	Lipopolysaccharid-bindendes-Protein
LGL	aus dem Knochenmark stammende, große granulierte Lymphozyten
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
MAF	macrophage activating factor
MFR	Mannosyl-Fucosyl-Rezeptor
MHC	major histocompatibility complex
MIP	Makrophagen-inflammatorisches-Protein
ml	Milliliter
MLC	gemischte Lymphozytenkultur
MLR	gemischte Leukozytenreaktion
MMC	Mitomycin C
NADH	reduzierte Form des Nicotinamid-Adenin-Dinucleotids
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NK	Natürliche Killerzellen
NKSF	natural killer cell stimulatory factor
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NSA	nicht-steroidale Antiphlogistika
NSAIDs	nichtsteroidale antiinflammatorische Medikamente
PBLs	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBMC	mononukleären Zellen des peripheren Blutes
pGC	partikuläre Guanylatzyklase
PGE ₂	Prostaglandin E2
PHA	Phytohämagglutinin
PIP ₂	Phosphatidylinositolbiphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLA 2	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PMS	Phenazinmethylsulfat
RI α , RI β , RI γ	Bindungseinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI Medium	benannt nach Rosewell park memorial institute
SAC	Staphylococcus aureus Cowan strain
SCF	Stammzellfaktor
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SOD	Superoxid-Dismutase
TAA	tumorassoziierte Antigene
TCR	T-Zell-Rezeptor

Abkürzungsverzeichnis

TGF	transformierender Wachstumsfaktor
TH0-Zelle	naive Typ 0 TH-Zelle
TH1	TH-Zellen Typ 1
TH1-Zelle	Typ 1 TH-Zelle
TH2-Zelle	Typ 2 TH-Zelle
TH-Zellen	T-Helferzellen
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Fragestellung dieser Arbeit

Die Arbeit vertieft Erkenntnisse der zellulären adoptiven Immuntherapien. Sie basiert auf Ergebnissen aus Vorarbeiten einer Arbeitsgruppe im urologischen Forschungslabor der Technischen Universität München unter der Leitung von Univ. Prof. Dr. med. Rudolf Hartung. Diese Form der zellulären Immuntherapie ist höchst aktuell und stellt einen viel versprechenden Ansatz in der Behandlung onkologischer Erkrankungen dar.

In dieser Arbeitsgruppe wurde *in vitro* eine experimentelle Methode etabliert, mit der die potentielle Wirksamkeit verschiedener immunmodulierender Substanzen auf periphere mononukleäre Zellen getestet werden kann. Die verwendeten Substanzen sind nicht ausschließlich typisch für die immunologische Forschung, sondern finden überwiegend in anderen medizinischen Bereichen Anwendung.

Die mit mononukleären Zellen des peripheren Blutes durchgeführten Experimente sollen zeigen, welche Auswirkungen die jeweiligen Substanzen auf das Immunsystem haben. Dabei wurden unbehandelte Zellen und durch Substanzen beeinflusste Zellen gegenübergestellt. Die relevante, abhängige Variable der Beobachtungseinheit ist die Proliferationstendenz auf die allogene und auf die mitogene Stimulation. Dazu wurde das Testsystem der gemischten Lymphozytenkultur (MLC) verwendet. In diesem Testsystem werden die einzelnen Untergruppen der Lymphozyten nicht getrennt. Deshalb kann nur eine Aussage über die Aktivität gepoolter Lymphozyten gemacht werden.

Zunächst wird auf die methodischen Einzelheiten des in diesem Labor etablierten Versuchssystems eingegangen. Danach werden verschiedene Substanzen, von denen erwartet wird, dass sie die Immunreaktion beeinflussen können, in diesem System auf unterschiedliche Weise dokumentiert und deren Wirksamkeit interpretiert.

1.2 Allgemeine Einführung

Die Inzidenz von Krebserkrankungen nimmt seit Jahren kontinuierlich zu. Sie stellen nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar [Reinhardt et al., 1995]. Unter der umgangssprachlichen Bezeichnung Krebs versteht man alle malignen Tumore, die ungebremst in andere Gewebe wuchern und Metastasen bilden. Das Wort Krebs entlehnt sich aus dem lateinischen Wort *cancer* und dem griechischen Wort *karkinos*, wovon

sich Karzinom ableitet. Die Geschwulst ist wahrscheinlich so benannt, weil sie ähnlich wie ein heimtückisch fressender Krebs Gewebe zerstört. Eine andere Erklärung beruht darauf, dass der Begriff zunächst vor allem auf Brustkrebs angewandt wurde. Bei dieser Erkrankung malen gestaute Brustvenen eine krebsfußartige Zeichnung auf die Haut.

Die Diagnose ist für den Erkrankten von außerordentlicher Tragweite, da die Erkrankung in vielen Fällen nicht rechtzeitig erkannt wird, einen schwer vorhersagbaren Verlauf nimmt und trotz vielfältiger Therapieoptionen selten geheilt werden kann. Deshalb entwickelten sich verschiedene Forschungseinrichtungen, um der Erkrankung Krebs näher zu kommen. Die Ursachenforschung beinhaltet die Gebiete der Tumorbiologie, der Tumorummunologie, der Tumorbiochemie, sowie der allgemeinen Tumorätiologie und Epidemiologie. Die Erforschung der Grundprinzipien von Diagnostik und Therapie stellt die Verbindung zwischen Erkenntnissen der Ursachenforschung und der klinischen Behandlung von Krebs dar. Schließlich beschäftigt sich ein Forschungszweig mit der speziellen Diagnostik und Behandlung von Tumorentitäten. Die Kombination und der Ausbau dieser Forschungseinrichtung sollen die Voraussetzung für eine effizientere Bekämpfung der Erkrankung Krebs schaffen.

Die molekularbiologische Krebsforschung hat in den letzten Jahren eine umfangreiche Sammlung an Erkenntnissen hervorgebracht, in der sich einige immer wiederkehrende Grundprinzipien bei der Transformation einer normalen zu einer malignen Zelle erkennen lassen. Die dynamischen Veränderungen des genetischen Materials stellen die Grundlage für die maligne Transformation von Zellen dar. Durch die Abfolge irreversibler genetischer Veränderungen (*Multi-Hit-Theorie*) [Kinzler et al., 1996] wird das Gleichgewicht von Onkogenen, die die ungebremste Zellproliferation und malignes Zellverhalten stimulieren, und Tumorsuppressorgenen, die das Wachstum kontrollieren und den programmierten Zelltod induzieren, zerstört, und es kommt zur Entartung. Die Krebszellen entwickeln dabei Defekte in physiologischen Regelkreisen, die das normale Wachstum und Proliferation im Zellverband steuern und in engen Grenzen im Gleichgewicht halten. Dies wird als Homöostase bezeichnet. Die mannigfaltigen beschriebenen Zelldefekte lassen sich in sechs Kategorien einteilen. Die in ihrem Zusammenwirken malignes Wachstum zur Folge haben und in den meisten malignen Tumoren vorkommen [Hanahan et al., 2000]:

- (1) Eigenständigkeit in Bezug auf wachstumsfördernde Signale
- (2) Insensitivität gegenüber wachstumshemmenden Signalen
- (3) Umgehung des programmierten Zelltodes (Apoptose)

- (4) Unbegrenzte Teilungsfähigkeit
- (5) Zeitlich unbegrenzte Angiogenese
- (6) Invasion und Metastasierung

Jede dieser erworbenen Veränderungen verschafft der Zelle neue Fähigkeiten und Vorteile, die zu ihrer Selektion gegenüber den normalen Zellen führen und ihr Überleben gegenüber den krebshemmenden Verteidigungsmechanismen sichert. Zusätzlich treten die in (1)-(6) beschriebenen Veränderungen in fast allen Tumoren auf und zeigen lediglich in ihrer Abfolge in den einzelnen Tumoren eine gewisse Variabilität. Die genetische Basis der neu erworbenen Fähigkeiten von Tumorzellen ist zwar erwiesen, jedoch können Veränderungen des genetischen Materials von der Zelle normalerweise durch das sehr effizient arbeitende System aus Desoxiribonukleinsäure (DNA)-Fehlererkennung und DNA-Reparatur sehr gut korrigiert werden. Deshalb kommt als weiterer wichtiger Faktor der Tumorgenese die genetische Instabilität hinzu, die während der Stufen der Krebsentstehung immer größere Tragweite erlangt [Lengauer et al., 1998]. Vor allem die Gene der Erkennungs- und Reparaturproteine der DNA-Veränderungen gehen hier durch Mutation, Deletion und weitere Fehler verloren, so dass die Mutagenese die Entstehung von weiteren zellulären Fehlfunktionen begünstigt.

Immunologische Therapiestrategien stellen einen therapeutischen Ansatz für die Heilung von Tumorerkrankungen dar. In klinischen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass eine komplette Remission bei weit fortgeschrittener Tumoren, die mit den konventionellen Therapien nicht mehr heilbar waren, erreicht werden kann [Childs et al., 2000; James et al., 1998; Kugler et al., 2000; Trefzer et al., 2000]. Trotzdem spricht diese Immuntherapie kaum, bei der Mehrzahl dieser Patienten an. Zum einen liegt dies an der schlechten allgemeinen Immunitätslage von Patienten mit fortgeschrittenen Tumorleiden. Zum anderen tritt die generalisierte Immunsuppression hinzu, die durch tumorspezifische Suppressorzellen oder sogar durch Botenstoffe des Tumors selbst hervorgerufen wird. Aus diesem Grund ist eine wirksame Immuntherapie ohne eine ausreichende Restfunktion zellulärer Immunität wohl nicht ausreichend möglich.

Die Schwierigkeit der modernen Tumorimmunologie liegt in dem Nebeneinander eines Tumors, der tumorassoziierte Antigene exprimiert, und tumorantigenspezifische Effektorzellen des Immunsystems, die nicht in der Lage sind die Zielzellen zu zerstören.

Grundlage dieser Arbeit sind die Erkenntnisse aus Vorarbeiten meines Betreuers Herrn Dr. Dr. habil. Peter Leskovar, der ein Modell zur zellulären Intervention gegen Immundysregulation entwickelt hat [Leskovar, 1990-1995].

1.3 Das Immunsystem – historischer Überblick

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

Während die Helferzellen CD4(+) im wesentlichen für die Regulation der humoralen Immunität und die Antikörperproduktion verantwortlich gemacht worden sind, wurden die Reaktionen der Zellulären Immunität hauptsächlich den zytotoxischen/Suppressor T-Lymphozyten CD8(+) zugeschrieben [Evans et al., 1977]. Neben den zellulären Komponenten des Immunsystems wurden nach und nach auch Botenstoffe des Immunsystems identifiziert, so genannte Interleukine (IL), die die Proliferation und die Differenzierung der Zellen maßgeblich beeinflussen. Eines der zuerst charakterisierten IL war das IL-2 [Evans et al., 1977]. Die Entdeckung weiterer IL und deren Bedeutung im Immunsystem brachte einen wesentlichen Durchbruch für das Verständnis des Immunsystems. Es war nun möglich, Zellen über ihre Oberflächeneigenschaften CD4(+) oder CD8(+) hinaus nach funktionellen Gesichtspunkten zu unterteilen. Diese Einteilung geht auf Mosmann [Mosmann et al., 1986] zurück, die erstmals die unterschiedlichen T-Lymphozyten der Maus beschrieb. Dabei werden T1 Zellen, die IL-2 und Interferon (IFN)- γ produzieren und T2 Zellen, die IL-10, IL-4, IL-5 und IL-13 bilden, unterschieden. Während die T1 Zellen das zelluläre Immunsystem unterstützen, wirken die T2 Zellen besonders fördernd auf die humorale Immunantwort [Mosmann et al., 1989 und 1996]. Im menschlichen Immunsystem ist die Zugehörigkeit der T-Zellen zu den Untergruppen nicht so strikt ausgeprägt wie in der Maus, jedoch konnten T1 und T2 Gewichtungungen sowohl bei CD4(+) als auch CD8(+) T-Zellen gefunden werden [Halverson et al., 1997]. Die Unterscheidung in dieselben zwei Untergruppen kann darüber hinaus auch bei NK-Zellen vorgenommen werden [Perrit et al., 1998]. Aktuell konzentriert sich die Forschung insbesondere auf die Regulation der T1 und T2 Differenzierung durch dendritische Zellen (DZ). Dabei kann gezeigt werden, dass sowohl die T1 Zellen, als auch die T2 Zellen durch unterschiedliche DZ-Populationen, sog. DZ1 und DZ2, Zellen reguliert werden [Kadowski et al., 2001; Liu et al., 2000].

1.4 Aufbau, Funktion und Entwicklung des Immunsystems

Die Immunität des Organismus gegenüber Fremdstoffen (Antigenen) wird durch das angeborene, unspezifische und das erworbene, spezifische Immunsystem aufrechterhalten. Beide Komponenten ergänzen sich und bilden einen gemeinsamen Abwehrmechanismus. Aufgabe des angeborenen Immunsystems ist die initiale Erkennung von Krankheitserregern oder entarteten Zellen, deren Beseitigung, sowie die Einleitung der spezifischen Immunantwort durch T- und B-Zellen. Zellen des angeborenen Immunsystems (Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, DZ und NK) werden durch verschiedene mikrobielle Strukturen (Zellwandbestandteile von Bakterien, CpG-DNA, doppelsträngige Ribonukleinsäure (RNA) oder den Verlust von *major histocompatibility complex* (MHC) Klasse I-Molekülen auf somatischen Zellen aktiviert. Die Abwehrreaktionen beinhalten Phagozytose oder Sekretion antimikrobieller Enzyme und löslicher Mediatoren, wie IL und IFN.

Zellen des mononukleären Phagozytosenetzes (Monozyten, Makrophagen, myeloische Dendritische Zellen und deren Vorläufer) spielen eine besondere Rolle bei der Immunabwehr, da sie sowohl für die rasche angeborene Immunantwort, als auch für die Induktion einer spezifischen Antwort von Bedeutung sind. Insbesondere DZ sind in der Lage phagozytierte Antigene im Kontext mit MHC II zu präsentieren – die Antigen-Präsentation ist ein essentieller Schritt zur Aktivierung von naiven T-Zellen.

Pathogene Mikroorganismen entgehen oftmals den Mechanismen der angeborenen Immunität (Komplementsystem, Granulozyten- und Makrophagen-System, NK). Die Erkennung der Antigene ist hier unspezifisch und ihre Elimination erfolgt im Rahmen einer Entzündungsreaktion. Daher entwickelten sich wirksamere und individuellere Abwehrmechanismen. Antikörper, die von B-Lymphozyten gebildet werden, und T-Lymphozyten sind die Effektoren der erworbenen spezifischen Immunität. Über die variablen Regionen des Antikörpers beziehungsweise des T-Zell-Rezeptors können antigene Determinanten wie ein exakt passender Schlüssel spezifisch gebunden und einer effektiven Abwehrkaskade zugeführt werden. Dabei vermittelt das B-Zellsystem die humorale Immunität und das T-Zellsystem die zelluläre (zellvermittelte) Immunität. Das humorale Immunsystem wird durch B-Zellen unterschiedlicher Reifungsstadien gebildet, die von der Stammzelle bis zur eigentlichen Effektorzelle, der Plasmazelle mit ihrem Produkt, den Antikörpern, reichen. Auch beim zellulären Immunsystem erfolgt eine Differenzierung der T-Zellen in Effektorzellen und zwar in TH-Zellen und zytotoxische T-Zellen. Auf TH-Zellen wird der Korezeptor CD4, auf zytotoxischen T-Zellen der Korezeptor CD8 expri-

miert. Es lassen sich zwei Immunitätstypen unterscheiden, die humorale Immunität und die zellvermittelte Immunität.

Bei der humoralen Immunität erkennen und binden Antikörper an extrazelluläre Erreger, beziehungsweise deren Toxine (Antigene), und aktivieren Makrophagen. Die Elimination dieser Antigene erfolgt durch Phagozytose und wird durch die Aktivierung des Komplementsystems, der so genannte klassischer Pfad, über die Fc-Regionen der Antikörper noch optimiert. Antikörper werden von Plasmazellen produziert. Diese entwickeln sich aus B-Lymphozyten, die jeweils nur Antikörper einer Spezifität produzieren.

B-Lymphozyten tragen ihre Antikörper als Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Nach Bindung eines Antigens und Stimulation durch TH-Zellen proliferiert die B-Zelle zum B-Zellklon, wobei sie von der membrangebundenen auf die sekretorische Antikörperproduktion umschaltet. Einige B-Lymphozyten differenzieren sich zu langlebigen Gedächtniszellen. Der zweite Kontakt mit dem gleichen Antigen erlaubt daraufhin eine raschere und intensivere Abwehrreaktion des Körpers. Antikörper der Klasse Immunglobulin (Ig) E, die an der Oberfläche von Mastzellen gebunden sind, führen bei Antigenkontakt zur Mastzellendegeneration mit Histaminausschüttung [Roitt, 1993].

Im Gegensatz zur humoralen Immunität werden bei der zellvermittelten Immunität intrazelluläre Erreger durch die infizierten Zellen prozessiert, das heißt proteolytisch zerlegt, und in Verbindung mit Molekülen des MHC auf der Zelloberfläche präsentiert. Solche antigenpräsentierenden Zellen (APC) sind DZ als professionelle antigenpräsentierende Zellen sowie Makrophagen, Monozyten und B-Lymphozyten. Die präsentierten Antigene intrazellulärer Erreger können so spezifisch von den T-Zell-Rezeptoren der T-Lymphozyten erkannt werden. Auch T-Lymphozyten proliferieren nach Antigenkontakt und bilden Effektor- und Gedächtniszellen. TH-Zellen (CD4(+)) erkennen Antigene in Verbindung mit MHC-Klasse-II-Molekülen. Sie aktivieren Makrophagen durch Freisetzung von Zytokinen und ermöglichen so die intrazelluläre Abtötung der Mikroorganismen. Zytotoxische T-Zellen CD8(+), die ihr spezifisches Antigen in Verbindung mit MHC-Klasse-I-Molekülen auf Zelloberflächen erkennen, töten die infizierte Zelle ab, bevor sich die Erreger intrazellulär vermehren können [Roitt, 1993].

Zusätzlich existiert die antikörperabhängige, zellvermittelte Immunität, *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC). Hier wird die quasi angeborene zytotoxische Wirkung von NK durch Antikörper verstärkt. Der Antikörper bindet spezifisch an die Oberfläche der infizierten Zelle und wird wiederum vom Antikörperrezeptor (FC-Rezeptor) der NK gebunden. So wird die NK ihrem Ziel angenähert beziehungsweise auf ihr Ziel konzentriert (*Targeting*) [Roitt, 1993].

1.5 TH 1- und TH 2- vermittelte Immunantwort

Zytokine sind lösliche Proteine mit einem Molekulargewicht von 6-70 kD, die von jeder kernhaltigen Zelle des Organismus gebildet werden und ihre Wirkung über spezifische Rezeptoren auf der Zellmembran, aber auch in der Zelle entfalten. Als Botenstoffe des Immunsystems steuern Zytokine die Kommunikation zwischen Immunzellen, kontrollieren die Proliferation und Differenzierung von Leukozyten, unterstützen die Induktion von Immunreaktionen und können Entzündungsreaktionen sowohl verstärken, als auch supprimieren. Zytokine können durch Beeinflussung der Genexpression maßgeblich die Differenzierung einer Zelle steuern. Umgekehrt erlaubt das von einer Zelle produzierte Zytokinmuster einen Rückschluss auf die Differenzierung der Zelle.

Naive TH-Zellen sind TH-Zellen ohne vorherigen Antigenkontakt. Sie reagieren auf Antigene, die in Verbindung mit MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden, indem sie IL-2 bilden und proliferieren. Dadurch entstehen unreife T-Effektorzellen, die als naive Typ 0 TH-Zelle (TH0-Zellen) bezeichnet werden. In einem zweiten Schritt differenzieren sich diese TH0-Zellen unter Einwirkung von Interleukinen zu Typ 1 TH-Zelle (TH1)- oder Typ 2 TH-Zellen (TH2-Zellen). Warum sich die TH0-Zellen in die eine oder andere Richtung entwickeln, ist weitgehend unklar. Sicher spielen die Art des Antigens und die durch das Antigen stimulierten Zytokine eine Rolle. Die Differenzierung naiver TH-Zellen in eine der beiden Subpopulationen (TH1- und TH2-Zellen) beeinflusst in hohem Maße, auf welchem der im vorangehenden Kapitel beschriebenen Wege eine Immunantwort abläuft, sinngemäß auf welchem Weg ihr sozusagen geholfen wird.

1986 beschrieben Mosmann, Coffman und Mitarbeiter erstmals, dass geklonte murine TH-Zellen hinsichtlich ihres Zytokinsekretionsmusters in zwei funktionell unterschiedliche TH-Zellsubpopulationen unterteilt werden können:

TH1-Zellen produzieren $\text{IFN}\gamma$. Für TH2-Zellen ist die Produktion von IL-4 charakteristisch [Mosmann et al., 1986].

Einige der immunregulatorischen Zytokine sind in der Lage, nicht nur die Zytokinproduktion einer T-Helferzellsubpopulation anzuregen, sondern gleichzeitig die Zytokinproduktion der anderen T-Helferzellsubpopulation zu unterdrücken.

Beispielsweise inhibiert IL-4 die Produktion von $\text{IFN}\gamma$ in TH1-Zellen und $\text{IFN}\gamma$ die Produktion von IL-4 in TH2-Zellen [Mosmann und Coffman, 1989, Paludan, 1998].

Die isolierte Betrachtung klonierter TH1- und TH2-Zellen leistet einen wichtigen Beitrag bei der Erforschung von Immunregulationsmechanismen, dennoch kann damit die Komplexität einer *in vitro*-Immunantwort nicht umfassend wiedergespiegelt werden. Nach dem Vorschlag von Bloom spricht man daher heute von *TH1- und TH2-like* oder Typ1- und Typ2-Zytokinen beziehungsweise –Zellen [Bloom et al., 1992].

Typ1-Zytokine umfassen $\text{IFN}\gamma$, IL-2, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) α und TNF β . IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 und wahrscheinlich auch IL-9 zählen zu den Typ2-Zytokinen.

Weiterhin existieren für die Immunregulation wichtige Zytokine, beispielsweise IL-12, die weder von TH1- noch von TH2-Zellen sezerniert werden. Andererseits werden einige der Typ1- und Typ2-Zytokinen nicht nur von TH-Zellen, sondern auch von verschiedenen anderen Lymphozyten und sogar von nicht hämatopoetischen Zellen produziert.

Die Unterscheidung zwischen Typ1- und Typ2-TH-Zellen erfolgt derzeit über den Nachweis der unterschiedlichen Zytokinsekretionsmuster. Auch die intrazelluläre Anfärbung der Zytokine mit anschließender flowzytometrischer Analyse kann zur Identifikation der beiden TH-Zellensubpopulationen herangezogen werden [Pala et al., 2000].

Die Identifikation spezifischer Oberflächenantigene für TH1- und TH2-Zellen und die damit verbundene Möglichkeit der unterschiedlichen Markierungen und flowzytometrischen Trennung würde das Studium dieser Zellen erleichtern. Bisher wurden verschieden so genannte Markerkandidaten zur Unterscheidung von TH1 und TH2-Zellen mit unterschiedlichen und sich zum Teil auch widersprechenden Ergebnissen untersucht [Lucey et al., 1996]. Zur Charakterisierung von TH1- und TH2-Zellen haben sich diese Oberflächenantigene allerdings bisher nicht durchgesetzt.

Eine TH1-vermittelte Immunantwort wird durch das Vorherrschen der zellulären Immunreaktion charakterisiert. Die Ausschüttung von Typ I-Zytokinen führt zur Aktivierung des Monozyten-/Makrophagensystems, sowie zur Aktivierung zytotoxischer T-Zellen [Romagnani, 1996]. Es kommt zu einer Entzündungsreaktion. Zudem induziert $\text{IFN}\gamma$ die Umschaltung auf die Antikörperklasse IgG_{2a} (*class-switch*) und die Expression des Fc-Rezeptors Fc γ RI/III auf Makrophagen [Snapper et al., 1987, Paludan, 1998].

IgG_{2a} und Fc γ RI/III vermitteln eine ADCC, die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und die Phagozytose mit Bildung von Sauerstoffradikalen [Austyn et al., 1993]. Auch die zellvermittelte Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ (*delayed type of hypersensitivity*, DTH) wird als Typ 1-Reaktion betrachtet [Romagnani, 1996].

Eine TH2-vermittelte Immunantwort wird durch die Aktivierung von B-Lymphozyten und die Vermittlung der humoralen Immunität gekennzeichnet. IL-4 stimuliert den Antikörper-*class-switch* zu IgG₁ und IgE sowie die Expression des Fc-Rezeptors FcεRII CD23 auf Makrophagen und B-Lymphozyten [Snapper et al., 1987, Paludan, 1998]. Es kommt zur Hypergammaglobulinämie, Eosinophilie, Basophilen-/Mastzellendegranulation (Überempfindlichkeitsreaktion von anaphylaktischen Typ) und Antigenpräsentation durch B-Zellen [Paludan, 1998]. Auch die Schleimhautimmunität, vermittelt durch sekretorisches IgA, wird unterstützt [Romagnani, 1996].

Nach der Identifizierung muriner TH1- und TH2-Zellen 1986 durch Mosmann, Coffman und ihre Kollegen gelang es vor allem der Gruppe um Romagnani, bei bestimmten, vor allem chronisch erkrankten Personen, humane TH1- und TH2-Zellen nachzuweisen (Übersichten bei Romagnani, 1996 und 2000). Seither konnte bei vielen Erkrankungen oder Zuständen, in deren (Patho-)Genese Immunregulationsvorgänge involviert sind, die Dominanz einer TH1- oder TH2-vermittelten Immunantwort demonstriert werden. Die genauere Kenntnis der in bestimmten Krankheitsstadien vorherrschenden Reaktionsart wird sicherlich in Zukunft zunehmend immuntherapeutisch genutzt werden.

Bei der Abwehr von Viren und anderen intrazellulären Erregern stellt die zellvermittelte Immunantwort durch zytotoxische T-Zellen den effektivsten Mechanismus dar. Dies kommt insbesondere zum Ausdruck bei Infektionen mit dem intrazellulären Bakterium *Chlamydia trachomatis*, die zur tubaren Sterilität führen können. Für die Bekämpfung dieses Erregers wurde die Notwendigkeit einer TH1-vermittelten Immunantwort im Tiermodell nachgewiesen [Van Voorhis et al., 1996]. Dementsprechend ist die Expression von IFN γ essentiell für die Kontrolle chlamydialer Infektionen des Genitaltrakts [Arno et al., 1990, Cotter et al., 1997]. Diese protektive proinflammatorische TH1-vermittelte Immunantwort kann jedoch neben der Erregervernichtung auch zur irreversiblen Schädigung der Eileiter führen.

Die Zielzellen des *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) sind zytokinproduzierende T-Helferzellen. Die HIV-Infektion ist mit einer verminderten Produktion des Typ1-Zytokins IL-2, welches die zellvermittelte Immunität stimuliert, verbunden. Demgegenüber ist die humorale Immunität aktiviert. Es kommt zu Hypergammaglobulinämie und Eosinophilie [Levy, 1994]. Diese Daten führen zur Formulierung der nicht unumstrittenen Hypothese, derzufolge bei der HIV-Infektion ein Zytokin-shift von Typ1 zu Typ2 stattfindet [Clerici et al., 1994, Clerici et al., 2000, Romagnani et al., 1994]. Auf dieser Hypothese basiert die Annahme, dass eine starke Typ1-Zytokinproduktion und eine aufrechterhaltene zelluläre Immunität mit einer fehlenden Progression der HIV-Infektion einhergehen müsse. Die Typ1- und Typ2-Zytokinproduktion von

Patienten mit schon lange bestehender HIV-Infektion, die eine stabile CD4(+)-Zellzahl und keine Krankheitszeichen aufwiesen und von Patienten mit progressivem Krankheitsverlauf, wurden daraufhin untersucht und verglichen. Die *in vitro* Phytohämagglutinin (PHA)-stimulierten mononukleären Zellen der Patienten ohne Krankheitsprozess zeigten im Vergleich zu Patienten mit progressivem Krankheitsverlauf eine signifikante Erhöhung der Typ1-Zytokinproduktion und eine signifikante Reduktion der Typ2-Zytikinproduktion [Clerici et al., 1994, Clerici et al. 1996, Ullum et al., 1997]. Es korrelierte, wie angenommen, die Dominanz der Typ2-Zytokine mit einem progredienten Krankheitsverlauf. Eine weitere Untersuchung zeigte, dass Nabelschnurleukozyten von nichtinfizierten Kindern HIV-positiver Mütter nach Phytohämagglutinen (PHA)-Stimulation eine höhere IFN γ /IL-10-Ratio aufwiesen als infizierte Kinder [Kuhn et al., 2001]. Eine stärkere relative Produktion des Typ1-Zytokins IFN γ im Vergleich zum Typ2-Zytokin IL-10 war mit der Protektion vor einer perinatalen vertikalen HIV-Infektion assoziiert.

Mithin lässt sich feststellen, dass eine verstärkte TH1-vermittelte zelluläre Immunantwort dem Fortschreiten und der vertikalen Transmission der HIV-Infektion entgegenwirkt.

Möglicherweise lassen sich die hier beispielhaft erläuterten Immunregulationsmechanismen für *Chlamydia trachomatis*- und HIV-Infektionen auf Infektionen mit anderen intrazellulären Mikroorganismen ausweiten. Die Übertragung oder Abwehr von intrazellulären Mikroorganismen würde analog dazu durch eine Inhibition der TH1-vermittelten zellulären Immunantwort und/oder eine Dominanz der TH2-vermittelten humoralen Immunantwort kompromittiert.

Sicherlich sind Immunregulationsvorgänge *in vitro* zu komplex, um in ein starres dichotomes TH1/TH2-System gepresst zu werden. Es handelt sich vielmehr um ein interaktives Netzwerk, in dem temporär ein bestimmter Reaktionsweg bevorzugt eingeschlagen wird, um das gemeinsame Ziel, beispielsweise die Erregervernichtung, zu erreichen. Dennoch stellt das TH1/TH2-Modell ein nützliches Schema zum besseren Verständnis der unterschiedlichen immunologischen Regulationsmechanismen dar und wird so auch zur Entwicklung neuartiger immunologischer Therapieansätze beitragen.

1.6 Monozytäre Zellen

An vorderster Front der zellulären Abwehr stehen die Makrophagen deren Aufgabe in der Aufnahme körperfremden Materials und dessen Zerstörung besteht.

Monozytäre Zellen stellen außerdem einen erheblichen Anteil der APC. Sie sind an Stellen im Organismus platziert, die besonders stark von körperfremdem Material frequentiert werden.

Dazu gehören die Langerhans-Zellen, die Antigene aus der Haut in die Lymphknoten tragen, wo sie mit TH-Zellen in Kontakt kommen. DZ befinden sich in Sekundärfollikeln überwiegend B-lymphozytär besiedelter Gebiete im Lymphknoten und in der Milz, wo sie mit B-Zellen interagieren.

Des Weiteren gibt es *von Kupfer'sche Sternzellen* am Rand der Lebersinusoide, Alveolarmakrophagen in der Lunge, die Mikroglia des Gehirns, Makrophagen im interglomerulären Mesangium der Niere und Serosamakrophagen. Sie alle leiten sich von myeloischen Stammzellen ab, die die monozytären Zellen hervorbringen. Die Monozyten stellen den zirkulierenden Blutpool dieses Systems dar. Sie haben einen Durchmesser von 10-18 μm , einen charakteristischen hufeisenförmigen Kern und sind reich an Lysosomen und deren Enzymen Peroxidase und saure Hydrolasen, die der Verdauung ingestierten Materials dienen.

In vitro verbinden sich die monozytären Zellen fest mit der Oberfläche von Glas und Plastikgefäßen.

Die Adhärenz an Fremdmaterial wird durch spezielle Rezeptoren ermöglicht, die hohe Affinität zu IgG und Komplement haben. Ein häufig für die Erkennung von Monozyten verwandter Marker ist CD14 (*cluster of differentiation*), der Rezeptor für Lipopolysaccharid-bindendes-Protein (LBP), wodurch die Interaktion mit Gram-negativen Keimen möglich wird. Der Mannosyl-Fucosyl-Rezeptor (MFR) hat hohe Affinität zu Zuckern in der Wand von entsprechend umhüllten Bakterien. Ebenso wichtig für die Funktion von Monozyten sind Rezeptoren für die Fc-Komponenten von IgG, die sich durch ihre Affinität unterscheiden und für die Opsonierung extrazellulären Materials zuständig sind:

Fc γ RI, II und III, beziehungsweise CD64, CD32 und CD16.

Des Weiteren finden sich auf der Oberfläche von Monozyten Komplementrezeptoren, die die Aufnahme von Mikroorganismen erleichtern:

CR1 für C3 (CD35) und CR3 für C3bi (CD11b)

Fungieren Monozyten als APC, so exprimieren sie MHC-Klasse-II. Je nach Differenzierung finden sich weitere Oberflächenmerkmale auf Zellen der monozytären Reihe. Diese Differenzierung wird unter anderem von Zytokinen gesteuert, die teilweise von aktivierten Monozyten selbst produziert werden oder von TH-Zellen stammen. Die Zytokine spielen auch bei der Proliferation von Monozyten und deren Aktivierung gegenüber verschiedenen Antigenen eine entscheidende Rolle, was bei der Besprechung der einzelnen IFN und IL noch zur Sprache kommen wird. [Lydard et al., 1993; Roitt et al., 1993]

Monozyten gehören zu den wesentlichen Produzenten von IL-12 [D'Andrea et al., 1992; Trinchieri, 1993; Hayes et al., 1995; Snijders et al., 1996].

1.7 Natürliche Killerzellen

Vor über 20 Jahren wurden erstmals NK als eigene Subpopulation von Leukozyten identifiziert [Saksela et al., 1979]. Seitdem existiert dank anhaltendem Fortschritt in zell- und molekularbiologischen, sowie immunologischen Untersuchungsmethoden eine enorme Informationsfülle über die Funktion und Regulationsmechanismen der NK innerhalb des adaptiven Immunsystems [Lanier et al., 1998; Long et al., 1999].

NK sind aus dem Knochenmark stammende, große granulierte Lymphozyten (LGL) [Burshtyn et al., 1997], die sich zusammen mit T-Lymphozyten aus einer gemeinsamen Knochenmarkstammzelle entwickeln [Spitz et al., 1995]. Anders als die T-Lymphozyten benötigen NK weder RAG-Gene [Mombaerts et al., 1992; Shinkai et al., 1992] für ihre Entwicklung noch den Thymus als Ausreifungsort [Spitz et al. 1995]. Ihr Anteil an der Gesamtlymphozytenzahl des peripheren Blutes liegt zwischen fünf und 20 Prozent. In der Milz von Kindern und Erwachsenen sind sie zu etwa fünf Prozent vertreten [Trinchieri, 1989], wobei durch flußzytometrische Analysen (FACS) unter Nutzung des NK-typischen Oberflächenepitop-Markers CD56 einen Anteil von 25% an den in der Milz lokalisierten Lymphozyten zeigten [Witte, 1989].

Als Effektorzellen der angeborenen Immunantwort agieren NK gegen pathogene Viren, intrazelluläre Bakterien und Parasiten [Biron et al., 1999; Scott et al., 1995; Unanue, 1997]. Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle in der frühen Phase der Immunrestitution nach einer Knochentransplantation [Jacobs, 1993] und als Abwehrzellen gegenüber malignen Tumoren [Biron et al., 1999; Whiteside et al., 1995]. Durch Freisetzung ihrer azurophilen Granula, die Perforin und Granzyme enthalten, führen NK ohne vorherige Sensibilisierung zum programmierten Zelltod (Apoptose) transformierter oder infizierter Zellen [Smith et al., 2000]. Beim Fehlen von NK oder NK-defekten wie dem Chediak-Steinbrinck-Higachi-Syndrom oder dem lymphoproliferativen Syndrom X steigt demzufolge die Inzidenz viraler Infektionen und maligner Tumorerkrankungen deutlich an [Haliotis et al., 1980; Sullivan et al., 1980].

NK erfüllen in der Frühphase einer Immunantwort eine weitere wichtige Aufgabe. Sie können sofort Zytokine bilden und freisetzen, wohingegen die eigentlich dafür verantwortlichen T-Lymphozyten für ihre immunologische Antwort längere Zeit benötigen, insbesondere IFN γ [Bancroft et al., 1987; Lanier, 1998]. TNF α [Scharton-Kersten et al., 1997], Granulozyten-Makrophagen-Kolonien-bildender Faktor (GM-CSF) [Kim et al., 1998], Lymphotactin,

Lymphotoxin [Cuturi et al., 1987], IL-3, IL-5, IL-8, IL-10, IL-13 [Warren et al., 1995], MIP-1-alpha und MIP-1-beta (Makrophagen-inflammatorisches-Protein) [Bluman et al., 1996] werden von NK produziert.

NK lassen sich ebenso wie T-Zellen anhand ihrer exprimierten Oberflächenmoleküle identifizieren. Charakteristisch für NK ist die Expression von CD56 und CD16, sowie das Fehlen von CD3 (typisch für T-Lymphozyten). CD16 (FcγRIII) ist ein Rezeptor für die Fc-Region von IgG [Daeron, 1997], der die NK zur ADCC befähigt [Lanier, 1983; Perussia et al., 1983].

Die Zielzellerkennung der NK kann antikörpervermittelt oder unmittelbar erfolgen, wozu in beiden Fällen verschiedene Rezeptoren benötigt werden.

Die unmittelbare Zielerkennung der NK unterscheidet sich grundlegend von der der zytotoxischen T-Zelle, die mittels ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) an MHC gebundene Fremdpeptide erkennt und sich durch diese aktivieren lässt [Townsend et al., 1989]. Im Gegensatz dazu wird die NK durch eine auf der Zielzelle verminderte oder gänzlich fehlende Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen stimuliert (*Missing-self-Hypothese*) [Kärre, 1985; Kärre 1997; Reyburn et al., 1997].

Es ist bekannt, dass Tumorzellen und virusinfizierte Zellen MHC-Klasse-I-Moleküle regulieren und somit einer Immunüberwachung durch T-Zellen entgehen. NK können diese Zellen erkennen und lysieren, während sie gesunde Zellen verschonen [Long et al., 1997; Parham, 1997]. Hierzu benutzen sie zum einen aktivierte Rezeptoren, die zur Zelllyse führen, und zum anderen inhibierende Rezeptoren, die NK-Zell-Aktivierung regulieren. Die Homöostase beider Rezeptortypen bestimmt das jeweilige Verhalten der NK [Long et al., 1997; Vales-Gomez et al., 2000a, Vales-Gomez et al., 2000b].

Abhängig von ihrem Genotyp und ihrem Aktivierungsstatus können NK im Rahmen einer Knochenmark- beziehungsweise einer Stammzellentransplantation sowohl nützlichen als auch schädlichen Einfluss ausüben. Die Bedeutung der NK wurde bei der *graft-versus-host disease* (GvHD), der Transplantatabstoßung sowie der *graft-versus-leukemia* (GvL)-Reaktion nachgewiesen [Murphy et al., 1993; Ruggeri et al., 1999].

1.8 Dendritische Zellen

Normalerweise werden T-Zellen von professionellen APC aktiviert. Dazu zählen neben den Makrophagen und den aktivierten B-Zellen die DZ.

DZ spielen eine wichtige Rolle bei der spezifischen humoralen und zellulären Immunreaktion. Sie gelten als die effizientesten Antigen präsentierenden Zellen [Steinmann, 1991], die in hohem Maße MHC-I- und MHC-II-Moleküle und kostimulatorische Signalmoleküle exprimieren.

DZ wurden bereits 1868 als Langerhans Zellen der Epidermis beobachtet, und wurden erstmals 1973 von Steinmann und Kollegen beschrieben [Steinmann et al., 1973]. DZ sind vom Knochenmark abstammende APC, die für die Induktion einer primären als auch sekundären T-Zellvermittelten Immunantwort erforderlich sind [Steinmann, 1991; Caux et al., 1995]. Als APC sind sie darauf spezialisiert Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und diese im Komplex mit MHC-I- und MHC-II-Molekülen naiven T-Zellen zu präsentieren. Sie umfassen ein System, das im nicht-lymphatischen Gewebe aller Organe mit Ausnahme des Gehirns, Teile der Augen und der Testes [Hart, 1997], im lymphatischen Gewebe, dem Blut und der afferenten Lymphe vertreten ist.

Im nicht-lymphatischen Gewebe sind sie als Langerhans Zellen in den Epithelien der Haut, der Mukosa und der Lunge vertreten, im Interstitium der meisten Organe als interstitielle DZ. Im Blut repräsentieren sie die Blut-DZ, in der afferenten Lymphe die afferenten lymphatischen DZ und in den lymphatischen Geweben wie den zellreichen Arealen innerhalb der sekundären lymphatischen Organe werden sie als interdigitierende DZ bezeichnet. Außerdem sind sie, sowohl in der Medulla des Thymus vorzufinden, als auch in den B-Zell-Follikeln der sekundären lymphoiden Organen, wo sie als *germinal center* DZ bezeichnet werden.

Obwohl die Beziehung zwischen den verschiedenen DZ-Populationen noch nicht vollständig verstanden ist, ist man der Annahme, dass sie verschiedene Differenzierungsstadien repräsentieren, die mit den Zirkulationswegen verbunden sind [Steinmann, 1991].

DZ haben die Fähigkeit endogene Proteine mittels MHC-I-Molekülen und exogene Proteine über MHC-II-Moleküle zu präsentieren. Dies ermöglicht sowohl eine Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen, als auch von TH-Zellen. DZ besitzen außerdem einen Weg für den Export exogener Antigene von endozytotischen Kompartimenten ins Zytosol. Dieser Transportweg ist auf DZ beschränkt und spezifisch für internalisierte Proteine. Die Existenz dieses Membran-Transportweges zeigt die Möglichkeit der DZ auf, internalisierte Antigene auch über MHC-I-Moleküle zu präsentieren [Rodrigues et al., 1999], was auch als *cross-priming* bezeichnet wird. In den Lymphknoten bilden die DZ über verschiedene Adhäsionsmoleküle, im besonderen CD54, CD50 und CD58, die verstärkt von reifen DZ exprimiert werden, Aggregate mit den T-Zellen. Die Interaktion der DZ mit den T-Zellen wird durch die spezifische Bindung des T-Zellrezeptors an den MHC-Peptid-Komplex stabilisiert, welches das erste Signal für die Akti-

vierung der T-Zellen darstellt. Ein zweites kostimulatorisches Signal ist unbedingt erforderlich, um die Zellproliferation zu ermöglichen und T-Zellanergie zu verhindern. Dieses Signal wird durch die Interaktion von CD80 und CD86, die beide von DZ exprimiert werden, mit CD28 auf T-Zellen übermittelt.

Die Verfügbarkeit großer Mengen an DZ, sowie die Identifikation vieler tumorassoziierter Antigene (TAA) in jüngster Zeit, haben neue Möglichkeiten für Vakzinierungstherapien geschaffen, besonders im Hinblick auf die Generierung einer zytotoxischen T-Zellantwort gegen Tumorantigene. In Tiermodellen wurde bereits gezeigt, dass durch TAA-beladene DZ eine Tumorprotektion und sogar eine Regression etablierter Tumore induziert werden kann [Mayor-domo et al., 1995; Celluzzi et al., 1996]. Weitere Beladungsstrategien für DZ, die erfolgreich durchgeführt wurden, sind die Beladung DZ mit Tumorzellsat [DeMatos et al., 1998] oder die Fusionierung DZ mit Tumorzellen [Gong et al., 2000].

1.9 Zytokine

1.9.1 Interleukin 4

IL-4 wird in der vorherrschenden Literatur als prototypisches immunregulatorisches Zytokin bezeichnet. Das 20 kD große Molekül wird hauptsächlich von TH-Zellen Typ2 (TH2), den biologisch wirksamsten Helfern der B-Zellen, sowie von Mastzellen gebildet. Umgekehrt beeinflusst IL-4 die Differenzierung von CD4(+) T-Lymphozyten zum Subtyp der TH2-Zellen [Swain et al., 1990, Brown et al., 1997].

1982 haben die Erstbeschreiber IL-4 als Proliferationsinduktor für Anti-IgM-aktivierte B-Zellen identifiziert und B-Zell-stimulierender Faktor (BSF-1) genannt [Howard et al., 1982]. Allerdings vermittelt es darüber hinaus nicht wenige andere B-Zell-Antworten, wie erhöhte Expression von MHC Klasse II-Molekülen auf der Oberfläche der B-Zellen [Noelle et al., 1984; Brown et al., 1987], was deren Kapazität auf andere B-Zell-Stimuli zu reagieren und wiederum antigene Domänen den T-Zellen zu präsentieren, erhöht.

Ein weiteres Oberflächenmolekül, dass durch IL-4 auf B-Zellen hochreguliert wird ist CD23, der niedrig affine Fc_ε-Rezeptor [Defrance et al., 1987; Brown et al., 1997]. Durch IL-2 ausgelöste Effekte in B-Zellen, vor allem die Proliferation, werden durch IL-4 antagonisiert, indem der aktivierte IL-2-Rezeptor herunterreguliert wird; eine Wirkung, die durch IFN γ aufgehoben werden kann [Ibelgauf, 1992], und wie man mittlerweile weiß, auch durch IL-12:

IL-12 ist für IL-2 der stärkste kostimulatorische Proliferations- und Differenzierungsfaktor von hochaufgereinigten B-Zellen *in vitro* [Jelinek et al., 1995].

In den frühen neunziger Jahren beobachteten dann verschiedene Arbeitsgruppen einen regulatorischen Effekt von IL-4 auf die Apoptose in normalen und in transformierten B-Zellen [Brown et al., 1997]. Eine der wichtigsten Funktionen von IL-4 *in vitro* ist unbestritten die Regulation des Ig-Isotypen-switching hinsichtlich einer gesteigerten Sekretion von IgG und IgE, ein Synonym für IL-4 ist *IgE-enhancing-factor*.

IL-4 hat aber auch Effekte auf andere Zellsysteme. Bereits auf der Ebene der Hämatopoiese nimmt es eine Schlüsselrolle in der Zelldifferenzierung ein, wobei es zum Teil im Zusammenspiel mit Stammzellefaktor (SCF), die Vorläufer sämtlicher myeloider Zellreihen, sowohl fördernd, als auch inhibitorisch beeinflussen kann [Keller et al., 1994]. Die gesteigerte Differenzierung von CD4(+)-T-Zellen zum TH2-Subtyp wurde bereits erwähnt. Ein weiteres Synonym für IL-4 ist *T-cell-growth-factor-2*. Die zytotoxische Zellaktivität kann unabhängig vom experimentellen System durch IL-4 angeregt oder gehemmt werden.

Des Weiteren beeinflusst IL-4 Zellen, die an der späten Phase entzündlicher Reaktionen teilhaben. Es ist ein Proliferationsfaktor für Endothelzellen und regt die Zytokinproduktion dieser Zellen an. Es steigert die Phagozytoseaktivität von neutrophilen Granulozyten. Hier hat es synergistische Effekte mit GM-CSF. Für eosinophile Granulozyten ist es chemotaktischer Faktor und steigert die Expression von CD23 [Brown et al., 1997].

Zu den inhibitorischen Effekten von IL-4 gehört die Unterdrückung der Expression von IL-1, IL-6 und TNF α in Monozyten. Eine Vorbehandlung von Makrophagen mit IL-4, die anschließend mit bakteriellen Endotoxinen oder IFN γ in Kontakt gebracht werden, führt zu gesteigerter Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen, und verhindert gleichzeitig die Bildung proinflammatorischer Mediatoren wie IL-1, TNF α , und Prostaglandin E2 (PGE₂) [Feldmann, 1996; Ibelgauf, 1992]. Bei NK kommt es unter IL-4 Einfluss zur Bremsung der durch IL-2-induzierten Aktivität [Ibelgauf, 1992].

Klinischen Nutzen erhofft man sich aus der Bedeutung, die IL-4 für die Entwicklung allergischer Reaktionen hat. Es ist ein Wachstumsfaktor für Mastzellen, der erhöhte IgE-Spiegel hervorruft. Hohe IL-4-Spiegel sind assoziiert mit atopischer Dermatitis und Heufieber [Brown et al., 1990; Ricci, 1994].

In der Erforschung von Autoimmunerkrankungen und in der Transplantationsmedizin erhofft man sich einen Nutzen vom Einsatz von IL-4.

Dagegen können die IL-4-Wirkungen in Zusammenhang mit Infektionen je nach Erreger protektiver, aber auch destruktiver Natur sein. Das gleiche duale Verhalten findet man auch bei weiteren Tumormodellen [Brown und Hural, 1997].

Genaue Kenntnisse über die Zusammenhänge bestehen bislang nur *in vitro* oder im Tiermodell. Im Regelfall agiert dort IL-12 als TH1-Zytokin als Gegenspieler zum TH2-Zytokin IL-4, beispielsweise bei der murinen Leishmaniainfektion, bei der Mäuse mit überwiegend TH2-Antwort dem Erreger erliegen, es sei denn, sie werden mit IL-12 behandelt [Trinchieri, 1994].

1.9.2 Interleukin 10

IL-10 wurde erstmals 1989 als Zytokin-Synthese-inhibierender Faktor (CSIF) von Fiorentino und Mitarbeitern beschrieben [Fiorentino et al., 1989]. Es ist ein 35 bis 40 kDa großes und aus 178 Aminosäuren aufgebautes, säurelabiles Protein, das von aktivierten T-Zellen, überwiegend von TH2 Zellen, produziert wird [Moore et al., 1993, Mosmann, 1994].

Man fand eine aus murinen TH2-Zellen stammende Aktivität, die die IFN γ -Produktion von TH1-Zellen supprimierte [Fiorentino et al., 1989]. Daher wurde das Polypeptid zunächst Zytokin Synthese inhibierender Faktor genannt.

IL-10 wird hauptsächlich von T-Lymphozyten produziert, aber zusätzlich auch noch von Monozyten [de Waal Malefyt et al., 1991] und Virus infizierten B-Zellen [Benjamin et al., 1992, Burdin et al., 1993].

Da IL-10 zwar überwiegend von TH2-Zellen, aber auch von TH1-Zellen produziert wird, ist es kein spezifisches TH2-Zytokin. Es ist jedoch in der Lage eine TH1-vermittelte Immunantwort zu inhibieren. IL-10 unterdrückt somit die Reifung von TH1-Zellen und fördert die Polarisation zu TH2-Zellen. Dadurch wird die humorale Immunantwort gesteigert und gleichzeitig die zelluläre Immunantwort unterdrückt [Mosmann, 1994]. Das führt zu einer Steigerung der B-Zell Proliferation sowie einer gesteigerten Differenzierung von Plasmazellen [Rousset et al., 1992]. IL-10 supprimiert aber nicht nur die TH1-Zellproliferation, sondern inhibiert vor allem deren Zytokinproduktion. Das Zytokin nimmt, neben transformierenden Wachstumsfaktor (TGF β), eine zentrale Stellung in der Unterdrückung der Zytokinproduktion, einschließlich seiner eigenen Synthese [de Waal Malefyt et al., 1991, Fiorentino et al., 1991] und der Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO)-Radikalen [Gazzinelli et al., 1992] monozytärer Zellen ein.

In vitro Untersuchungen haben sowohl immunstimulatorische, als auch die immunsuppressive Aktivitäten von IL-10 gezeigt.

In Kombination mit IL-4 verstärkt IL-10 die Proliferation von T-Zellen. Seine unterschiedlichen immunregulatorischen Wirkungen zeigt IL-10 in seiner Fähigkeit zur Synthesehemmung verschiedener Zytokine, wie vor allem IFN γ der TH1-Zellen. So wirken zum Beispiel IL-10 und IFN γ bezüglich ihrer Funktion und Produktion antagonistisch [Chomarat et al., 1993].

Bei den bisher untersuchten Wirkungen von IL-10 auf Granulozyten überwiegt der hemmende Einfluss. So wird die Migration der Granulozyten durch die Reduktion der Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen vermindert [Krakauer, 1995]. Bei humanen eosinophilen Granulozyten antagonisiert IL-10 außerdem die durch lipopolysaccharid (LPS) verlängerte Überlebensrate [Kroegel et al., 1994].

IL-10 ist wie bereits zuvor erwähnt im Gegensatz zu IFN γ ein antiinflammatorisches Zytokin. Seine immunsuppressive Aktivität wird vor allem durch die Unterdrückung von Makrophagenfunktionen – in Synergie mit IL-4 und dem TGF α vermittelt. Es bewirkt die Hemmung der Makrophagen-vermittelten Zytokinsynthese in mononukleären Zellen, vor allem NK und TH1-Zellen. Die MHC II-Expression auf Makrophagen und die Makrophagen-vermittelte Proliferation von TH0- und TH1-Zellklonen wird gehemmt. Gleichzeitig wird durch Inhibition der NO-Synthese (Inaktivierung des TNF α -Effektes) die Effektivität der Makrophagen bei der Abtötung von Mikroorganismen vermindert. IL-10 stimuliert B-Lymphozyten.

Die Proliferation von B-Lymphozyten und die Sekretion von Immunglobulinen nehmen zu. IL-10 zwingt demzufolge eine Immunreaktion in Richtung einer humoralen TH2-vermittelten Immunantwort.

Das antiinflammatorisch wirkende Zytokin IL-10 fungiert also als Makrophagen- und T-Zell-Inhibitor und als Aktivator der Immunglobulinproduktion. Seine Produktion beziehungsweise seine Anwendung könnte sich positiv zum Beispiel auf eine TH1-vermittelte Autoimmunerkrankung auswirken. Negative Auswirkungen auf den Wirtsorganismus wären durch die Hemmung einer effektiven TH1-vermittelten zellulären Abwehrreaktion gegen intrazelluläre Pathoorganismen zu erwarten.

1.9.3 Interleukin 12

Zuerst in EBV-transformierten B-Zellen [Kobayashi et al., 1989; Stern et al., 1990], wird IL-12 im menschlichen Blut hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen zusammen mit B-Zellen und anderen akzessorischen Zellen produziert [D'Andrea et al., 1992; Trinchieri, 1993 a]. Auch Granulozyten können zur IL-12-Synthese angeregt werden [Cassatella et al., 1995]. In

jüngster Zeit richtet sich das Interesse auf die IL-12 Produktion von DZ [Heufler et al., 1996] und Langerhans Zellen [Kang et al., 1996].

Bakterien, bakterielle Produkte und intrazelluläre Parasiten sind gute IL-12 Induktoren *in vivo* [D'Andrea et al., 1993; Hsieh et al., 1993]. In der Erstbeschreibung wurde IL-12 als *natural killer cell stimulatory factor* (NKSF) vorgestellt [Kobayashi et al., 1989]. Das liegt an seiner Fähigkeit NK proliferieren zu lassen und zu aktivieren. Ein weiterer der zuerst beobachteten Effekte von IL-12 ist die Generierung zytotoxischer T-Zellen. 1990 wurde IL-12 in diesem Zusammenhang als *cytotoxic lymphocyte maturation factor* (CLMF) beschrieben [Stern et al., 1990].

Eine mittlerweile anerkannt wichtige Rolle hat IL-12 bei der Differenzierung von TH1-Zellen [Hsieh et al., 1993; Trinchieri, 1993; Manetti et al., 1993], die es verstärkt zusammen mit IFN γ fördert. TH1-Zellen selbst wiederum produzieren IFN γ und IL-12, sowie IL-2, so dass es zu einer autoregulativen Augmentation kommt. Die TH1-Antwort ist assoziiert mit zellvermittelter Immunität und Resistenz gegen intrazelluläre Pathogene, vor allem intrazelluläre Bakterien und Parasiten. Sie führt zu Hypersensitivitätsreaktionen vom verzögerten Typ und unterstützt lokale Entzündungsreaktionen.

Im Gegensatz dazu wird die Antwort durch TH-Zellen vom TH2-Subtyp im Rahmen von Wurminfektionen und allergischen Krankheitsbildern beobachtet. Die TH2-Zytokine IL-4 und IL-10 können TH1-Zellen inhibieren, wie umgekehrt die TH1-Produkte IFN γ , TNF α und IL-2 in der Lage sind, das Wachstum der TH2-Subpopulation zu unterdrücken. Dieser inhibitorische Effekt konnte für IL-12 bislang nicht beobachtet werden [Young et al., 1995; Bellardelli, 1995]. Außerdem wirkt IL-12 bei der Kontrolle von Immunantworten mittels T-Zellen und der Aktivierung von Makrophagen mit durch seine Fähigkeit IFN γ zu induzieren [Chan et al., 1992]. Aufgrund dieser Eigenschaften wird IL-12 eine nicht unwesentliche Rolle bei der Pathogenese chronisch entzündlicher und Erkrankungen allergischer Genese zugeschrieben. Auch ist ange-dacht, ob IL-12 bereits auf der Ebene der Hämatopoiese auf das Immunsystem einwirkt, indem es die Blutzellneubildung zusammen mit anderen Faktoren wie IL-6, G-CSF, IL-11, IFN γ und TNF α , in Richtung einer verbesserten Abwehr gegen Viren und intrazelluläre Parasiten moduliert [Bellone et al., 1994; Jacobsen et al., 1993].

Trotz der viel versprechenden Ergebnisse *in vitro* und in tierexperimentellen Tumormodellen [Chehimi et al., 1994; Brunda, 1993] wird die klinische Einführung von IL-12 wegen schweren Nebenwirkungen [Nadeau et al., 1995] zurückhaltend begonnen.

Die Bedeutung von IL-12 bei Virusinfektionen [Chehimi et al., 1993] ist verstärkt ins wissenschaftliche Interesse gerückt, nicht zuletzt seit im Serum HIV-infizierter Patienten ein verminderter IL-12-Spiegel gemessen wurde [Chehimi et al., 1994], was möglicherweise den Ausbruch einiger HIV typischer opportunistischer Erkrankungen begünstigt [Chehimi et al., 1994; Romani et al., 1994; Castro et al., 1995].

Erste Hinweise auf die Art des IL-12-Rezeptors datieren aus dem Jahr 1991 als eine Arbeitsgruppe feststellte [Chizzonite et al., 1991], dass die Neutralisierung der p40-Untereinheit die bis dahin bekannten biologischen Effekte von IL-12 auf aktivierte humane Lymphoblasten blockierte [Chizzonite et al., 1991]. Bisher wurden IL-12-Rezeptoren auf mitogen- oder IL-2 aktivierten T-Zellen und NK nachgewiesen [Chizzonite et al., 1992; Desai et al., 1992]. Frühe Hinweise auf die Verwandtschaft des IL-12-Rezeptors mit der gp130-assoziierten Hämatoopoietin-Rezeptorfamilie konnten mittlerweile bestätigt werden. Daher existieren auch mehrere Rezeptorformationen verschiedener Affinität [Chua et al., 1994]. Die vielfältigen biologischen Effekte von IL-12 sind Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen. Dagegen ist wenig bekannt über die Regulation von IL-12, insbesondere über den Stellenwert seiner beiden Untereinheiten.

1.9.4 Tumor-Nekrose Faktor alpha

TNF α ist als ein physiologischer Mediator bei Entzündungsreaktionen [Grunefeld et al., 1990] sowie der Tumorabwehr [Havell et al., 1988, North et al., 1988] bekannt und wurde ursprünglich auf Grund seiner Fähigkeit maligne Tumoren zu zerstören entdeckt [Carswell et al., 1975, Old, 1985]. Das 17 kDa große Polypeptid ist in seiner biologisch aktiven Form aus 157 Aminosäuren aufgebaut.

Hauptproduzenten vom TNF α sind aktivierte Monozyten und Makrophagen [Beutler et al., 1989, Mannel et al., 1980]. Daneben wird TNF α auch von B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und NK synthetisiert [Tracey et al., 1993]. TNF α aktiviert das Phagozytosepotential und die zytotoxische Funktion von Granulozyten [Figari et al., 1987], die Zytotoxizität von Monozyten und NK [Philip et al., 1986], und aktiviert Endothelzellen durch Induktion von Adhäsionsmolekülen [Gamble et al., 1985].

TNF α hat darüber hinaus systemische Wirkungen als zentraler Mediator der Akutphasereaktion durch seine Eigenschaft als endogenes Pyrogen und die Induktion weiterer Mediatoren wie IL-1 und IL-6 [Dinarello et al., 1986].

TNF α -Rezeptoren werden von Endothelzellen und Fibroblasten [Cerami, 1993, Tracey et al., 1993], Monozyten beziehungsweise Makrophagen [Bachwich et al., 1986], neutrophilen Granulozyten [Klebanoff et al., 1986], eosinophilen Granulozyten [Silberstein et al., 1986] sowie von T- und B-Zellen [Scheurich et al., 1987, Ziegler-Heitbrock, 1989] exprimiert.

Pathophysiologische Bedeutung besitzt TNF α bei der überschießenden Akutphasereaktion im Rahmen einer Sepsis, während die Endotoxin-induzierte massive endogene TNF α Freisetzung zu Organversagen, Schock und Tod führen kann.

1.9.5 Interferon- γ

Bereits 1965 von Wheelock entdeckt, gehört IFN γ zu den am besten untersuchten Immunmediatoren. Dabei hat man festgestellt, dass es das Immunsystem in intensiverer und vielfältiger Weise moduliert als die meisten anderen Zytokine.

IFN- γ wurde aufgrund seiner antiviralen Aktivität identifiziert und zunächst Immuninterferon genannt [Wheelock, 1965]. Es ist ein 34 kDa-Polypeptid, das nur während pathologischer Zustände (Traumata, Infektionen, Neoplasien oder Autoimmungeschehen) von aktivierten NK, TH1-Zellen und CD8-zytotoxischen T-Zellen in nachweisbaren Mengen sezerniert wird. In Abgrenzung zu den so genannten TypI-Interferonen IFN α und IFN β wird IFN γ auch als TypII- oder Immun-Interferon bezeichnet. IFN γ -Rezeptoren sind praktisch auf allen Körperzellen vorhanden.

Von NK stammendes IFN γ nimmt eine wichtige Stellung in der Resistenz infektiöser Erreger ein. Die Stimulation der NK erfolgt über von Makrophagen produziertes TNF α und IL-12, sowie autoregulativ durch IFN γ selbst [Boehm et al., 1997]. IL-12 bewirkt synergetisch mit IL-2 die Induktion von IFN γ durch mRNA-Stabilisierung [Chan et al., 1992].

Von T-Zellen stammendes IFN γ sorgt zusammen mit anderen Zytokinen für die Aktivierung der APC. Umgekehrt ist der wichtigste Stimulus zur IFN γ -Produktion für CD4-T-Zellen die Präsentation von antigenen Determinanten im Kontext mit MHC-Klasse-II-Molekülen und für CD8-T-Zellen das Antigen mit dem MHC-Klasse-I-Molekül. Unter experimentellen Bedingungen werden diese Reize durch unspezifische T-Zell-Aktivatoren ersetzt, wie Phythämagglutinin oder Concavalin A, von denen man mittlerweile weiß, dass sie die Transkription des IFN γ -Gens unmittelbar beeinflussen [Young et al., 1995].

IFN- γ wirkt aber auch selbst als autokriner Faktor auf die Entwicklung von T-Zellen. Es fördert zusammen mit IL-12 die Differenzierung und das Wachstum von TH-Zellen vom Subtyp TH1,

die selbst wieder $\text{IFN}\gamma$ und IL-12 produzieren, sowie IL-2. Die TH1-Antwort ist assoziiert mit zellvermittelter Immunität und Resistenz gegen intrazelluläre Pathogene, vor allem intrazelluläre Bakterien und Parasiten. Sie führt zu Hypersensitivitätsreaktionen vom verzögerten Typ und unterstützt lokale Entzündungsreaktionen.

Im Gegensatz dazu wird die TH2-Antwort im Rahmen von Wurminfektionen und allergischen Krankheitsbildern beobachtet [Young et al., 1995].

Noch wenig Klarheit herrscht über die Bedingungen unter denen sich das Gleichgewicht in die eine oder die andere Richtung verschiebt. So ist zum Beispiel von $\text{IFN}\alpha$ bekannt, dass es die Anzahl von TH1-Zellen steigern und den suppressiven Effekt von IL-4 auf die $\text{IFN}\gamma$ -Produktion antagonisieren kann [Brinkmann et al., 1993].

Auf B-Zellen hat $\text{IFN}\gamma$ eine ganz andere Wirkung:

Es inhibiert die LPS-induzierte, aber stimuliert die anti- μ - und *Staphylococcus aureus* Cowan strain I (SAC) induzierte B-Zellproliferation. Als Gegenspieler zu IL-4 hemmt es die MHC-II- und die CD23-Expression auf der Oberfläche IL-4-stimulierter B-Zellen und unterdrückt die Produktion von IgG1 und IgE zugunsten der IgG2a-Synthese [Snapper et al., 1988; Young et al., 1995; Boehm et al., 1997].

Für monozytäre Zellen ist $\text{IFN}\gamma$ von entscheidender Bedeutung. Schultz und Kleinschmidt haben 1983 $\text{IFN}\gamma$ als *macrophage activating factor* (MAF) beschrieben [Schultz et al., 1983]. Es erhöht die Zytotoxizität von Makrophagen gegen Tumorzellen und mikrobielle Pathogene. In diesem Zusammenhang ist wichtig zu erwähnen, dass $\text{IFN}\gamma$ und LPS synergetisch bei der Induktion von NO wirken, ein Effekt, der in seinen molekularen Mechanismen bereits sehr gut untersucht ist. Auch hier, bei der Induktion der Nitroxidsynthase und dem so genannten respiratory burst, fungieren $\text{IFN}\gamma$ und IL-4 als Gegenspieler, indem IL-4 die $\text{IFN}\gamma$ -vermittelte TH1-Antwort inhibiert [Boehm et al., 1997]. Mittels Induktion von MHC-Antigenen aktiviert $\text{IFN}\gamma$ die Antigenprozessierung und Antigenpräsentation durch Makrophagen [Young and Hardy, 1995; Feldmann, 1996], was wiederum, wie bereits schon erwähnt, essentiell für die T-Zell-Stimulation zur $\text{IFN}\gamma$ -Produktion ist. Allerdings beginnt die Beeinflussung der monozytären Zellreihe durch $\text{IFN}\gamma$ schon auf Knochenmarkebene, indem $\text{IFN}\gamma$ die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Monozyten induziert [Perussia et al., 1983]. In mehreren Publikationen aus den letzten Jahren ist auch von anderen Zelllinien als $\text{IFN}\gamma$ -Produzenten die Rede. 1993 wurde beschrieben, dass CD5(+)-CLL-B-Zellen $\text{IFN}\gamma$ produzieren, was ihnen als Schutz vor CD23-vermittelter Apoptose dient [Buschle et al., 1993].

Das Gen für das humane IFN γ liegt auf Chromosom 12. Auch das murine Gen konnte bereits identifiziert werden, und es gelang 1993 IFN γ - sowie IFN γ -Rezeptor-defiziente Mäuselinien zu generieren [Dalton et al., 1993; Huang et al., 1993]. Die Tiere zeigen eine erhöhte Empfänglichkeit für bestimmte Krankheitserreger, die am ehesten mit einer Schwächung des TH1-Armes der Abwehr in Einklang zu bringen ist [Boehm et al., 1997].

Die therapeutischen Hoffnungen hinsichtlich seiner antiproliferativen Wirkung auf Tumorzellen, die in den frühen 80iger Jahren in IFN γ gesetzt wurden, wurden nicht erfüllt. Eine systemische Anwendung ist in therapeutischen Dosierungen zu toxisch. Die lokale Anwendung von β -IFN ist wegen seiner ausgezeichneten Gewebegängigkeit oft besser geeignet. Aus diesem Grund wird IFN β auch der Vorzug gegeben in Studien, die das Ausmaß der Strahlensensibilisierung von Tumorgewebe durch Interferone ermitteln sollen, beispielsweise beim Sarkom [Gründel et al., 1997].

Andere Anwendungen in der Onkologie werden kontrovers diskutiert, wie die Kombinationstherapie beim metastasierten Nierenzell-Karzinom [Canobbio et al., 1996]. Ob IFN γ möglicherweise als Verlaufsparemeter für B-CLL [Rojas et al., 1996] oder Multiple Sklerose [Martino et al., 1996] geeignet ist, bleibt abzuwarten. Ebenso ob therapeutischer Nutzen aus der Tatsache gezogen werden kann, dass IFN γ an der frühen Abstoßungsreaktion von Transplantaten beteiligt ist [Zuo et al., 1995].

Zusammengefasst vermittelt das Zytokin IFN γ zytotoxische, antivirale und antineoplastische Aktivität. Es ist essentiell für die Abwehr intrazellulärer Pathogene, kann aber auch durch Überexpression und Verschiebung der Zytokinbalance auch autoimmune Reaktionen dominieren.

1.10 Aktivierung von T-Zellen

Die Aktivierung von T-Zellen vollzieht sich durch das Zusammenspiel verschiedener exogener und endogener Faktoren und mündet in der Differenzierung der Zellen zu hochspezialisierten Effektorzellen. Zunächst wird von APC ein Peptidantigen an der Oberfläche präsentiert, an das der entsprechende T-Zell-Rezeptor bindet. Es wird angenommen, dass es im Menschen mehr als 1×10^6 unterschiedliche T-Zellrezeptorspezifitäten gibt, die jeweils für ein bestimmtes Antigen passend sind. Die Bindung des Peptids an den Rezeptor ist der Ausgangspunkt für die Aktivierung der T-Zellen. *In vitro* kann dieser Schritt durch die Stimulation der T-Zellen über das CD3 Antigen stimuliert werden [Tao et al., 1997].

Die alleinige Stimulation der TCR reicht allerdings nicht für eine ausreichende Aktivierung der T-Zellen aus. Zusätzlich werden so genannte kostimulatorische Signale benötigt. Hierbei

kommt es zu weiteren Interaktionen der aktivierten T-Zellen mit APC. Darüber hinaus wird die T-Zellaktivierung durch Zytokine wie zum Beispiel IL-2 und IL-12 verstärkt.

Eine wichtige Kostimulation für die T-Zellen ist die Interaktion von CD28 auf den T-Zellen mit den APC-Epitopen CD80 und CD86. Die Bedeutung dieser Kostimulation wird anschaulich durch Versuche mit CD28 *knock-out* Mäusen. Hier zeigt sich eine normale Entwicklung der B- und T-Zellen, wobei die B-Zellen jedoch eine geringere Menge Immunglobuline produzieren, und die T-Zellen wesentlich schwächer auf verschiedene Stimulanzen reagieren [Heinly et al., 2001; Shahinian et al., 1993]. T-Zellen CD28-inkompetenter Mäuse weisen eine insuffiziente Stimulierbarkeit durch Lectin auf. Dieses zeigt sich in einer verminderten IL-2 Produktion und IL-2R Expression.

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

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

Als drittes Element bei der T-Zellaktivierung sind lösliche Zytokine von besonderer Bedeutung. Eine zentrale Rolle nimmt hierbei das IL-2 ein. Dieses Zytokin wurde Ende der 70iger Jahre erstmals als T-Zell Wachstumsfaktor beschrieben, der von PHA stimulierten Lymphozyten ausgeschüttet wird [Kendall et al., 1984; Morgan et al., 1976]. Das IL-2 ist etwa 15,5 kDa

schwer, besteht aus 133 Aminosäuren und wird in erster Linie von T-Lymphozyten gebildet [Oppenheim et al., 2001]. IL-2 kann seinen eigenen, auf T-Zellen exprimierten Rezeptor induzieren und somit seine eigene Wirkung wesentlich verstärken [Minami et al., 1993].

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

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

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

1.11 Lektine

1.11.1 Die Biologie der Lektine

Lektine stellen eine heterogene Gruppe Zucker-spezifischer Proteine nicht immunen Ursprungs dar [Lis et al., 1992]. Sie werden durch folgende drei Eigenschaften gekennzeichnet, von denen nur die erste obligat ist, um ein Protein als Lektin zu bezeichnen:

1. spezifische Bindung von Zuckern
2. Agglutination von Zellen

3. Lymphozytenstimulation [Klein, 1991]

William C. Boyd schlug 1954 den Namen Lektine (lateinisch *legere* = legen) für die Eigenschaft der Blutgruppen-spezifischen Agglutination vor [Gabius et al., 1988].

Sie sind auf die Erkennung und Bindung bestimmter Zuckerstrukturen spezialisiert, wobei einzelne Lektine oft mehr als eine Bindungsstelle enthalten [Gabius et al., 1988; Stryer, 1990]. Auch die Zelle kann bis zu 10^7 Lektinbindungsstellen aufweisen [Klein, 1991]. Auf diese Weise kann ein Lektin vernetzend und damit agglutinierend wirken. Die Gruppe der Lektine ist somit am komplexen biologischen Geschehen der intra- und extrazellulären Erkennung, aber auch an deren pathologischen Erscheinungsformen wie bakterielle Infektionen oder Tumorausbreitung beteiligt [Gabius et al., 1988].

Lektine werden fast bei allen Pflanzenfamilien, am häufigsten aber bei den Hülsenfrüchtlern (Leguminosen oder Fabaceen) gefunden, wobei deren biologische Funktion noch weitgehend unbekannt ist [Klein, 1991]. Sie kommen vor allem im Samen vor, aber auch bei Bakterien und Pilzen, sowie Tieren aller Entwicklungsstufen, schließlich auch beim Menschen.

1.11.2 Wirkungsweise mitogener Lektine im Vergleich zu Antigenen

Eine Vielzahl von Lektinen hat einen Einfluss auf Lymphozyten. Die nachfolgende Tabelle 1 stellt die Herkunft und die Wirkung der drei experimentell am häufigsten verwendeten mitogenen Lektine zusammen:

Mitogen	Herkunft	Wirkung
Concanavalin A, Con A	Canavalia ensiformis, Schwertbohne	T-Zell-Mitogen
Phytohämagglutinin, PHA	Phaseolus vulgaris, Gartenbohne	T-Zell-Mitogen, gering wirkendes B-Zell-Mitogen
Pokeweed Mitogen, PWM	Phytolacca americana, Kermesbeere	T- und B-Zell-Mitogen

Tabelle 1: Die am häufigsten verwendeten Lektine

Lektinstimulierte Lymphozyten weisen das gleiche Spektrum funktioneller Charakteristika auf, wie durch Antigen stimulierte Lymphozyten, das heißt stimulierte B-Lymphozyten differenzieren sich in Immunglobulin-sezernierende Plasmazellen, während stimulierte T-Lymphozyten Zytokine produzieren und sich differenzieren. Der Unterschied zwischen Antigenaktivierung und Lektinaktivierung liegt in der Zahl der aktivierten Lymphozytenklone:

Während ein Antigen nur die B- und T-Zellklone aktiviert, die die entsprechenden Rezeptoren tragen (in der Regel nur 0,02 – 0,1% der Zellen), aktivieren Lectine als polyklonale Aktivatoren viele Klone mit unterschiedlichen Antigenbindungsspezifitäten, häufig 30–60% der Zellen [Klein, 1991; Lis et al., 1992]. Somit ist es möglich, das Aktivierungsvermögen von T- und B-Lymphozyten zu untersuchen.

Die Reaktion der Lymphozyten eines Probanden auf mitogene polyklonale Aktivatoren ist aufgrund genetischer Einflüsse [Sabbe et al., 1983] und weiterer immunmodulatorischer Faktoren, wie zum Beispiel der Zytokine, die interagierend wichtige Funktionen bei der spezifischen und unspezifischen Immunantwort übernehmen [Keller, 1994; Ibelgauf, 1992], individuell variabel.

Sabbe und Mitarbeiter [Sabbe et al., 1983] beobachteten auch, dass die Variabilität in der Reaktion der Lymphozyten als Antwort auf Antigene immer höher ist als auf Mitogene. Die Gründe sahen sie in der Sensibilität und in den reagierenden niedrigen Zellzahlen gegenüber dem Antigen verglichen zum Mitogen. Sie zeigten auch spenderabhängige Variationen bei den Reaktionen sowohl auf Antigene als auch auf das Lektin PHA.

1.11.3 Weitere Aktivatoren der Lymphozyten

Lymphozyten können außer durch Antigene und Lectine noch durch eine Vielzahl von Substanzen aktiviert werden [Klein, 1991]. Zu denen gehören B-Zell-Stimulanzien die Lipopolysaccharide (LPS) aus der Bakterienzellwand von beispielsweise *Salmonella* spp. und Antikörper gegen Immunglobuline.

T-Zell-Rezeptor-spezifische Antikörper stimulieren T-Zellen.

Lymphozytenaktivierend sind auch weitere Substanzen wie Perjodate, Zinkionen und proteolytische Enzyme (zum Beispiel Trypsin) und auch physikalische Faktoren wie Hitze und Kälte, deren Aktivierungsmechanismen jedoch unklar sind.

Auch in der Homöopathie sind verschiedene Präparate mit mitogener Wirkung auf Lymphozyten bekannt. Dabei wurden für verschiedene homöopathische Potenzen des Lachesis-

Monopräparates mitogene Wirkungen im Lymphozytentransformationstest nachgewiesen [Arndt, 1992].

Auch für einige potenzierte Suis-Organpräparate konnten stimulierende Effekte auf Lymphozyten beobachtet werden [Siefener, 1994; Enbergs, 1998].

Weiterhin werden in der Nahrung zunehmend mehr Substrate identifiziert, denen eine immunmodulierende Funktion zugeordnet werden kann [Suchner et al., 2000]. Unter den Aminosäuren nimmt dabei Glutamin eine übergeordnete Rolle im Stoffwechsel immunkompetenter Zellen ein [Ardawi, 1988; Calder, 1994]. Es führt zu einer Steigerung der Zellproliferation, der RNA- und Proteinsynthese [Szondy et al., 1990], sowie der Produktion verschiedener Zytokine [Calder et al., 1992; Wallace et al., 1992]. Auch von der Aminosäure Arginin sind immunstimulierende Eigenschaften, wie die der Stimulation der T-Lymphozyten bekannt [Barbul, 1993]. Selen als integraler Bestandteil der Glutathionperoxidase ist eine wesentliche Komponente des antioxidativen Schutzsystems. Selen bewirkt unter anderem eine gesteigerte Proliferation und Zytotoxizität der Lymphozyten [Kiremidjian-Schumacher et al., 1990, 1994]. Weiterhin lässt eine Supplementierung der Nahrung mit den Antioxidantien Vitamin A, C und E nachweislich die Anzahl der absoluten T-Zellzahl steigern [Penn et al., 1991].

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Laborinventar:

- Absauggerät (Atmolit 16N, Atmos)
- Autoclav (2540 EL, Tuttnauer)
- Brutschrank (CO₂-Auto-Zero, Heraeus)
- Bunsenbrenner (Fireboy® eco, IBS)
- Mehrkanalpipetten für 10-100 µl und 20-200 µl (Transferpette-8®, Brand, Mikroliterpipetten 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000µl (Transferpette®, Brand))
- Mikroskop (Axiovert, Zeiss)
- Pipettiergerät (Pipetboy® acu, IBS)
- Reinluft-Sicherheitswerkbank (LaminAir HB 2448, Heraeus)
- Spektrophotometer (THERMOmax®, Molecular Devices)
- Spektrophotometer-Steuerungssoftware (SOFTmaxPRO® für PowerMacintosh 7300/200, Molecular Devices)
- Waage (AT 250, Mettler)
- Zentrifuge (Rotina 48 und Rotanta/RP, Hettich)

Verbrauchsmaterial:

- Combitips plus 0,5, 1,25, 2,5, 5 ml (Eppendorf)
- Einfrier-Röhrchen (Nunc Cryo Tubes, Nunc Brand)
- Filter (Minisart, Porengröße 0,20 µl, Sartorius)
- Mikrotiterplatten für Suspensionskulturen mit 96, 24, 12, 6 Löchern (Brand)
- Pipettenspitzen 2-200 µl und 50-1000 µl (Sarstedt)
- Plastikpipetten 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (Greiner)
- Transferpipetten (BD-Falcon)
- Wägepapier (NeoLab)
- Zentrifugenröhrchen 12 ml und 50 ml (Greiner)

Chemikalien:

- 8-Bromo-cGMP (RBI)
- Acetylsalicylsäure (Sigma)
- Antibiotic Antimycotic Solution (Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B, Sigma)
- Atenolol (Sigma)
- Cimetidin (Sigma)
- Cyproheptadin (RBI)
- D/L-Cystein (Sigma)
- Diclofenac (Sigma)
- DiethylamineNONOate (Biochrom)
- Dimethylsulfoxid (Merck)
- DMPX (RBI)
- Gentamicin (Sigma)
- Indomethacin (Sigma)
- L-Arginin (Sigma)
- L-Canavanine (Sigma)
- L-Glutamin (Biochrom)
- Metoprolol (Sigma)
- NG-Monomethyl-L-Arginin (Sigma)
- nichtessentielle Aminosäuren (Biochrom)
- Phytohämagglutinin P (Sigma)
- Propranolol (RBI)
- Pyruvat (Biochrom)
- Quazinone (Sigma)
- Reagenz für Proliferationstest (Cell Proliferation Reagent WST-1, Boehringer)
- RPMI 1640 ohne Phenolrot (Sigma)
- SKF 83566 (RBI)
- stabiles Glutamin (N-Ac-L-Ala-L-Gln ®, Biochrom)
- Sulpirid (Sigma)
- Trennmedium zur Dichtezentrifugation (Accuspin-Histopaque®-1077, Sigma)
- Zaprinast (Sigma)

Die Chemikalien wurden, falls nicht anders durch den Hersteller vorgegeben, in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst, in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt und mit Hilfe eines sterilen Membranfilters (Porengröße 0,20 µm) steril filtriert.

Blutprodukte:

Die *Buffy Coats* (Blutleukozyten) wurden vom Blutdepot der Chirurgischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar (Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Siewert) bezogen und stammen von Patienten, die präoperativ Blut zur Herstellung autologer Erythrozytenkonzentrate spendeten.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Suspensionskultur mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

In *Ficoll-Histopaque-Technik* wurden mittels Dichtezentrifugation aus den *Buffy Coats* die PBMC verschiedener Spender gewonnen [Mookerjee, 1976; Sigma, 1994], zweimal mit Kulturmedium gewaschen und anschließend in Kulturmedium suspendiert (2×10^7 Zellen/ml). Die Zahl vitaler Zellen pro Milliliter wurde nach Färbung der Zellen mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer jeweils zweifach bestimmt [Mishell et al., 1980; Paul, 1979]. In je ein Einfrierröhrchen wurden 1 ml der Gefrierlösung, bestehend aus 16 Teilen FKS, 5 Teilen Dimethylsulfoxid (DMSO) und 4 Teilen RPMI 1640, und 1 ml der Zellsuspension pipettiert, danach in Styropor verpackt und möglichst langsam in einem -70°C -Kühlschrank eingefroren [Paul, 1979], um die Bedingungen des kontrollierten Tieffrierens zu erreichen [Thorsby et al., 1974]. Zum Auftauen wurden die Röhrchen in ein Wasserbad (37°C) gelegt, wobei der Auftauvorgang möglichst rasch geschehen sollte. Sofort nach Verflüssigung wurde die aufgetaute Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen eingefüllt. Diese Suspension wurde mit Medium (RPMI 1640) verdünnt, zweimal gewaschen, um das toxische DMSO zu eliminieren, und dann schließlich wieder in Kulturmedium (Tabelle 2) suspendiert. Das verwendete Medium enthält Phenolrot, welches eine Extinktion im Messbereich des Formazan bei 450 nm verursacht, sowie FKS, das eine nicht definierte Laktatdehydrogenaseaktivität besitzt. Aus diesem Grund musste nach Ablauf der Inkubationszeit der gemischten Leukozytenkultur, und vor Quantifizierung der abgelaufenen Proliferation und der zellvermittelten Zytotoxizität, das Standardkulturmedium gegen ein FKS- und Phenolrot-freies Medium ausgetauscht werden (Tabelle 2). Die Zugabe von Antibiotika entspricht internationalen Empfehlungen [Thorsby et al., 1974].

Standard-Zellkulturmedium	FKS- & Phenolrotfreies Medium
500,0 ml RPMI 1640	500,0 ml RPMI 1640 ohne Phenolrot
50,0 ml FKS (fetales Kälberserum)	5,0 ml L-Glutamin (200mM)
5,0 ml nichtessentielle Aminosäuren	5,0 ml nichtessentielle Aminosäuren
5,0 ml Pyruvat (100mM)	5,0 ml Pyruvat (100 mM)
2, 5 ml stabiles Glutamin (200mM)	2, 5 ml stabiles Glutamin (200 mM)
2, 5 ml Antimikrobielle Kombination	2, 5 ml Antimikrobielle Kombination
2, 0 ml Gentamicin (12, 5 mg/ml)	2, 0 ml Gentamicin (12, 5 mg/ml)

Tabelle 2: Pipettierschema zur Herstellung der verwendeten Kulturmedien. Hitzeinaktivierung des FKS im Wasserbad bei 56°C für 30 Minuten. Da RPMI 1640 ohne Phenolrot kein L-Glutamin enthält, wurde dies in entsprechender Menge ersetzt.

Die Inkubation der Zellkulturen erfolgte bei 37°C und fünf Prozent CO₂ im Brutschrank. Nach der Behandlung der mononukleären Zellen mit den einzelnen Testsubstanzen wurden diese aus dem Überstand entfernt, das heißt die Zellen wurden „gewaschen“. Hierzu wurde mit Hilfe einer Transferpipette die Zellsuspension in ein großes Zentrifugenröhrchen gebracht, mit 50 ml Medium aufgefüllt und bei 400 g fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgesaugt, das Röhrchen wieder auf 50 ml mit Medium gefüllt und schließlich die Zellen mittels Transferpipette vorsichtig resuspendiert. Dieser Arbeitsvorgang wurde zwei Mal wiederholt, und im Anschluss wurde die Zellkonzentration mit Hilfe einer Färbung mit Trypanblau bestimmt. Es wurde für alle Versuche eine Zellkonzentration von 2×10^6 Zellen/ml verwendet, ansonsten wurde dies abweichend angegeben.

2.2.1.2 Die gemischte Leukozytenreaktion (MLR): Versuchsaufbau

Die Methode der MLR wurde etwas modifiziert, aber im Großen und Ganzen, wie von Autoren bereits beschrieben durchgeführt [Bach, 1964; Bach, 1966; Bondevik, 1974; Thorsby, 1974].

In einer primären Einwegleukozytenreaktion (MLR 1) werden Effektorzellen generiert. Die Responderzellen ($c=1 \times 10^6$ Zellen/ml) des Spenders A werden mit A bezeichnet, die mit Mitomycin C (MMC) inaktivierten Stimulatorzellen ($c=1 \times 10^6$ Zellen/ml) des Spenders B werden mit B(m) bezeichnet [Thorsby, 1974].

Durch 20-minütige Inkubation der Stimulatorzellen mit 40 µg MMC/ml Zellsuspension erfolgte die Inaktivierung dieser Zellen. In 4,5 ml physiologischer Kochsalzlösung wurde zwei mg MMC aufgelöst und danach steril filtriert. Diese Lösung wurde im Volumenverhältnis 1:10 mit der Suspension der Zellen 20 Minuten bei 37°C und fünf Prozent CO₂ inkubiert, drei Mal gewaschen, und in Kulturmedium resuspendiert.

Abhängig vom Experiment wurden in der primären gemischten Leukozytenreaktion (MLR 1) modulierte Substanzen und oder Mitogene zugesetzt.

Die Inkubationsdauer der primären gemischten Leukozytenreaktion (MLR 1) betrug neun Tage. Nach dieser Zeit sind alle Stimulatorzellen abgestorben und es verbleiben letztendlich nur noch die Effektorzellen des Spenders A in der Zellsuspension. Die verbliebenen Zellen wurden zwei Mal gewaschen, um die Testsubstanzen und den Zelldendritus zu entfernen. Danach wurde die Zellproliferation, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, bestimmt.

Als relevante, abhängige Variablen der Beobachtungseinheit mononukleäre Zellen des peripheren Blutes wurden die Proliferationstendenz auf allogene und mitogene Stimulation definiert. Zahlreiche Modifikationen des eben beschriebenen Grundversuches sollten die ablaufenden Reaktionen näher beleuchten und werden an entsprechender Stelle erwähnt.

2.2.1.3 Phytohämagglutinin P -Testansatz (PHA-Proliferationstest)

Dieser Test zeigt die mitogene Stimulation durch das Lektin PHA in Anwesenheit verschiedener Substanzen. Dafür wurde eine Lösung des Lektins mit einer Konzentration von 2µg/ml (2×10^{-3}) verwendet. Die Zellenzahl des zu testenden Individuums wurde auf 2×10^6 Zellen/ml festgelegt. Dafür wurde eine 96-well-Gewebekulturplatte verwendet, die nach dem folgenden Schema beimpft wurde:

Vier gleich große Teile, je 50 µl, werden in die Vertiefungen der Platte pipettiert:

Den Ersten der vier Teile bilden die Zellen des zu testenden Individuums in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml.

Den zweiten Teil bildet die zu testenden Substanz in der jeweiligen Konzentration.

Dritter und vierter Teil sind die PHA-Lösung in der bereits genannten Konzentration (2×10^{-3}).

Das Gesamtvolumen der Zellsuspensionen beträgt somit 200µl.

Von jeder Zellsuspension wurden sechs Parallelen angesetzt. Zusätzlich wurde die Referenz mit Medium als Leerwert (=blank), anstelle der zu testenden Substanz definiert. Die beimpfte

96-well-Gewebekulturplatte wurde im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂, sowie 100 % O₂ für drei Tage inkubiert.

Danach wurde, wie bei der gemischten Leukozytenreaktion (MLR), die Zellproliferation, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, bestimmt.

2.2.1.4 Testansatz mit „ruhenden Zellen“ (48-Stunden Test)

Anders als beim PHA-Proliferationstest dient dieser Test dazu, die direkte Wirkung einer Substanz, in der entsprechenden Konzentration, auf mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) zu zeigen. Es handelt sich demnach weder um eine allogene, noch um eine mitogene Stimulation der PBMCs.

Die Zellenzahl des zu testenden Individuums wurde, wie in allen bereits zuvor genannten Testansätzen, auf 2×10^6 Zellen/ml festgelegt. Hierfür wurde eine 96-well-Gewebekulturplatte wie folgt beimpft:

Zwei gleich große Teile, je 100 µl, werden in die Vertiefungen der Platte pipettiert:

Zum einen mit den Zellen des zu testenden Individuums in einer Zellkonzentration 2×10^6 Zellen/ml, zum anderen mit der zu testenden Substanz in der jeweiligen Substanzkonzentration.

Analog zum MLC-Test und PHA-Proliferationstest wird die Referenz mit Medium als Leerwert (=blank), anstelle der zu testenden Substanz definiert. Anschließend erfolgt die Inkubation im Brutschrank für 48 Stunden und die Bestimmung der Zellproliferation, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben.

2.2.2 Bestimmung von Zellzahl und Zellaktivität

Die Zellen wurden stets mit Trypanblau gefärbt. Unmittelbar anschließend wurde in einer Neubauer-Zählkammer die Zahl der vitalen und der avitalen Zellen bestimmt [Paul, 1979]. Diese Bestimmung erfolgte immer zweifach und die Ergebnisse wurden gemittelt.

2.2.3 Bestimmung der Zellproliferation

Für die Proliferationsessays erfolgte die Zellkultur in 96-Well-Rundbodenplatten mit einem Gesamtvolumen von 200 µl/well. Die Zellen wurden einerseits mit dem Lektin PHA [Du Bois et al., 1973], und andererseits als sekundär gemischte Leukozytenreaktion (MLR 2) mit inaktivierten Stimulatorzellen B(m) stimuliert, wie in Tabelle 3 dargestellt.

Die Wachstumsrate wurde durch quantitative Messung der Aktivität des mitochondrialen Atmungskettenenzym Succinat-Tetrazol-Reduktase, die direkt und auch linear mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen korreliert [Boehringer, 1994], gemessen. Bei dieser Reaktion wird das Tetrazolsalz WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzoldisulfonat) durch eine ringöffnende Dehydrierung in Formazan umgewandelt, das bei einer Wellenlänge von 450 nm absorbiert wird (Abb.1). Da das Kulturmedium ebenfalls absorbiert wird, eliminiert man diese Hintergrundabsorption rechnerisch. Aus diesem Grund wurde ein zellfreier Ansatz hergestellt, der parallel zum Testansatz gemessen wurde und automatisch durch die verwendete Software, SOFTmaxPRO® (Molecular Devices), von den einzelnen Messwerten subtrahiert wurde.

Das Tetrazoliumsalz WST-1 [Ishiyama et al., 1993] gehört zu einer neuen Generation von Tetrazoliumsalzen, der auch XTT [Paull et al., 1988] angehört, die in lebensfähigen Zellen durch metabolische Reduktion zu wasserlöslichen Formazanen umgewandelt werden. Die direkte Ablesung der Absorption durch einen Mikrotiterplatten-Reader ist möglich, da der Lösungsschritt des gebildeten Formazans, wie im MTT-Test [Slater et al., 1963; Mosmann, 1983], nicht mehr notwendig ist. Dabei korreliert die Menge, beziehungsweise die Intensität der Farbstoffentwicklung, direkt mit der Anzahl der metabolisch aktiven Zellen [Mosmann, 1983; Gellier et al., 1986]. Da proliferierende Zellen metabolisch aktiver als inaktive oder ruhende Zellen sind, ist der Test nicht nur zur Bestimmung der Lebensfähigkeit und Zytotoxizität geeignet, sondern auch zur Bestimmung von Aktivität und Proliferation der Zellen [Wyllie et al., 1998].

Die Reduktion dieser neuen Generation von Tetrazoliumsalzen verläuft in Anwesenheit von Zwischenelektronenakzeptoren wie Phenazinmethylsulfat (PMS) durch NADH, beziehungsweise NADPH effizient, sogar in Abwesenheit von Zellen und Enzymen [Berridge et al., 1996]. Eine Succinat-abhängige Reduktion von XTT und WST-1 ist wesentlich langsamer als durch NADH beziehungsweise NADPH und abhängig von mitochondrialen Succinat-Dehydrogenasen. Weiterhin wurde von Berridge und Mitarbeitern 1996 beobachtet, dass die NADH-vermittelte Reduktion von XTT und WST-1 durch Superoxid-Dismutase (SOD) deutlich gehemmt wird. Dies deutet auf eine Superoxid-vermittelte Reduktion, die extrazellulär oder auf der Plasmamembran abläuft, hin. Für den Einsatz in der Praxis sind insbesondere die Vorteile des WST-1, auch gegenüber MTT und XTT, hervorzuheben.

Am Ende der Inkubationszeit der Proliferationstests (Tabelle 3) wurden zu den 200 µl Testsubstanz/well einer 96 Well-Mikrotiterplatte jeweils 20 µl WST-1 pipettiert, dieser Ansatz dann vier Stunden lang im Brutschrank inkubiert, um danach im Spektrometer die Extinktion bei

450 nm gegen eine Referenzextinktion bei 650 nm zu messen. Mittelwert und Standardabweichung wurden aus sechs individuellen Bestimmungen berechnet, falls nicht abweichend angegeben.

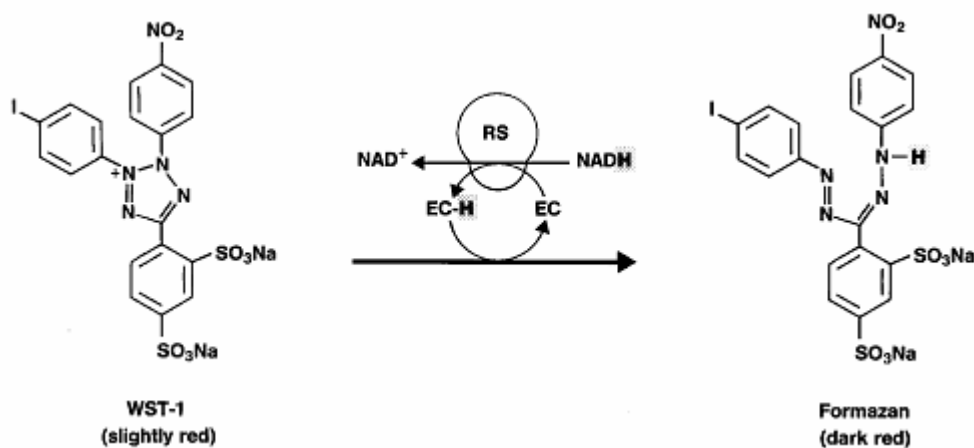


Abbildung 1: Umwandlung von Tetrazolium Salz WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzol-disulfonat) in Formazan (EC = Elektron koppelndes Agens; RS = mitochondriales Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System)

	Allogene Stimulation	Mitogene Substanzen
	Leukozytenmischkultur	Phytohämagglutinin (PHA)
1 Teil	Effektor-PBMC (2×10^6 Zellen/ml)	PBMC (2×10^6 Zellen/ml)
1 Teil	Stimulator-PBMC (2×10^6 Zellen/ml)	PHA (2×10^{-3} mg/ml)
1 Teil	PHA (4×10^{-4} mg/ml)	
1 Teil	Kulturmedium	
<u>Summe</u>	4 Teile	2 Teile
Inkubationszeit	9 Tage	3 Tage

Tabelle 3: Pipettierschema und Inkubationszeiten für die Proliferationstests des MLR und PHA

2.2.4 Statistische Methoden

Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mit dem Statistik-Programm SigmaStat for Windows Version 2.0 (Jandel Corporation), die deskriptive Auswertung mit dem Programm

Microsoft Excel. Wenn nicht abweichend angegeben, wurden Mittelwert und Standardabweichung aus sechs individuellen Bestimmungen berechnet.

3 Eigene Ergebnisse

3.1 Einführung

Die Versuchsergebnisse dieser Arbeit, die Bestandteil eines Projekts des urologischen Forschungslabors der Technischen Universität München sind, werden nun graphisch dargestellt und analysiert.

Inhalt des Projekts ist die zelluläre Therapie von Immundysregulatoren. Das Ziel des Projekts ist die positive Beeinflussbarkeit von Krankheiten wie beispielsweise autoimmunologische Erkrankungen, das HI-Virus, maligne Tumoren oder Atherosklerose.

Als Basis dient ein Mausmodell. Mit Hilfe dieses Mausmodells gelang es, durch zelluläre Elimination der tumorschützenden Immundysregulatoren, tumortragende Mäuse dauerhaft zu heilen [Leskovar et al., 1996].

Meiner Arbeit wurden vier verschiedene Versuchsansätze beziehungsweise Teststypen zu Grunde gelegt:

- (a) der 48 Stunden-Test,
- (b) der PHA - Proliferationstest,
- (c) der MLC- I-Test (A + B_x) und
- (d) der MLC-II-Test (A + B).

Die einzelnen Tests wurden bereits in der Methodensektion erläutert. Beim unter (c) genannten MLC-I-Test wurde jedoch auf die anderorts übliche Inaktivierung durch Bestrahlung verzichtet. Sie wurde durch die Behandlung mit Mitomycin C ersetzt.

Um das schon erwähnte Modell weiter zu verbessern wurde in diesem Labor ein *in vitro* Modell entwickelt, dass zur Testung häufiger, im klinischen Alltag verwendeter Arzneimittelgruppen, auf ihre Fähigkeit zur Immunmodulation, dienen soll.

Als Testsubstanzen dienten Rezeptorblocker der purinergen (3,7- Dimethyl-1-prophargylxanthin (DMPX)), der beta₂-adrenergen (Atenolol, Metoprolol, Propranolol), der H₂-histaminergen (Cimetidin), der 5HT-serotonergen (Sulpirid, Cyproheptadin) und der dopaminergen (SKF 83566) Rezeptoren, sowie die Cyclooxygenasehemmstoffe/PGE₂-Rezeptorantagonisten (ASS, Diclofenac, Indomethacin). Um die immunologische Potenz der

jeweiligen Substanz noch differenzierter darstellen zu können wurden folgende Konzentrationen verwendet:

1×10^{-5} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-12} M und 1×10^{-15} M.

Die Mehrzahl der im Folgenden dargestellten Versuche sind der in (a) genannte 48-Stunden-Test und der in (d) genannte MLC-II, da durch die Beschränkung auf diese Tests eine größere Anzahl von Substanzen getestet werden konnte. Die zusätzlich durchgeführten PHA-Proliferationstests (b) und der MLC-I-Test (c) wurden mit andersartigen Substanzen durchgeführt, nämlich mit Aminosäuren (D-/L-Cystein, L-Arginin), Substanzen, die das cAMP-/cGMP-System beeinflussen (8-Bromo-cGMP, Zaprinast), NOS-Inhibitoren (L-Canavanine), NO beeinflussende Substanzen (Diethylamine NONOate). Sie sind ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit, jedoch ist das Hauptaugenmerk auf die zuvor genannten MLC-II-Tests mit den Rezeptorantagonisten gerichtet.

Bei den in den folgenden Graphiken dargestellten Messwerten handelt es sich grundsätzlich um das arithmetische Mittel aus sechs Messwerten pro Zellreihe. Diese Extinktions-, beziehungsweise Absorptionswerte wurden bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 650 nm ermittelt. Wie bereits im Kapitel Material und Methoden beschrieben, besteht eine direkte Korrelation zwischen dem gemessenen Absorptionswert und der metabolischen Aktivität der einzelnen Zellsuspensionen. Diese Aktivität wird in allen Versuchen anhand der Enzymaktivität lebensfähiger Zellen durch den Umsatz des hierbei verwendeten hellroten WST-1 zum dunkelroten Formazan messbar gemacht. Die Darstellung der Messergebnisse erfolgt graphisch sowohl in absoluten Werten, als auch prozentual, bezogen auf die durchgeführte Referenzmessung.

3.2 Graphische Darstellung

Zur Erläuterung der graphischen Darstellung ist zunächst aufzuführen, dass zwei verschiedene Arten von Ergebnisdarstellungen angewandt wurden:

Die Darstellung in Absolutwerten und die Darstellung in Prozentualwerten.

Bei der prozentualen Darstellung wird das arithmetische Mittel aus sechs Messwerten auf den Referenzwert bezogen, das heißt die Differenz aus dem Mittelwert der Substanzmotive und der Referenzwert wurde als jeweiliger Anteil vom Referenzwert dargestellt.

Bei den absoluten Werten ist der Referenzwert neben den einzelnen Messwerten der unterschiedlichen Substanzkonzentration aufgeführt.

Eine Graphik enthält zwei Komponenten:

Zum einen die Untersuchung der jeweiligen zu testenden Substanz in unterschiedlichen Konzentrationen und zum anderen verschiedene Tests desselben Versuchsansatzes mit der jeweiligen Substanz, die in einer Graphik vereint sind. Beim Großteil der untersuchten Substanzen werden zunächst die absoluten Werte dargestellt. Im Anschluss daran werden diese prozentual auf die Referenz bezogenen miteinander verglichen.

Auf der Abszisse sind die verschiedenen Substanzkonzentrationen und die verschiedenen Test aufgeführt. Die Ordinate stellt bei den Absolutwerten die Proliferation bei einer Extinktion E von 450-650 nm der einzelnen Mittelwerte der entsprechenden Substanzkonzentration und des dazugehörigen Referenzmittelwertes dar.

Bei der prozentualen Darstellung signalisiert ein positiver prozentualer Anteil eine Aktivierung, eine negativer prozentualer Anteil dagegen eine Suppression.

3.3 Spenderindividualität

Die Spenderzellen unterscheiden sich in den *Human Leukocyte Antigenen* (HLA), im Anteil der einzelnen Lymphozytensubpopulationen und auch in ihrer Aktivität. Deshalb wurde besonders Wert darauf gelegt, sich für Mehrfachspender zu entscheiden. Daher wurden von der Blutbank der chirurgischen Klinik der Technischen Universität München *Buffy Coats* von Spendern bevorzugt, die mehrmals zur Spende erschienen.

In Vorversuchen in dieser Laboreinheit konnte gezeigt werden, dass die Versuchsbedingungen auf diese Weise so konstant wie nur möglich gehalten werden konnten. Daher wurden in den Hauptversuchen, so weit es möglich war, die Stimulator- und Responderzellen von möglichst identischen Individuen verwandt.

3.4 Vergleich der Testansätze

3.4.1 Allgemeines

Die in den Abbildungen 2a bis 2c dargestellten Messwerte sind die Referenzwerte aus vier verschiedenen Experimenten. Da es sich um die Referenzwerte handelt, bedeutet dies, dass zu keinem Zeitpunkt eine Testsubstanz, sondern nur Medium (48-Stunden-Test), PHA (PHA-Test) beziehungsweise Medium und PHA (MLC-Test) in der Lymphozytenkultur vorhanden ist.

3.4.2 Die verschiedenen Testansätze

a) PHA-Test versus 48-Stunden Test

Beim Vergleich des PHA-Tests mit dem 48-Stunden-Test lässt sich auf Seiten des 48-Stunden-Tests eine deutlich höhere Zellaktivität als beim PHA-Test feststellen. Dies ist ein Trend, der sich konstant in allen vier dargestellten Experimenten, die aus unterschiedlichen Versuchsansätzen stammen, widerspiegelt (Abb.2a).

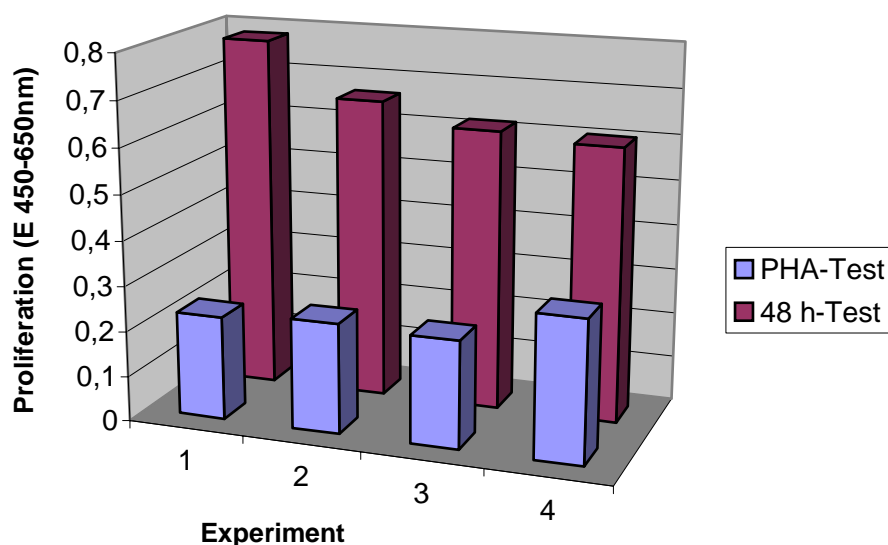


Abbildung 2a: Vergleich 48-Stunden-Test und PHA-Proliferationstest. Auf der Ordinate sind die durchschnittlichen Messwerte aus vier verschiedenen Experimenten (Zahlen 1-4) aufgetragen. Auf der Abszisse ist die Zellproliferation (gemessen bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 650 nm) dargestellt.

b) PHA –Test (48 Stunden) versus PHA-Test (120 Stunden)

In der dargestellten Messreihe (Abb.2b), die ebenfalls aus vier verschiedenen Experimenten stammt, ist die wesentlich höhere Zellaktivität beim PHA-Test (120 h) deutlich erkennbar. Es handelt sich auch hier um die Mittelwerte, die arithmetisch aus sechs Einzelwerten bestimmt wurden.

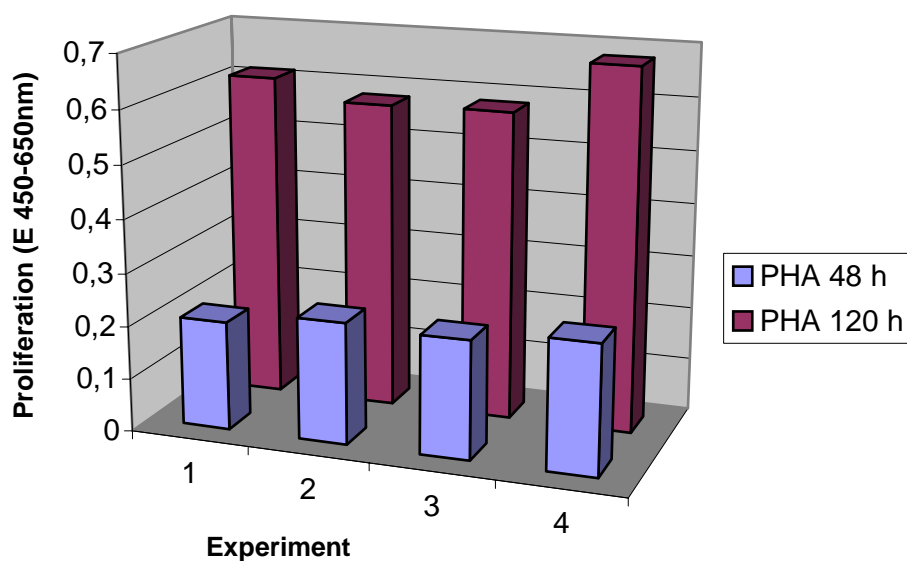


Abbildung 2b: Vergleich PHA-Proliferationstest (48 Stunden) und PHA-Proliferationstest (120Stunden). Auf der Ordinate sind die durchschnittlichen Messwerte aus vier verschiedenen Experimenten (Zahlen 1-4) aufgetragen. Auf der Abszisse ist die Zellproliferation (gemessen bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 650 nm) dargestellt.

c) PHA 120 Stunden Test versus MLC-Test

Im folgenden Diagramm (Abb.2c) ist die Stimulation der mononukleären Zellen mit PHA-Proliferationstest (über 120 Stunden) im Vergleich zu einer gemischten Lymphozytenkultur (MLC-Test) dargestellt. Dabei fällt ein höhere Zellaktivität der mitogen stimulierten Zellen gegenüber der allogenen stimulierten Zellen auf. Wie in den Diagrammen zuvor sind die Mittelwerte aus sechs Einzelwerten vier verschiedener Experimente dargestellt.

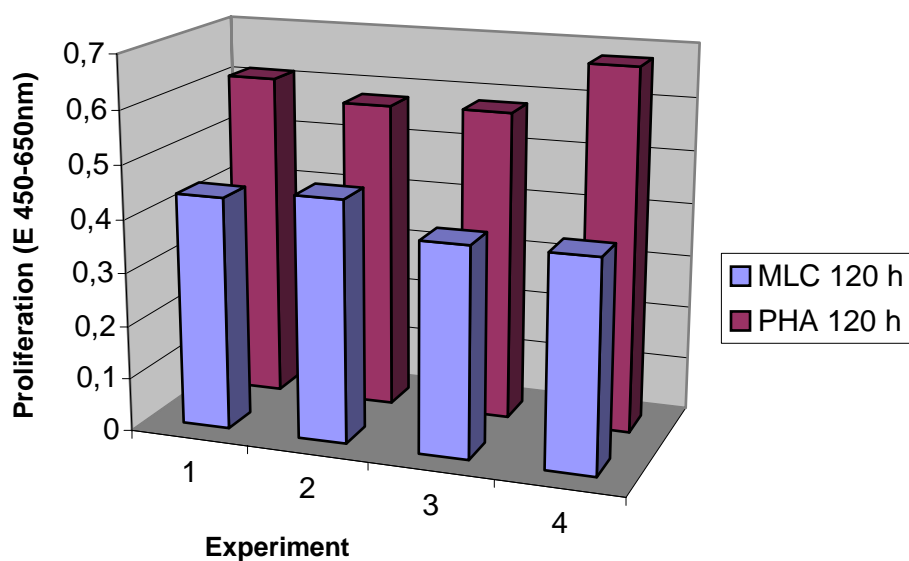


Abbildung 2c: Vergleich PHA-Proliferationstest (120 Stunden) und MLC-Test (120 Stunden). Auf der Ordinate sind die durchschnittlichen Messwerte aus vier verschiedenen Experimenten (Zahlen 1-4) aufgetragen. Auf der Abszisse ist die Zellproliferation (gemessen bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 650 nm) dargestellt.

3.5 Messgenauigkeit der durchgeführten Tests

Die beiden Substanzen NG-Monomethyl-L-Arginin und Quazinone werden nun exemplarisch in zwei Testsysteme (48h-Test und MLC-II-Test) eingesetzt und deren immunologische Wirkung gemessen.

Die beiden potentiell immunmodulierenden Substanzen werden als Einzelmesswerte aus sechs Parallelmesswerten ohne Bestimmung des Mittelwertes in den beiden zuvor genannten Tests dargestellt und untersucht. Dabei soll nicht nur die immunpotenzierende Wirkung der Substanzen gezeigt werden, sondern vielmehr die Messgenauigkeit unter unterschiedlichen Bedingungen (verschiedene Testansätze und die Anwesenheit verschiedener Substanzen), das heißt die geringen Abweichungen der einzelnen Messwerte werden genau dargestellt. In den Abbildungen 3a bis 4b ist die Standardabweichung der durchgeführten Messungen nie größer als 0,14.

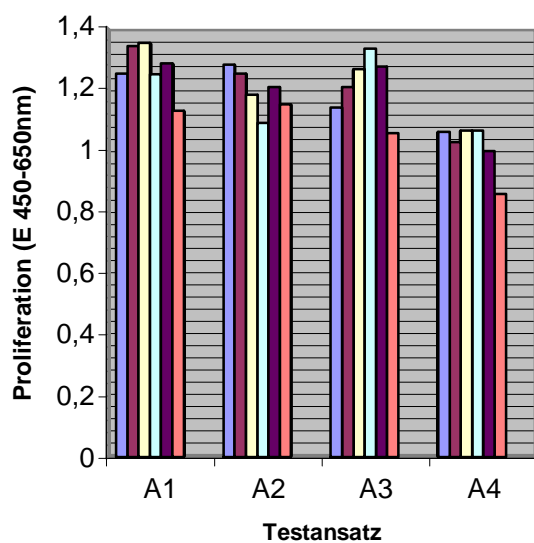


Abbildung 3a: Proliferation von PBMCs im 48-Stunden-Test bei drei verschiedenen Konzentrationen (A1-A3) der Testsubstanz NG-Monomethyl-L-Arginin (A). A4 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Substanz. Dargestellt sind die Einzelmesswerte aus sechs Parallelmessungen.

A1: 48 h-Test mit $c=1 \times 10^{-5}$

A3: 48 h-Test mit $c= 1 \times 10^{-12}$

A2: 48 h-Test mit $c=1 \times 10^{-9}$

A4: Referenzwert ohne Substanz

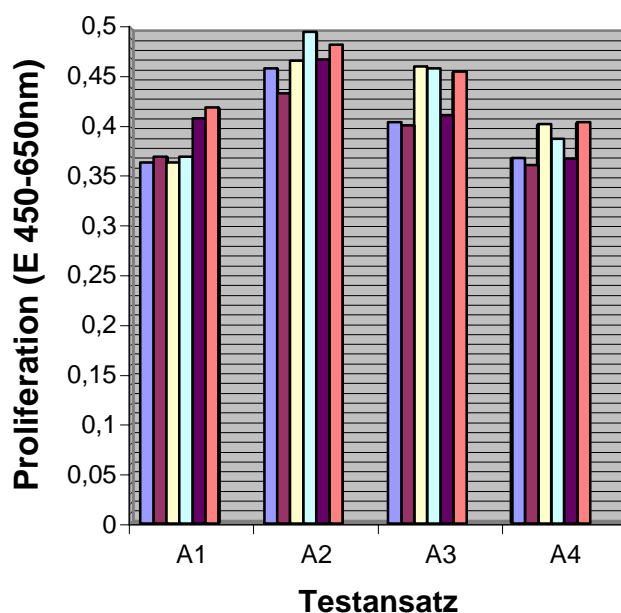


Abbildung 3b: Proliferation von PBMCs im MLC-II-Test bei drei verschiedenen Konzentrationen (A1-A3) der Testsubstanz NG-Monomethyl-L-Arginin (A). A4 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Substanz. Dargestellt sind die Einzelmesswerte aus sechs Parallelmessungen.

A1: MLC-II-Test mit $c=1 \times 10^{-5}$

A3: MLC-II-Test mit $c= 1 \times 10^{-12}$

A2: MLC-II-Test mit $c=1 \times 10^{-9}$

A4: Referenzwert ohne Substanz

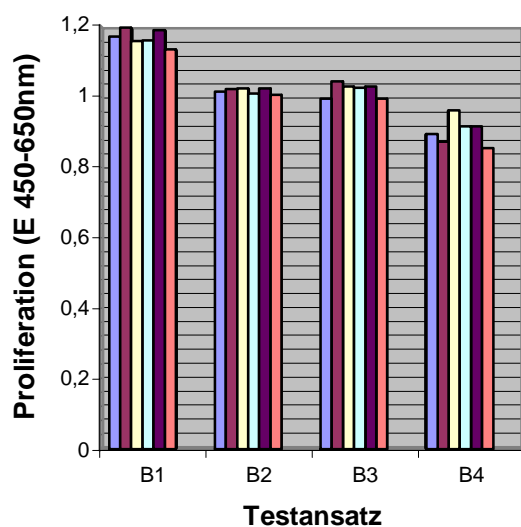


Abbildung 4a: Proliferation von PBMCs im 48-Stunden-Test bei drei verschiedenen Konzentrationen (B1-B3) der Testsubstanz Quazinone (B). B4 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Substanz. Dargestellt sind die Einzelmesswerte aus sechs Parallelmessungen.

B1: 48 h-Test mit $c=1 \times 10^{-5}$

B3: 48 h-Test mit $c=1 \times 10^{-12}$

B2: 48 h-Test mit $c=1 \times 10^{-9}$

B4: Referenzwert ohne Substanz

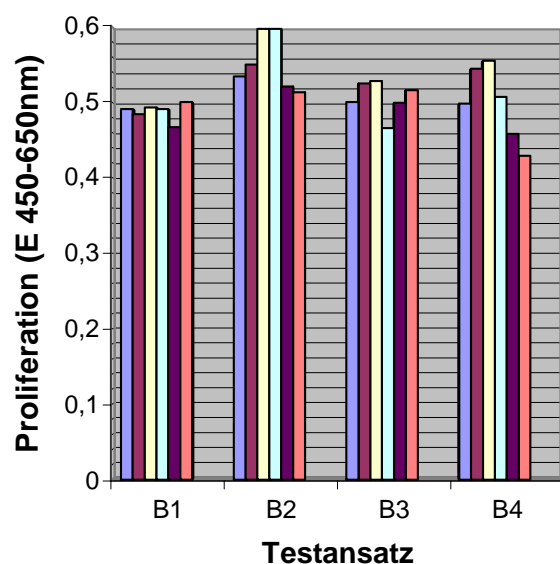


Abbildung 4b: Proliferation von PBMCs im MLC-II-Test bei drei verschiedenen Konzentrationen (B1-B3) der Testsubstanz Quazinone (B). B4 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Substanz. Dargestellt sind die Einzelmesswerte aus sechs Parallelmessungen.

B1: MLC-II-Test mit $c=1 \times 10^{-5}$

B3: MLC-II-Test mit $c=1 \times 10^{-12}$

B2: MLC-II-Test mit $c=1 \times 10^{-9}$

B4: Referenzwert ohne Substanz

3.6 Testung von Pharmaka

Verschiedene Rezeptorenblocker und Rezeptorsubtypen werden nun auf ihre immunologische Potenz getestet. Sie werden sowohl auf ihren Einfluss auf ruhende Zellen (48-Stunden-Test), als auch auf mitogene beeinflusste mononukleäre Zellen (MLC-II-Test) untersucht.

Das jeweils erste Diagramm zeigt den 48-Stunden-Test mit den Zellen des Individuums A (2×10^6 Zellen/ml), den 48-Stunden-Test mit den Zellen des Individuums B (2×10^6 Zellen/ml) und den MLC-II-Test mit den Zellen beider Individuen A+B (jeweils 1×10^6 Zellen/ml).

Das zweite Diagramm veranschaulicht, welche Auswirkungen die Verdopplung der Zellzahl auf die Proliferation der mononukleären Zellen hat:

Der erste Wert ergibt sich aus einem 48-Stunden-Test mit 2×10^6 Zellen/ml des Individuums A, der zweite aus einem 48-Stunden-Test mit *tatsächlich doppelter* Zellanzahl (4×10^6 Zellen/ml) und der dritte Wert aus einer *fiktiv errechneten Summe des Messwertes* von Individuum A, das heißt Messwert Individuum A + Messwert Individuum A.

Beim Vergleich verschiedener Rezeptorenblocker derselben Klasse werden die Messwerte wie beim ersten Diagramm dieser Tastreihe aufgetragen. Die Werte beziehen sich dabei prozentual auf die jeweilige Referenz.

3.6.1 DMPX (Antagonist des purinergen Rezeptors)

Die Testsubstanz DMPX steigert die Aktivität von mononukleären Zellen.

In Abbildung 5a wird die Wirkung des Rezeptorantagonisten DMPX auf ruhende Zellen und auf allogenen stimulierte Zellen untersucht. Dabei lässt sich in allen verwendeten Substanzkonzentrationen der Testansätze ein stimulierender Effekt auf mononukleären Zellen erkennen. Die stimulierende Wirkung von DMPX ist bei einer Konzentration von 1×10^{-5} gemessen an der jeweiligen Referenz am größten. Auffällig sind auch die deutlich höheren Messwerte in der allogenen Stimulation (MLC-II-Test). Dagegen sind in Abbildung 5b die Auswirkungen einer Verdopplung der Zellzahl während einer Inkubation mit der Substanz DMPX dargestellt. Bei einer Zellzahl von 4×10^6 Zellen/ml des Individuums A sind die Werte mehr als doppelt so hoch, als bei der eigentlich sonst immer verwendeten Zellzahl. Diese Steigerung der Proliferation unter dem Einfluss von DMPX ist nachweisbar höher, als bei einer Zellkonzentration von 2×10^6 Zellen/ml. Auch hier besitzt DMPX in einer Konzentration von 1×10^{-5} M den stärksten aktivitätssteigernden Effekt.

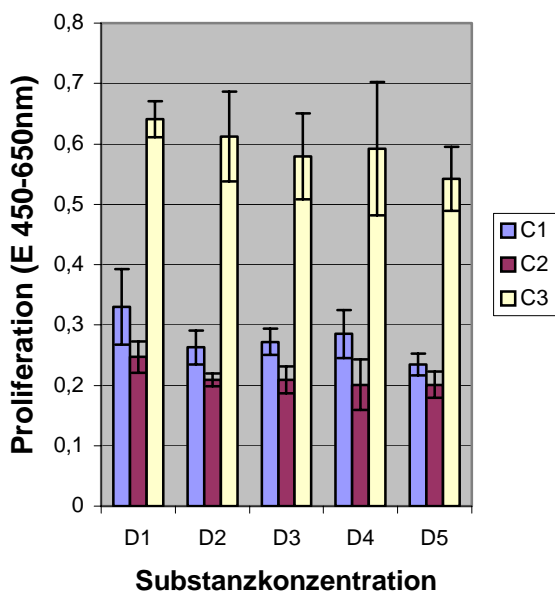


Abbildung 5a: Vergleich der Beeinflussbarkeit von ruhenden (C1 und C2) und allogen-stimulierten (C3) PBMCs durch die Testsubstanz DMPX (D), gemessen bei verschiedenen Konzentrationen (D1-D4). Jeweils ist eine Referenzmessung ohne Testsubstanz (D5) mit aufgeführt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

C1: ruhende Zellen des Individuums A (2×10^6 Zellen/ml)

C2: ruhende Zellen des Individuums B (2×10^6 Zellen/ml)

C3: MLC-II-Test (A+B jeweils 1×10^6 Zellen /ml)

D1: DMPX 1×10^{-5} M

D2: DMPX 1×10^{-9} M

D3: DMPX 1×10^{-12} M

D4: DMPX 1×10^{-15} M

D5: Referenzmessung ohne Testsubstanz

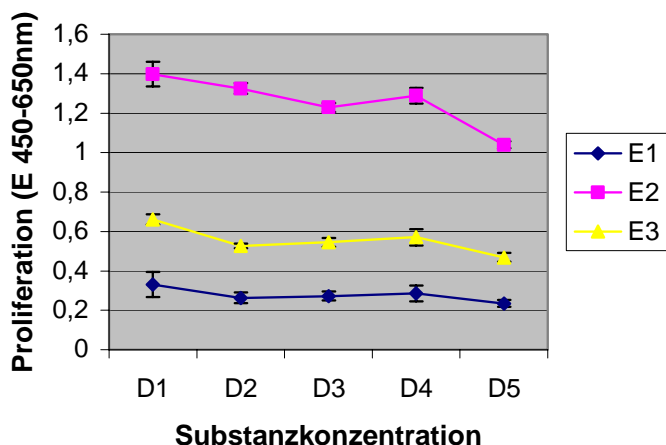


Abbildung 5b: Einfluss von unterschiedlichen Zellkonzentrationen (E1 und E2) auf die PBMC-Aktivität in Anwesenheit der Testsubstanz DMPX (D) in verschiedenen Konzentrationen (D1-D4). D5 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Testsubstanz. E3 ist fiktiv die doppelte Zellzahl von E1, das heißt der Messwert bei der Konzentration von E1 wird mit dem Faktor 2 multipliziert und im Vergleich zum tatsächlichen Mess-

wert bei doppelter Zellzahl (E2) dargestellt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

E1: ruhende Zellen des Individuums A in einer $c = 2 \times 10^6$ Zellen/ml

E2: ruhende Zellen des Individuums A in einer $c = 4 \times 10^6$ Zellen/ml

E3: Messwert von E1 multipliziert mit Faktor 2

D1: DMPX 1×10^{-5} M

D2: DMPX 1×10^{-9} M

D3: DMPX 1×10^{-12} M

D4: DMPX 1×10^{-15} M

D5: Referenzmessung ohne Testsubstanz

3.6.2 Atenolol, Metoprolol und Propranolol (beta-Adrenorezeptor Antagonisten)

Der β_2 -Adrenoantagonist Atenolol wirkt auf mononukleäre Zellen proliferationsfördernd. Die beiden anderen getesteten β -Blocker (Metoprolol und Propranolol) wirken dagegen suppressiv.

In diesem Testansatz werden drei häufig im klinischen Alltag verwendete β -Blocker auf ihre immunologische Potenz untersucht:

Für Atenolol zeigt sich ein deutlich positiver Effekt auf die Proliferation von mononukleären Zellen (Abbildung 6a). Dieser Trend ist sowohl bei ruhenden Zellen der Individuen A und B, als auch beim MLC-II-Test deutlich erkennbar. Die Konzentration von Atenolol wirkt sich unterschiedlich auf die Testansätze aus. Keine Substanzkonzentration lässt einen allgemeingültigen Trend erkennen. Hervorzuheben ist eine generell stärkere Aktivität der Zellen des Individuums B. Bei Verdopplung der Zellzahl (von 2×10^6 Zellen/ml auf 4×10^6 Zellen/ml) zeigt sich zwar eine grundsätzlich höhere Aktivität der Zellen, jedoch im Vergleich zum Referenzwert wirkt Atenolol eindeutig suppressiv (Abbildung 6b). Dabei zeigt die Substanz in der Konzentration 1×10^{-5} M die stärkste, in der Konzentration 1×10^{-15} M die schwächste Suppression.

Die Wirkung des β -Blockers Metoprolol auf die verschiedenen Individuen unterscheidet sich erheblich. Dies wird in Abbildung 7a deutlich: Auf die Zellen der Person A wirkt Metoprolol proliferationsfördernd, auf die der Person B dagegen hat der β -Blocker nur einen geringen Einfluss oder wirkt sogar suppressiv (Konzentration 1×10^{-5}). Im MLC-II-Test sind die Werte im Allgemeinen deutlich höher, als in den anderen dargestellten Tests. Doch bezogen auf die Referenz lässt sich ein suppressiver Trend beobachten. Eine Ausnahme stellt die Konzentration 1×10^{-15} M dar. Hier kann man eine leichte Aktivierung erkennen. Bei Verdopplung der Zellzahl (Abbildung 7b) lässt sich ebenfalls eine proliferationsfördernde Wirkung nachweisen. Doch unterschiedliche Substanzkonzentrationen rufen bei unterschiedlichen Zellzahlen eine andere Reaktion der mononukleären Zellen hervor. Die Proliferation ist bei einer Zellzahl von 2×10^6 Zellen/ml in der Konzentration von 1×10^{-9} M am größten. Bei doppelter Zellzahl dagegen zeigt sich dies in der niedrigsten Konzentration (1×10^{-15} M).

Abbildung 8a zeigt die Wirkung des beta₂-Adrenorezeptor Antagonisten Propranolol auf mononukleäre Zellen. Das Medikament wirkt in den hier gegenübergestellten Versuchen suppressiv. Auf die ruhenden Zellen der Person A und im MLC-II-Test wirkt Propranolol in der Konzentration 1×10^{-15} M aktivierend. Dieser Effekt ist beim MLC-II-Test noch deutlicher erkennbar.

Abbildung 8b beschreibt den Effekt des Pharmakons Propranolol auf mononukleäre Zellen bei einer Zellzahl von 2×10^6 Zellen/ml und 4×10^6 Zellen/ml. Die Aktivität ist zwar bei Erhöhung der Zellzahl höher, aber verglichen zur Referenzmessung wirkt Propranolol bei einer Anzahl von 4×10^6 Zellen/ml in allen Substanzkonzentrationen nachweisbar suppressiv. Zusätzlich lässt sich eine stärkere Neigung zur Suppression bei höheren Substanzkonzentrationen (1×10^{-5} M und 1×10^{-9} M) feststellen.

Zudem werden nun die zuvor einzeln untersuchten beta₂-Adrenorezeptor Antagonisten (Atenolol, Metoprolol und Propranolol) im Vergleich gegenübergestellt (Abbildung 9): Atenolol wirkt in allen Substanzkonzentrationen in der gemischten Leukozytenkultur proliferativ. Die nachweislich stärkste aktivierende Fähigkeit besitzt Atenolol in den niedrigen Konzentrationen 1×10^{-12} M und 1×10^{-15} M (mit 20% beziehungsweise 35 %). Metoprolol und auch Propranolol wirken dagegen suppressiv. Auffallend ist ein leichter aktivierender Effekt der beiden β -Blocker in der Konzentration 1×10^{-12} M und 1×10^{-15} M (4% und 7%). Mithin kann eine proliferative Wirkung aller Beta₂-Adrenorezeptor Antagonisten in der Konzentration 1×10^{-15} M nachgewiesen werden.

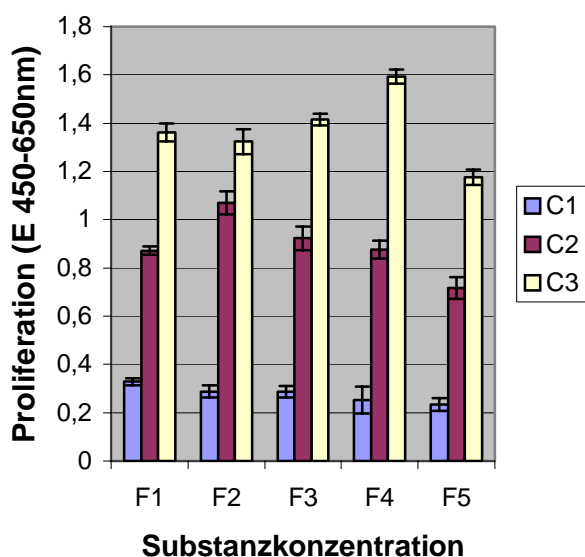


Abbildung 6a: Vergleich der Beeinflussbarkeit von ruhenden (C1 und C2) und allogen-stimulierten (C3) PBMCs durch die Testsubstanz Atenolol (F), gemessen bei verschiedenen Konzentrationen (F1-F4). Jeweils

ist eine Referenzmessung ohne Testsubstanz (F5) mit aufgeführt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

C1: ruhende Zellen des Individuums A (2×10^6 Zellen/ml)

C2: ruhende Zellen des Individuums B (2×10^6 Zellen/ml)

C3: MLC-II-Test (A+B jeweils 1×10^6 Zellen/ml)

F1: Atenolol 1×10^{-5} M **F2:** Atenolol 1×10^{-9} M **3:** Atenolol 1×10^{-12} M

F4: Atenolol 1×10^{-15} M **D5:** Referenzmessung ohne Testsubstanz

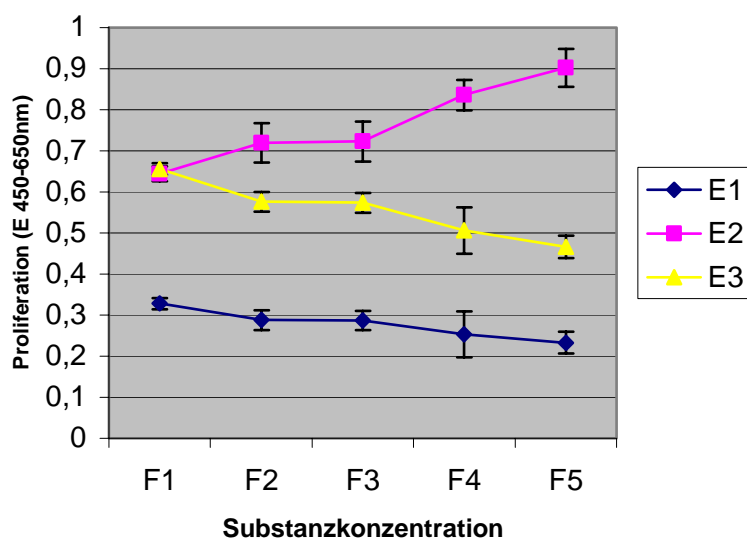


Abbildung 6b: Einfluss von unterschiedlichen Zellkonzentrationen (E1 und E2) auf die PBMC-Aktivität in Anwesenheit der Testsubstanz Atenolol (F) in verschiedenen Konzentrationen (F1-F4). F5 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Testsubstanz. E3 ist fiktiv die doppelte Zellzahl von E1, dass heißt der Messwert bei der Konzentration von E1 wird mit dem Faktor 2 multipliziert und im Vergleich zum tatsächlichen Messwert bei doppelter Zellzahl (E2) dargestellt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

E1: ruhende Zellen des Individuums A in einer $c = 2 \times 10^6$ Zellen/ml

E2: ruhende Zellen des Individuums A in einer $c = 4 \times 10^6$ Zellen/ml

E3: Messwert von E1 multipliziert mit Faktor 2

F1: Atenolol 1×10^{-5} M

F2: Atenolol 1×10^{-9} M

F3: Atenolol 1×10^{-12} M

F4: Atenolol 1×10^{-15} M

F5: Referenzmessung ohne Testsubstanz

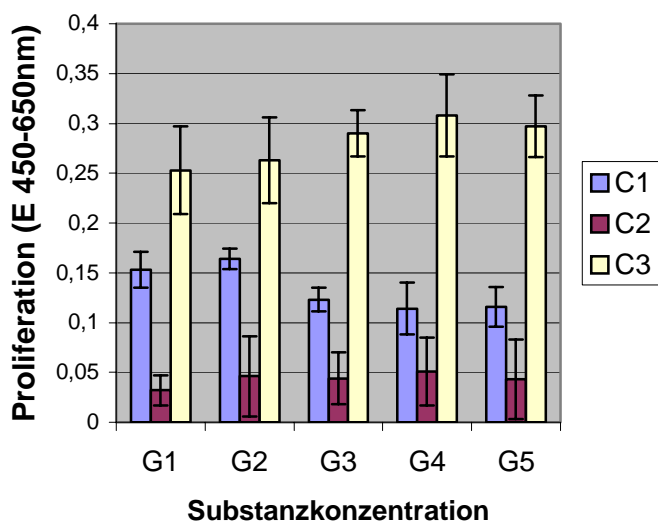


Abbildung 7a: Vergleich der Beeinflussbarkeit von ruhenden (C1 und C2) und allogen-stimulierten (C3) PBMCs durch die Testsubstanz Metoprolol (G), gemessen bei verschiedenen Konzentrationen (G1-G4). Jeweils ist eine Referenzmessung ohne Testsubstanz (G5) mit aufgeführt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

C1: ruhende Zellen des Individuums A (2×10^6 Zellen/ml)

C2: ruhende Zellen des Individuums B (2×10^6 Zellen/ml)

C3: MLC-II-Test (A+B jeweils 1×10^6 Zellen/ml)

G1: Metoprolol 1×10^{-5} M

G2: Metoprolol 1×10^{-9} M

G3: Metoprolol 1×10^{-12} M

G4: Metoprolol 1×10^{-15} M

G5: Referenzmessung ohne Testsubstanz

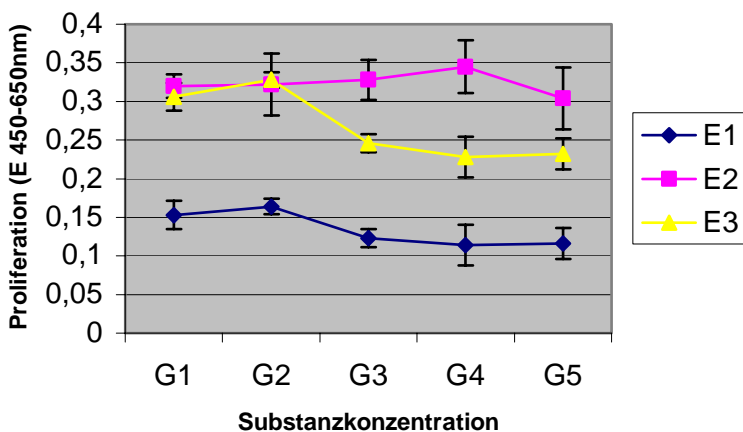


Abbildung 7b: Einfluss von unterschiedlichen Zellkonzentrationen (E1 und E2) auf die PBMC-Aktivität in Anwesenheit der Testsubstanz Metoprolol (G) in verschiedenen Konzentrationen (G1-G4). G5 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Testsubstanz. E3 ist fiktiv die doppelte Zellzahl von E1, dass heißt der Messwert bei der Konzentration von E1 wird mit dem Faktor 2 multipliziert und im Vergleich zum tatsächlichen Messwert bei doppelter Zellzahl (E2) dargestellt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

E1: ruhende Zellen des Individuums A in einer $c= 2 \times 10^6$ Zellen/ml

E2: ruhende Zellen des Individuums A in einer $c= 4 \times 10^6$ Zellen/ml

E3: Messwert von E1 multipliziert mit Faktor 2

G1: Metoprolol 1×10^{-5} M

G2: Metoprolol 1×10^{-9} M

G3: Metoprolol 1×10^{-12} M

G4: Metoprolol 1×10^{-15} M

G5: Referenzmessung ohne Testsubstanz

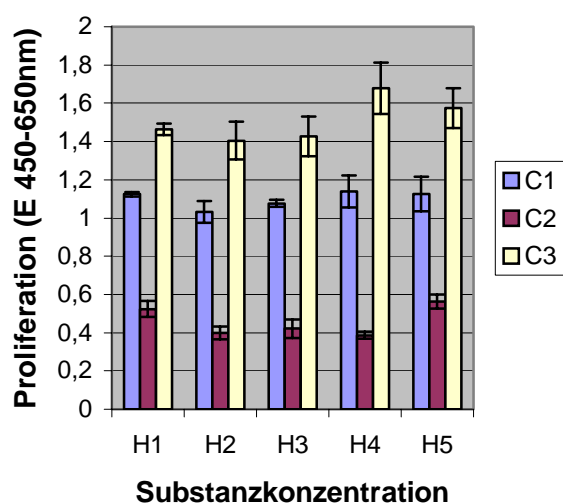


Abbildung 8a: Vergleich der Beeinflussbarkeit von ruhenden (C1 und C2) und allogen-stimulierten (C3) PBMCs durch die Testsubstanz Propranolol (H), gemessen bei verschiedenen Konzentrationen (H1-H4). Jeweils ist eine Referenzmessung ohne Testsubstanz (H5) mit aufgeführt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

C1: ruhende Zellen des Individuums A (2×10^6 Zellen/ml)

C2: ruhende Zellen des Individuums B (2×10^6 Zellen/ml)

C3: MLC-II-Test (A+B jeweils 1×10^6 Zellen/ml)

H1: Propranolol 1×10^{-5} M

H2: Propranolol 1×10^{-9} M

3: Propranolol 1×10^{-12} M

H4: Propranolol 1×10^{-15} M

H5: Referenzmessung ohne Testsubstanz

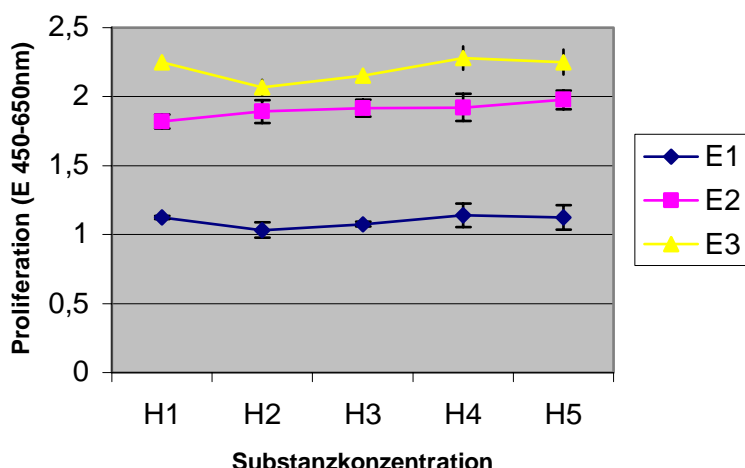


Abbildung 8b: Einfluss von unterschiedlichen Zellkonzentrationen (E1 und E2) auf die PBMC-Aktivität in Anwesenheit der Testsubstanz Propranolol (H) in verschiedenen Konzentrationen (H1-H4). H5 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Testsubstanz. E3 ist fiktiv die doppelte Zellzahl von E1, dass heißt der Messwert bei der Konzentration von E1 wird mit dem Faktor 2 multipliziert und im Vergleich zum tatsächlichen Messwert bei doppelter Zellzahl (E2) dargestellt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

E1: ruhende Zellen des Individuums A in einer $c = 2 \times 10^6$ Zellen/ml

E2: ruhende Zellen des Individuums A in einer $c = 4 \times 10^6$ Zellen/ml

E3: Messwert von E1 multipliziert mit Faktor 2

H1: Propranolol 1×10^{-5} M

H2: Propranolol 1×10^{-9} M

H3: Propranolol 1×10^{-12} M

H4: Propranolol 1×10^{-15} M

H5: Referenzmessung ohne Testsubstanz

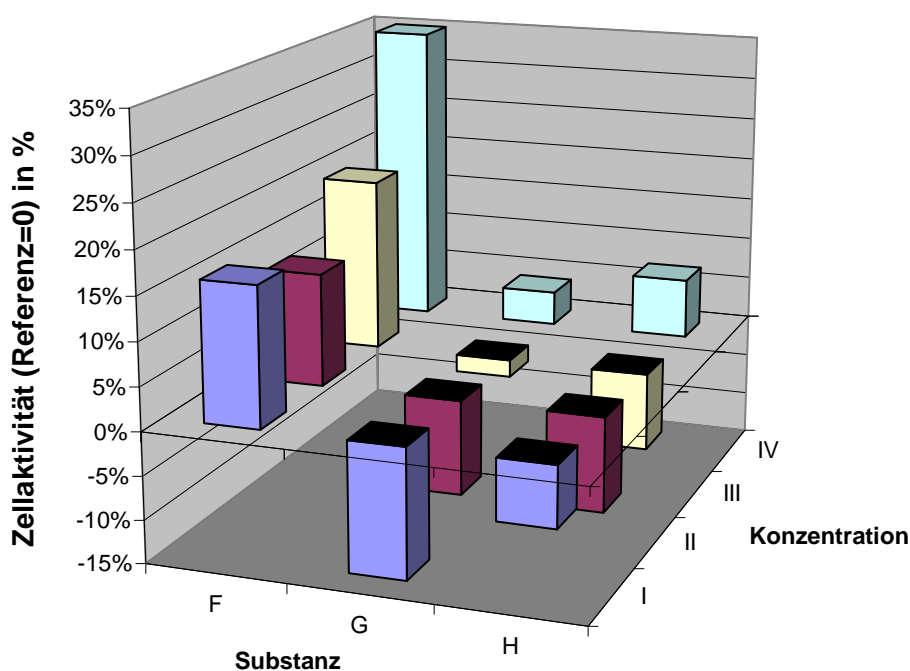


Abbildung 9: Vergleich verschiedener β -Blocker Atenolol (F), Metoprolol (G) und Propranolol (H) im MLC-II-Test (A+B) bei den verschiedenen Substanzkonzentrationen I-IV. Die Messwerte sind prozentual zur Referenzmessung dargestellt.

F: Atenolol G: Metoprolol H: Propranolol
 I: Konzentration 1×10^{-5} M II: Konzentration 1×10^{-9} M
 III: Konzentration 1×10^{-12} M IV: Konzentration 1×10^{-15} M

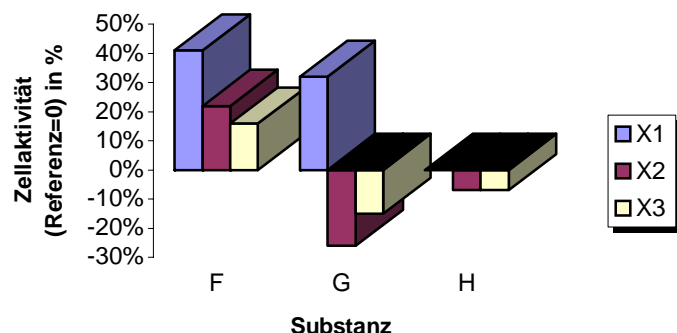


Abbildung 10a: 1×10^{-5} M

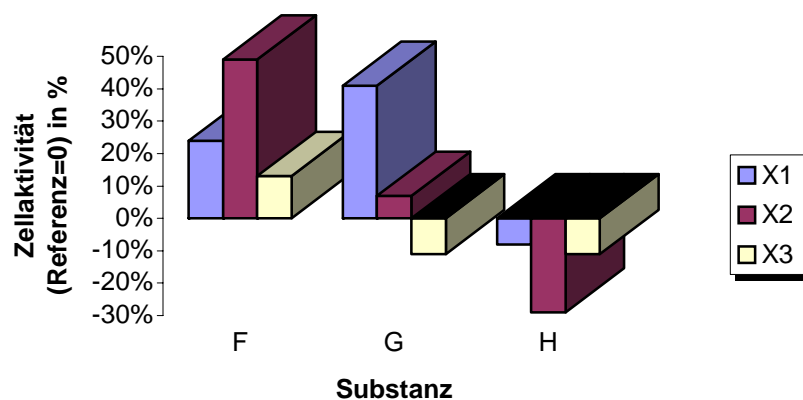


Abbildung 10b: 1×10^{-9} M

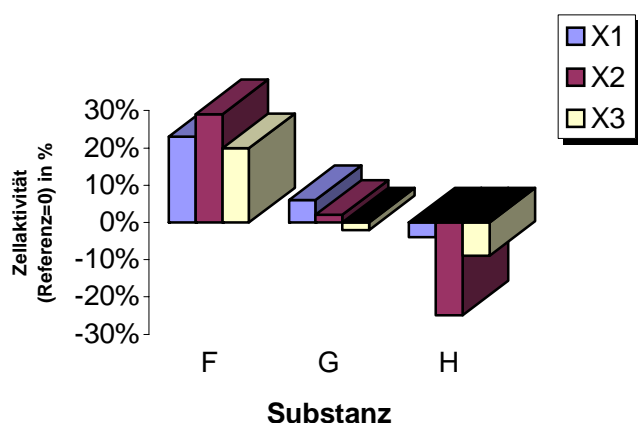
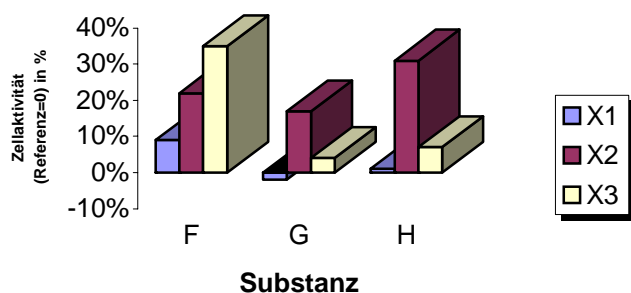
Abbildung 10c: 1x10⁻¹² MAbbildung 10d: 1x10⁻¹⁵ M

Abbildung 10 a-d: Einfluss verschiedener β -Blocker Atenolol (F), Metoprolol (G) und Propranolol (H) auf die allogene Stimulierbarkeit (MLC-II-Test) von PBMCs. In den Diagrammen a-d wird dieser Einfluss für jede der vier Substanzkonzentrationen (1x10⁻⁵ M, 1x10⁻⁹ M, 1x10⁻¹² M und 1x10⁻¹⁵ M) einzeln dargestellt. Die Messwerte sind prozentual zur Referenzmessung dargestellt.

F: Atenolol	X1: Referenz 1 Individuum A (2x10 ⁶ Zellen/ml)
G: Metoprolol	X2: Referenz 2 Individuum B (2x10 ⁶ Zellen/ml)
H: Propranolol	X3: MLC-II-Test (Zellen A+ Zellen B, jeweils 1x10 ⁶ Zellen/ml)

3.6.3 Cimetidin (H₂-Rezeptor Antagonist)

Cimetidin wirkt suppressiv auf mononukleäre Zellen.

Anhand der Abbildung 11a lässt sich der immunologische Effekt des H₂-Rezeptor Antagonisten Cimetidin erläutern: Auf Zellen der Testperson A wirkt Cimetidin suppressiv. Dabei ist die stärkste Suppression in der Konzentration 1x10⁻⁵ M erkennbar. Mit geringerer Konzentration nimmt auch die Neigung zur Suppression ab. Testperson B hingegen zeigt, sowohl eine Suppression, als auch eine leichte Aktivierung. Im MLC-II-Test kann eine generelle Suppression

beobachtet werden. Bedeutsame Unterschiede der Substanzkonzentrationen, bezüglich der Suppression, sind nicht nachweisbar. Eine Verdopplung der Zellzahl (von 2×10^6 Zellen/ml auf 4×10^6 Zellen/ml) führt, zum einen zu einer höheren Grundaktivität, zum anderen auch zu einer Aktivitätssteigerung der Zellen im Verhältnis zur Referenz (Abbildung 11b). Dabei ist die proliferierende Wirkung von Cimetidin in der Konzentration 1×10^{-9} M am deutlichsten.

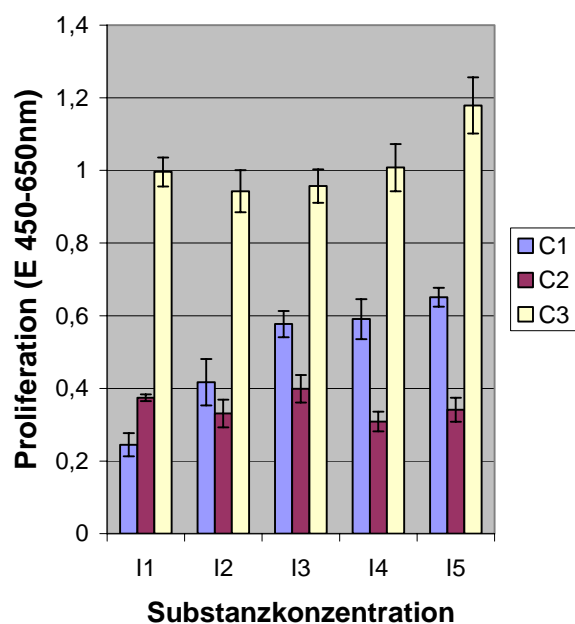


Abbildung 11a: Vergleich der Beeinflussbarkeit von ruhenden (C1 und C2) und allogenen-stimulierten (C3) PBMCs durch die Testsubstanz Cimetidin (I), gemessen bei verschiedenen Konzentrationen (I1-I4). Jeweils ist eine Referenzmessung ohne Testsubstanz (I5) mit aufgeführt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

C1: ruhende Zellen des Individuums A (2×10^6 Zellen/ml)

C2: ruhende Zellen des Individuums B (2×10^6 Zellen/ml)

C3: MLC-II-Test (A+B jeweils 1×10^6 Zellen/ml)

I1: Cimetidin 1×10^{-5} M

2: Cimetidin 1×10^{-9} M

I3: Cimetidin 1×10^{-12} M

I4: Cimetidin 1×10^{-15} M

5: Referenzmessung ohne Testsubstanz

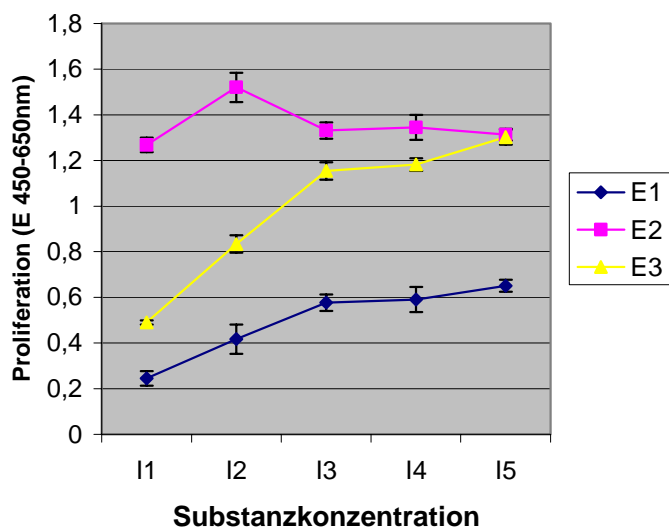


Abbildung 11b: Einfluss von unterschiedlichen Zellkonzentrationen (E1 und E2) auf die PBMC-Aktivität in Anwesenheit der Testsubstanz Cimetidin (I) in verschiedenen Konzentrationen (I1-I4). I5 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Testsubstanz. E3 ist fiktiv die doppelte Zellzahl von E1, das heißt der Messwert bei der Konzentration von E1 wird mit dem Faktor 2 multipliziert und im Vergleich zum tatsächlichen Messwert bei doppelter Zellzahl (E2) dargestellt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

E1: ruhende Zellen des Individuums A in einer $c = 2 \times 10^6$ Zellen/ml

E2: ruhende Zellen des Individuums A in einer $c = 4 \times 10^6$ Zellen/ml

E3: Messwert von E1 multipliziert mit Faktor 2

I1: Cimetidin 1×10^{-5} M

I2: Cimetidin 1×10^{-9} M

I3: Cimetidin 1×10^{-12} M

I4: Cimetidin 1×10^{-15} M

I5: Referenzmessung ohne Testsubstanz

3.6.4 ASS, Indomethacin und Diclofenac (PGE₂-Rezeptor Antagonisten)

Diclofenac wirkt proliferationsfördernd auf mononukleäre Zellen; Acetylsalicylsäure wirkt sowohl aktivierend, als auch suppressiv; Indomethacin wirkt dagegen nur suppressierend

In Abbildung 12a wird der immunologische Einfluss eines der bekanntesten Medikamente überhaupt, der ASS, dargestellt: Auf ruhende Zellen beider Individuen wirkt ASS proliferationsfördernd. Bei den A-Zellen ist die stärkste Wirkung in der Substanzkonzentration von 1×10^{-9} M erkennbar, bei den Zellen des zweiten Individuums (B) hingegen bei einer Konzentration von 1×10^{-15} M. Dieser Aktivitätssteigerung in der Konzentration 1×10^{-9} M lässt sich auch beim MLC-II-Test nachweisen, obwohl hier ASS suppressiv wirkt. Die darauf folgende Abbildung 12b vergleicht bei zwei verschiedenen Zellkonzentrationen den immunologischen Einfluss des PGE₂-Rezeptor Antagonisten ASS. Aus dem Diagramm lässt sich eine Steigerung der Zellakti-

vität nachweisen, fast genauso wie sie im rechnerisch ermittelten Beispiel (2xA) erkennbar ist. Die stärkste proliferierende Wirkung hat ASS demnach in der Konzentration 1×10^{-9} M.

Abbildung 13a beschreibt den suppressiven Einfluss des Medikaments Indomethacin auf mononukleäre Zellen: Auf die ruhenden Zellen beider Personen ist, mit Ausnahme der Konzentration 1×10^{-12} M, bei den B-Zellen, bei denen eine leichte Aktivierung erkennbar ist, ein suppressives Verhalten zu beobachten. Die stärkste Suppression ist in der Konzentration 1×10^{-5} M in allen Tests ersichtlich.

Abbildung 13b zeigt die Untersuchung der Substanz Indomethacin bei unterschiedlichen Zellzahlen. Bei doppelter Zellzahl (4×10^6 Zellen/ml) fällt eine Umkehr der Suppression, hin zu einer leichten Aktivierung auf. Außer bei einer Substanzkonzentration von 1×10^{-5} M ist dieser proliferationsfördernde Einfluss bei allen übrigen Konzentrationen von Indomethacin erkennbar.

Abbildung 14a macht den proliferativen Effekt des sehr häufig gebrauchten Medikaments Diclofenac eindrucksvoll deutlich. Auf die ruhenden Zellen beider Individuen (A und B) wirkt Diclofenac in gleicher Weise. So findet die stärkste Aktivierung bei einer Konzentration von 1×10^{-12} M statt. Auf die gemischte Lymphozytenkultur (MLC-II-Test) hat das Pharmakon eine noch wesentlich stärkere aktivierende Wirkung. Die Aktivierungspotenz von Diclofenac ist im MLC-II-Test umso stärker, je höher die Substanzkonzentration ist (größter Messwert bei der Konzentration 1×10^{-5} M).

Abbildung 14b unterstreicht den in Abb. 14a beschriebenen proliferativen Einfluss des PGE₂-Rezeptor Antagonisten Diclofenac. Die doppelte Menge an Zellen der Testperson A (4×10^6 Zellen/ml) wird durch Diclofenac stärker aktiviert. Je höher die Zellkonzentration ist, desto stärker werden die mononukleären Zellen in diesem Testansatz (4×10^6 Zellen/ml) aktiviert.

Abbildung 15 zeigt die zuvor einzeln untersuchten PGE₂-Rezeptor Antagonisten ASS, Diclofenac und Indomethacin: Die hier verglichenen einzelnen MLC-II-Tests der drei Medikamente weisen die proliferationssteigernde Wirkung von Diclofenac eindrucksvoll nach. Die Abhängigkeit von der Substanzkonzentration ist gut erkennbar (70% bei 1×10^{-5} M, 47% bei 1×10^{-9} M, 38% bei 1×10^{-12} M und 37% bei 1×10^{-15} M). ASS wirkt bis auf die leichte Aktivierung in der Konzentration 1×10^{-15} M (3%) suppressiv. Indomethacin zeigt keinerlei Aktivierungstendenz. Die stärkste Suppression ist bei einer Substanzkonzentration von 1×10^{-5} M mit -41% erkennbar.

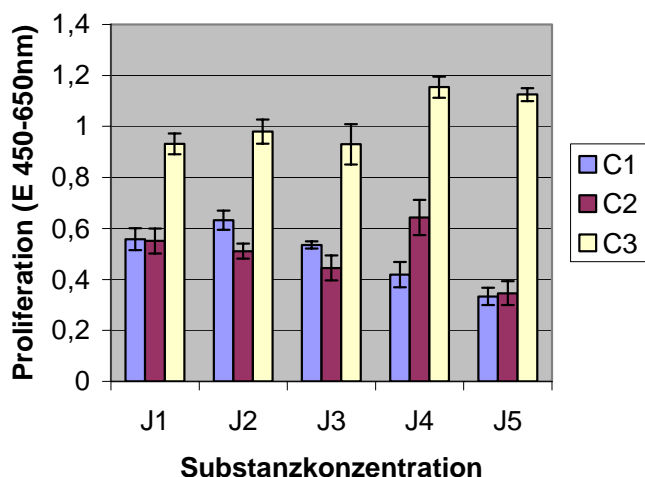


Abbildung 12a: Vergleich der Beeinflussbarkeit von ruhenden (C1 und C2) und allogen-stimulierten (C3) PBMCs durch die Testsubstanz ASS (J), gemessen bei verschiedenen Konzentrationen (J1-J4). Jeweils ist eine Referenzmessung ohne Testsubstanz (J5) mit aufgeführt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

C1: ruhende Zellen des Individuums A (2×10^6 Zellen/ml)

C2: ruhende Zellen des Individuums B (2×10^6 Zellen/ml)

C3: MLC-II-Test (A+B jeweils 1×10^6 Zellen/ml)

J1: ASS 1×10^{-5} M

J2: ASS 1×10^{-9} M

J3: ASS 1×10^{-12} M

J4: ASS 1×10^{-15} M

J5: Referenzmessung ohne Testsubstanz

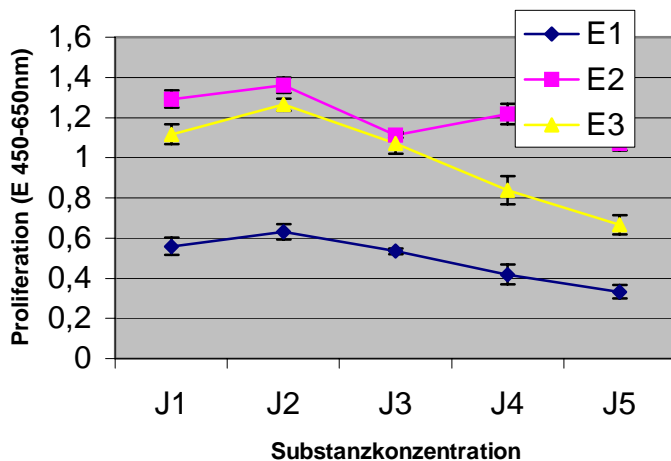


Abbildung 12b: Einfluss von unterschiedlichen Zellkonzentrationen (E1 und E2) auf die PBMC-Aktivität in Anwesenheit der Testsubstanz ASS (J) in verschiedenen Konzentrationen (J1-J4). J5 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Testsubstanz. E3 ist fiktiv die doppelte Zellzahl von E1, das heißt der Messwert bei der Konzentration von E1 wird mit dem Faktor 2 multipliziert und im Vergleich zum tatsächlichen Messwert bei doppelter Zellzahl (E2) dargestellt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

E1: ruhende Zellen des Individuums A in einer $c = 2 \times 10^6$ Zellen/ml

E2: ruhende Zellen des Individuums A in einer $c= 4 \times 10^6$ Zellen/ml

E3: Messwert von E1 multipliziert mit Faktor 2

J1: ASS 1×10^{-5} M

J2: ASS 1×10^{-9} M

J3: ASS 1×10^{-12} M

J4: ASS 1×10^{-15} M

J5: Referenzmessung ohne Testsubstanz

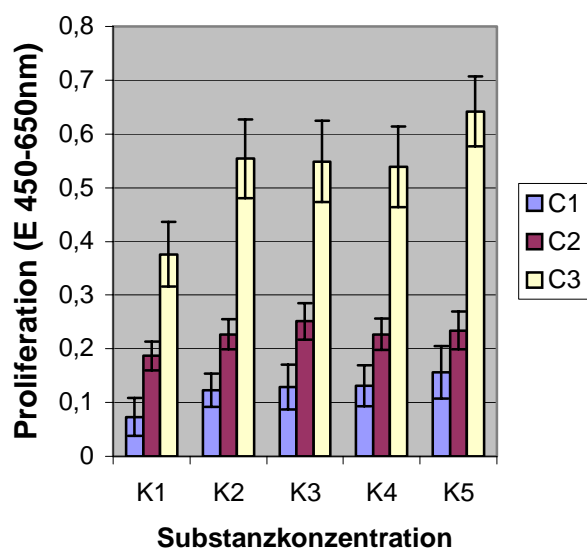


Abbildung 13a: Vergleich der Beeinflussbarkeit von ruhenden (C1 und C2) und allogen-stimulierten (C3) PBMCs durch die Testsubstanz Indomethacin (K), gemessen bei verschiedenen Konzentrationen (K1-K4). Jeweils ist eine Referenzmessung ohne Testsubstanz (K5) mit aufgeführt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

C1: ruhende Zellen des Individuums A (2×10^6 Zellen/ml)

C2: ruhende Zellen des Individuums B (2×10^6 Zellen/ml)

C3: MLC-II-Test (A+B jeweils 1×10^6 Zellen/ml)

K1: Indomethacin 1×10^{-5} M

K2: Indomethacin 1×10^{-9} M

3: Indomethacin 1×10^{-12} M

K4: Indomethacin 1×10^{-15} M

K5: Referenzmessung ohne Testsubstanz

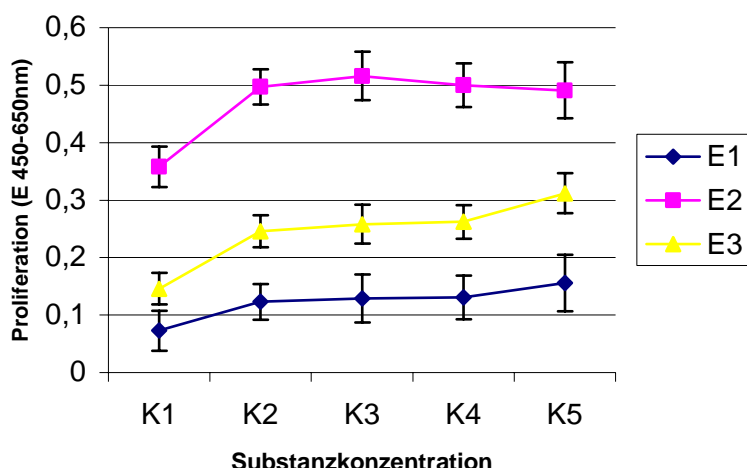


Abbildung 13b: Einfluss von unterschiedlichen Zellkonzentrationen (E1 und E2) auf die PBMC-Aktivität in Anwesenheit der Testsubstanz Indomethacin (K) in verschiedenen Konzentrationen (K1-K4). K5 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Testsubstanz. E3 ist fiktiv die doppelte Zellzahl von E1, dass heißt der Messwert bei der Konzentration von E1 wird mit dem Faktor 2 multipliziert und im Vergleich zum tatsächlichen Messwert bei doppelter Zellzahl (E2) dargestellt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

E1: ruhende Zellen des Individuums A in einer $c= 2 \times 10^6$ Zellen/ml

E2: ruhende Zellen des Individuums A in einer $c= 4 \times 10^6$ Zellen/ml

E3: Messwert von E1 multipliziert mit Faktor 2

K1: Indomethacin 1×10^{-5} M

K2: Indomethacin 1×10^{-9} M

K3: Indomethacin 1×10^{-12} M

K4: Indomethacin 1×10^{-15} M

K5: Referenzmessung ohne Testsubstanz

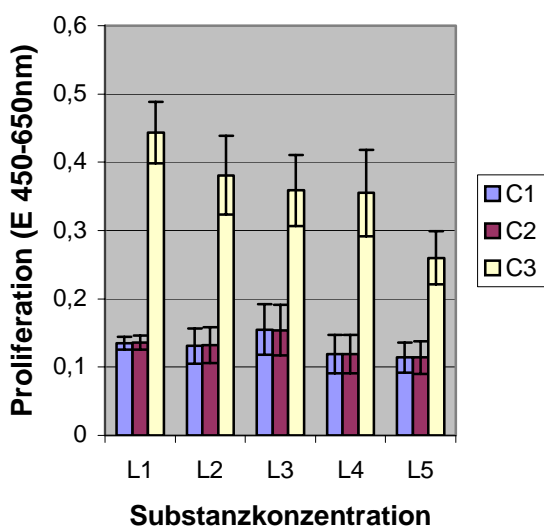


Abbildung 14a: Vergleich der Beeinflussbarkeit von ruhenden (C1 und C2) und allogen-stimulierten (C3) PBMCs durch die Testsubstanz Diclofenac (L), gemessen bei verschiedenen Konzentrationen (L1-L4). Je-

weils ist eine Referenzmessung ohne Testsubstanz (L5) mit aufgeführt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

C1: ruhende Zellen des Individuums A (2×10^6 Zellen/ml)

C2: ruhende Zellen des Individuums B (2×10^6 Zellen/ml)

C3: MLC-II-Test (A+B jeweils 1×10^6 Zellen/ml)

L1: Diclofenac 1×10^{-5} M

L2: Diclofenac 1×10^{-9} M

L3: Diclofenac 1×10^{-12} M

L4: Diclofenac 1×10^{-15} M

L5: Referenzmessung ohne Testsubstanz

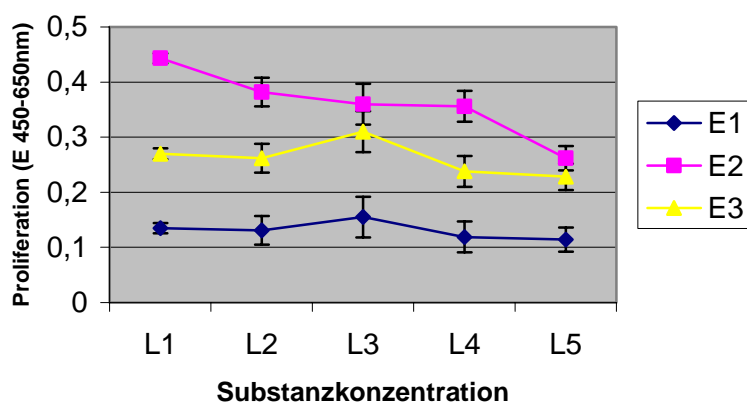


Abbildung 14b: Einfluss von unterschiedlichen Zellkonzentrationen (E1 und E2) auf die PBMC-Aktivität in Anwesenheit der Testsubstanz Diclofenac (L) in verschiedenen Konzentrationen (L1-L4). L5 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Testsubstanz. E3 ist fiktiv die doppelte Zellzahl von E1, dass heißt der Messwert bei der Konzentration von E1 wird mit dem Faktor 2 multipliziert und im Vergleich zum tatsächlichen Messwert bei doppelter Zellzahl (E2) dargestellt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

E1: ruhende Zellen des Individuums A in einer $c = 2 \times 10^6$ Zellen/ml

E2: ruhende Zellen des Individuums A in einer $c = 4 \times 10^6$ Zellen/ml

E3: Messwert von E1 multipliziert mit Faktor 2

L1: Diclofenac 1×10^{-5} M

L2: Diclofenac 1×10^{-9} M

L3: Diclofenac 1×10^{-12} M

L4: Diclofenac 1×10^{-15} M

L5: Referenzmessung ohne Testsubstanz

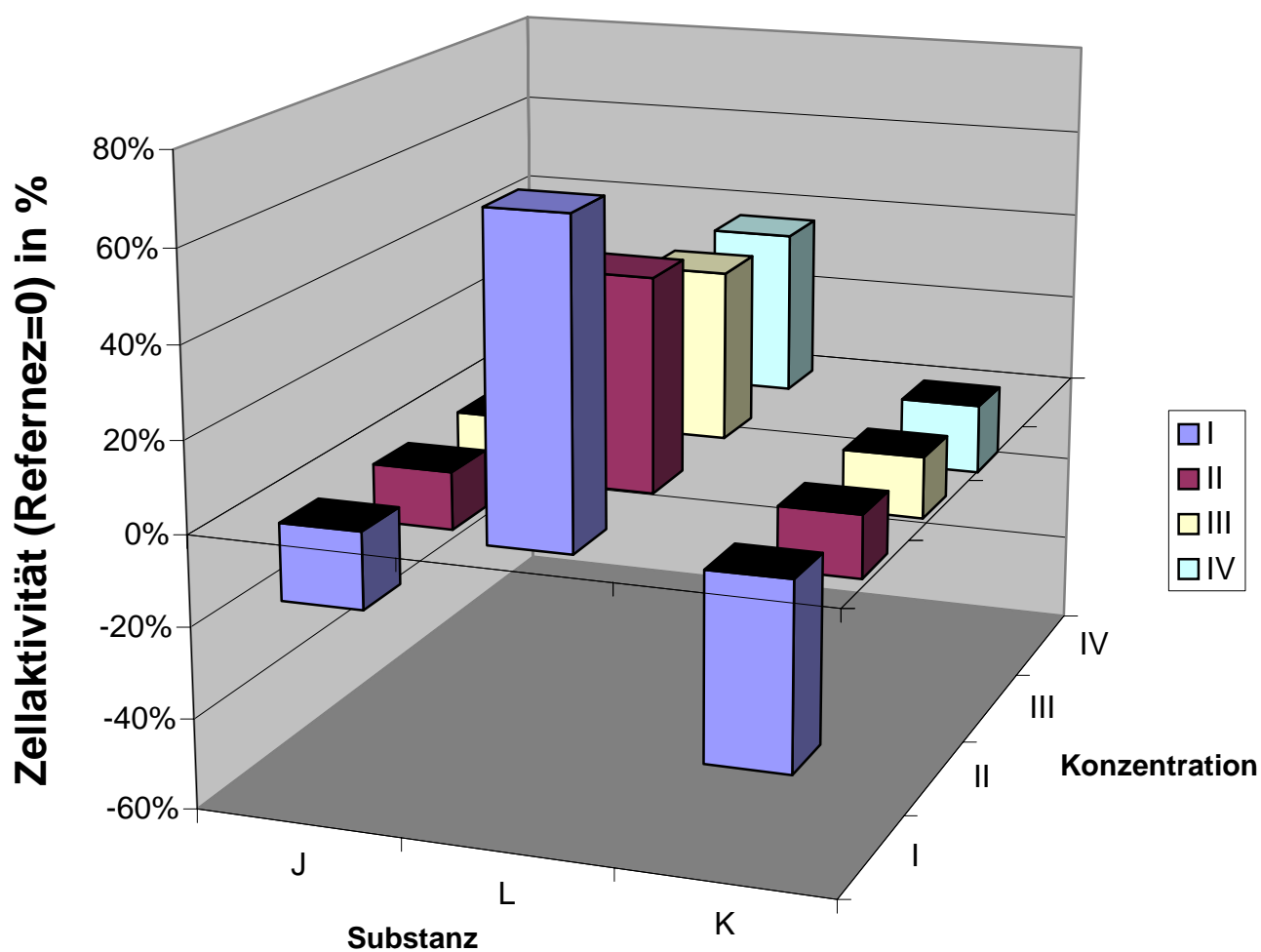


Abbildung 15: Vergleich PGE2-Rezeptor Antagonisten: ASS (J), Indomethacin (K) und Diclofenac (L) im MLC-II-Test (A+B) bei den verschiedenen Substanzkonzentrationen (I-IV). Die Messwerte sind prozentual zur Referenzmessung dargestellt.

J: ASS

L: Diclofenac

K: Indomethacin

I: Konzentration 1×10^{-5} M

II: Konzentration 1×10^{-9} M

III: Konzentration 1×10^{-12} M

IV: Konzentration 1×10^{-15} M

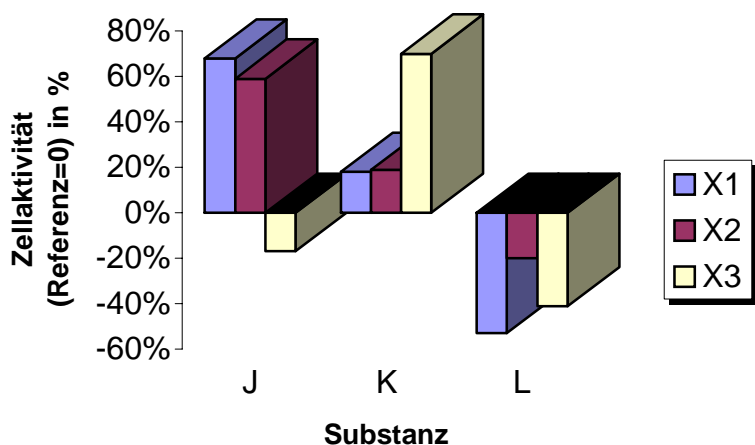


Abbildung 16a: 1×10^{-5} M

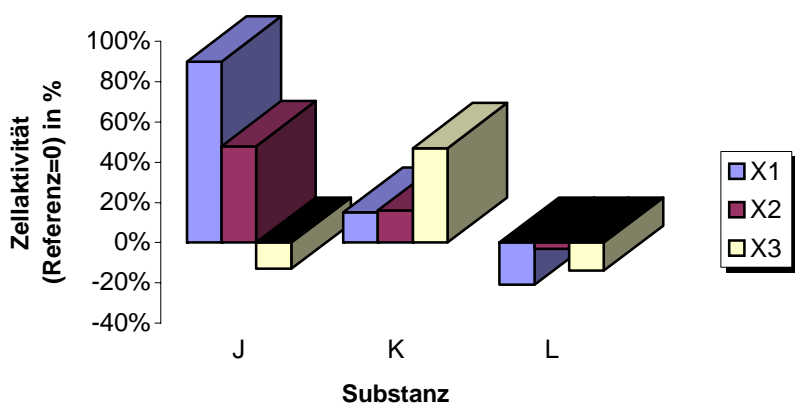


Abbildung 16b: 1×10^{-9} M

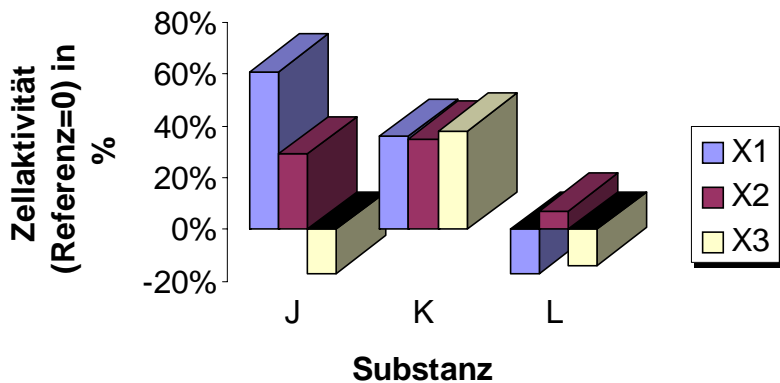


Abbildung 16c: 1×10^{-12} M

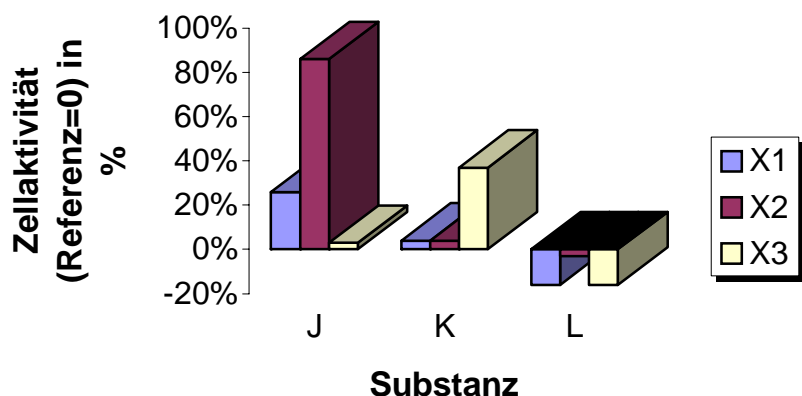
Abbildung 16d: 1×10^{-15} M

Abbildung 16 a-d: Einfluss verschiedener PGE2-Rezeptor Antagonisten ASS(J), Indomethacin(K) und Diclofenac(L) auf die allogene Stimulierbarkeit (MLC-II-Test) von PBMCs. In den Diagrammen a-d wird dieser Einfluss für jede der vier Substanzkonzentrationen (1×10^{-5} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-12} M und 1×10^{-15} M) einzeln dargestellt. Die Messwerte sind prozentual zur Referenzmessung dargestellt.

J : ASS

X1: Referenz 1 Individuum A (2×10^6 Zellen/ml)

K: Indomethacin

X2: Referenz 2 Individuum B (2×10^6 Zellen/ml)

L : Diclofenac

X3: MLC-II-Test (Zellen A+ Zellen B, jeweils 1×10^6 Zellen/ml)

3.6.5 Sulpirid und Cyproheptadin (Serotonin/5HT-Rezeptorantagonisten)

Cyproheptadin wirkt aktivierend auf mononukleäre Zellen, Sulpirid dagegen sowohl aktivierend, als auch suppressiv.

Abbildung 17a stellt den Einfluss des Pharmakons Sulpirid auf mononukleäre Zellen dar: Auf die ruhenden Zellen der Person B wirkt die Substanz mit Ausnahme der Konzentration 1×10^{-9} M proliferationsfördernd. Bei dem anderen, mit der Testperson A mit ruhenden Zellen durchgeführten Test, wirkt Sulpirid sowohl aktivierend (1×10^{-5} M und 1×10^{-15} M), als auch suppressierend (1×10^{-9} M und 1×10^{-12} M). Im MLC-II-Test hat das Medikament dagegen mit Ausnahme der Substanzkonzentration 1×10^{-12} M einen erkennbaren proliferativen Effekt.

Abbildung 17b bildet die Substanz Sulpirid bei den Zellmengen 2×10^6 Zellen/ml und 4×10^6 Zellen/ml ab. Wirkt das Medikament bei der geringeren Zellmenge sowohl proliferativ als auch suppressiv, so hat es bei einer Zellzahl von 4×10^6 Zellen/ml eine eher suppressierende Wirkung. Eine Ausnahme ist bei einer Substanzkonzentration von 1×10^{-9} M zu erkennen. In dieser Konzentration ist ein schwach stimulierender Einfluss nachweisbar.

Abbildung 18a demonstriert die weitgehende Aktivitätssteigerung mononukleärer Zellen durch die Substanz Cyproheptadin: Auf ruhende Zellen beider Individuen (A und B) ist ein deutlicher proliferativer Effekt von Cyproheptadin zu erkennen. Dieser Effekt ist abhängig von der Substanzkonzentration. Die stärkste Aktivitätssteigerung ist bei der Konzentration von 1×10^{-5} M zu beobachten. Im MLC-II-Test fällt dagegen bei der Konzentration 1×10^{-5} M eine schwache Suppression auf. Ansonsten wirkt die Substanz stärker, je höher die Konzentration von Cyproheptadin ist. Die höchste Aktivität der Zellen in Anwesenheit von Cyproheptadin ist bei der Konzentration 1×10^{-9} M erkennbar.

Abbildung 18b stellt den Einfluss von Cyproheptadin auf unterschiedliche Zellmengen (2×10^6 Zellen/ml und 4×10^6 Zellen/ml) dar: Bei doppelter Zellzahl ist ein ähnlicher Effekt wie im MLC-II-Test des vorangehenden Diagramms (Abb. 18a) beobachtbar. Cyproheptadin wirkt in den Konzentrationen 1×10^{-9} M bis 1×10^{-15} M mit abnehmender Intensität proliferationssteigernd. Lediglich die Konzentration 1×10^{-5} M wirkt schwach suppressiv.

Abbildung 19 vergleicht die Beeinflussung mononukleäre Zellen durch die Serotonin/5HT-Rezeptorantagonisten Sulpirid und Cyproheptadin: Die überwiegend proliferationsfördernde Wirkung beider Substanzen geht aus dem Diagramm deutlich hervor. Die Ausnahme liegt nur bei der Konzentration 1×10^{-12} M (Sulpirid) und 1×10^{-5} M (Cyproheptadin) vor. Zusätzlich lässt sich eine stärkere Aktivierung der Zellen durch Sulpirid nachweisen. Hier wirkt das Medikament bei der Konzentration 1×10^{-5} M (13 %) am stärksten aktivierend. Cyproheptadin hingegen in einer Konzentration von 1×10^{-9} M (8%).

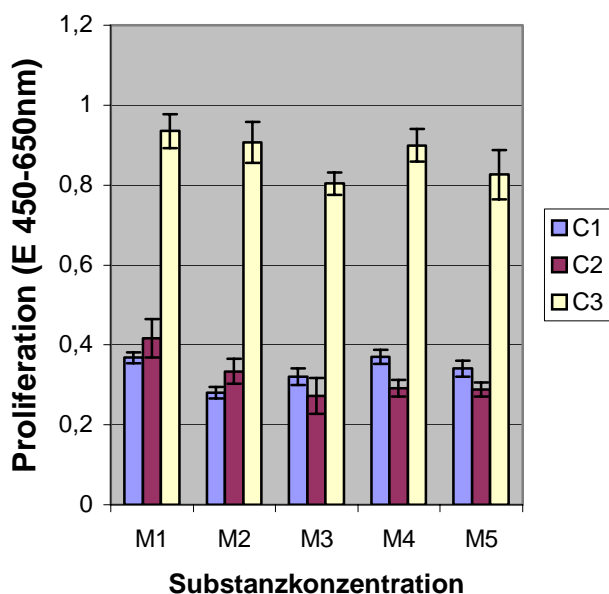


Abbildung 17a: Vergleich der Beeinflussbarkeit von ruhenden (C1 und C2) und allogen-stimulierten (C3) PBMCs durch die Testsubstanz Sulpirid (M), gemessen bei verschiedenen Konzentrationen (M1-M4). Jeweils ist eine Referenzmessung ohne Testsubstanz (M5) mit aufgeführt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

C1: ruhende Zellen des Individuums A (2×10^6 Zellen/ml)

C2: ruhende Zellen des Individuums B (2×10^6 Zellen/ml)

C3: MLC-II-Test (A+B jeweils 1×10^6 Zellen/ml)

M1: Sulpirid 1×10^{-5} M

M2: Sulpirid 1×10^{-9} M

M3: Sulpirid 1×10^{-12} M

M4: Sulpirid 1×10^{-15} M

D5: Referenzmessung ohne Testsubstanz

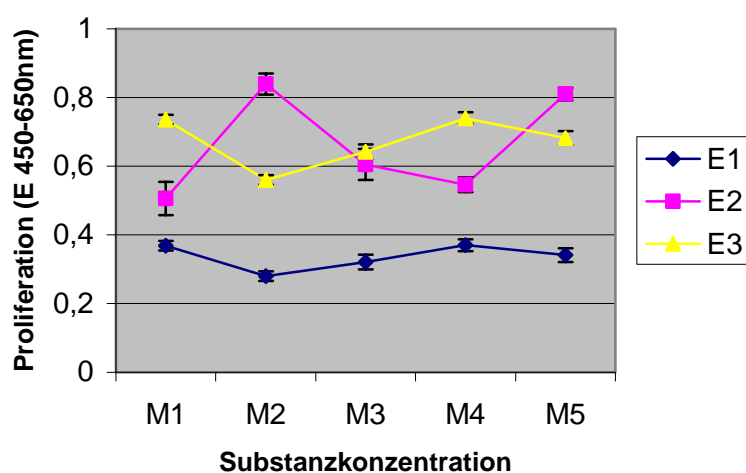


Abbildung 17b: Einfluss von unterschiedlichen Zellkonzentrationen (E1 und E2) auf die PBMC-Aktivität in Anwesenheit der Testsubstanz Sulpirid (M) in verschiedenen Konzentrationen (M1-M4). M5 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Testsubstanz. E3 ist fiktiv die doppelte Zellzahl von E1, dass heißt der Messwert bei der Konzentration von E1 wird mit dem Faktor 2 multipliziert und im Vergleich zum tatsächlichen Messwert bei doppelter Zellzahl (E2) dargestellt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

E1: ruhende Zellen des Individuums A in einer $c = 2 \times 10^6$ Zellen/ml

E2: ruhende Zellen des Individuums A in einer $c = 4 \times 10^6$ Zellen/ml

E3: Messwert von E1 multipliziert mit Faktor 2

M1: Sulpirid 1×10^{-5} M

M2: Sulpirid 1×10^{-9} M

M3: Sulpirid 1×10^{-12} M

M4: Sulpirid 1×10^{-15} M

D5: Referenzmessung ohne Testsubstanz

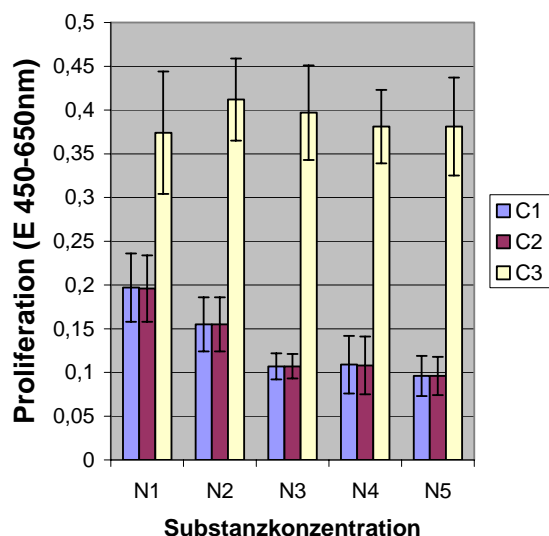


Abbildung 18a: Vergleich der Beeinflussbarkeit von ruhenden (C1 und C2) und allo-gen-stimulierten (C3) PBMCs durch die Testsubstanz Cyproheptadin (N), gemessen bei verschiedenen Konzentrationen (N1-N4). Jeweils ist eine Referenzmessung ohne Testsubstanz (N5) mit aufgeführt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

C1: ruhende Zellen des Individuums A (2×10^6 Zellen/ml)

C2: ruhende Zellen des Individuums B (2×10^6 Zellen/ml)

C3: MLC-II-Test (A+B jeweils 1×10^6 Zellen/ml)

N1: Cyproheptadin 1×10^{-5} M

N2: Cyproheptadin 1×10^{-9} M

N3: Cyproheptadin 1×10^{-12} M

N4: Cyproheptadin 1×10^{-15} M

N5: Referenzmessung ohne Testsubstanz

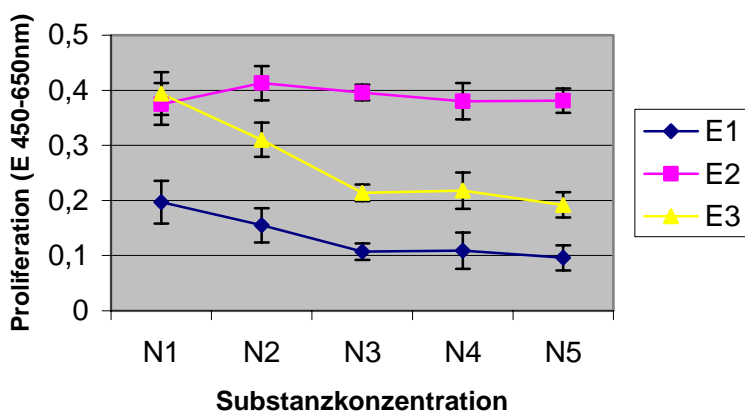


Abbildung 18b: Einfluss von unterschiedlichen Zellkonzentrationen (E1 und E2) auf die PBMC-Aktivität in Anwesenheit der Testsubstanz Cyproheptadin (N) in verschiedenen Konzentrationen (N1-N4). N5 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Testsubstanz. E3 ist fiktiv die doppelte Zellzahl von E1, dass heißt der Messwert bei der Konzentration von E1 wird mit dem Faktor 2 multipliziert und im Vergleich zum tatsächlichen Messwert bei doppelter Zellzahl (E2) dargestellt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

E1: ruhende Zellen des Individuums A in einer $c = 2 \times 10^6$ Zellen/ml

E2: ruhende Zellen des Individuums A in einer $c= 4 \times 10^6$ Zellen/ml

E3: Messwert von E1 multipliziert mit Faktor 2

N1: Cyproheptadin 1×10^{-5} M

N2: Cyproheptadin 1×10^{-9} M

N3: Cyproheptadin 1×10^{-12} M

N4: Cyproheptadin 1×10^{-15} M

N5: Referenzmessung ohne Testsubstanz

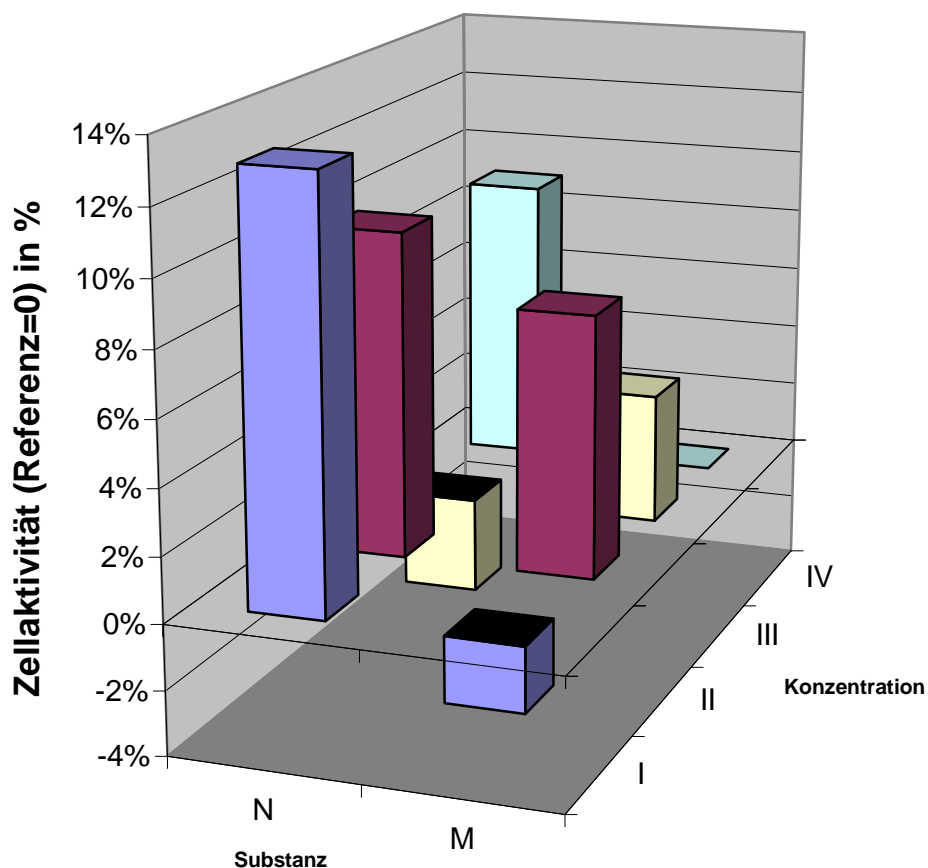


Abbildung 19: Vergleich Serotonin/5HT-Rezeptorantagonisten Cyproheptadin (N) und Sulpirid (M) im MLC-II-Test (A+B) bei den verschiedenen Substanzkonzentrationen O1-O4. Die Messwerte sind prozentual zur Referenzmessung dargestellt.

N: Cyproheptadin

M: Sulpirid

I: Konzentration 1×10^{-5} M

II: Konzentration 1×10^{-9} M

III: Konzentration 1×10^{-12} M

IV: Konzentration 1×10^{-15} M

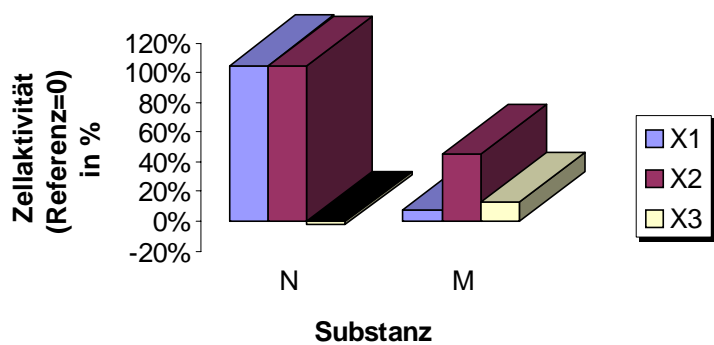


Abbildung 20a: 1×10^{-5} M

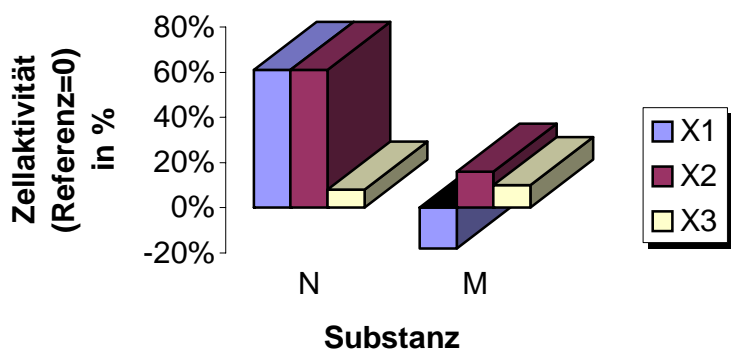


Abbildung 20b: 1×10^{-9} M

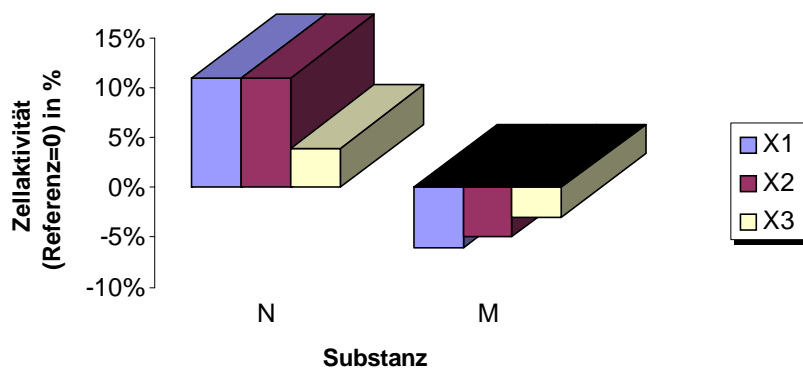


Abbildung 20c: 1×10^{-12} M

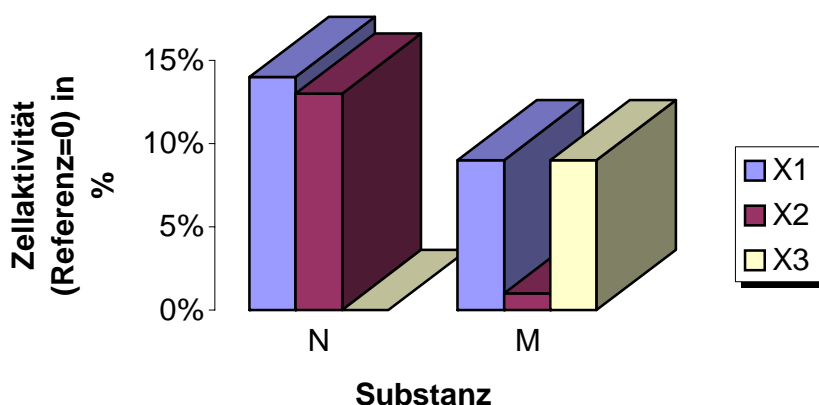
Abbildung 20d: 1x10⁻¹⁵ M

Abbildung 20a-d: Einfluss verschiedener Serotonin/5HT-Rezeptorantagonisten Cyproheptadin (N) und Sulpirid (M) auf die allogene Stimulierbarkeit von PBMCs. In den Diagrammen a-d wird dieser Einfluss für jede der vier Substanzkonzentrationen (1x10⁻⁵ M, 1x10⁻⁹ M, 1x10⁻¹² M und 1x10⁻¹⁵ M) einzeln dargestellt. Die Messwerte sind prozentual zur Referenzmessung dargestellt.

N :Cyproheptadin

X1: Referenz 1 Individuum A (2x10⁶ Zellen/ml)

M : Sulpirid

X2: Referenz 2 Individuum B (2x10⁶ Zellen/ml)

X3: MLC-II-Test (Zellen A+ Zellen B, jeweils 1x10⁶ Zellen/ml)

3.6.6 SKF-83566 (Dopamin-Rezeptorantagonist)

SKF-83566 wirkt sowohl aktivierend als auch suppressiv

Abbildung 21a zeigt den Einfluss des Dopaminrezeptorantagonisten SKF 83566 auf periphere mononukleäre Zellen des Blutes: In den ersten beiden Experimenten mit den Zellen der Individuen A und B zeigt sich, mit Ausnahme der Konzentration 1x10⁻¹⁵ M, eine Aktivierung. Dabei ist bei diesen ruhenden Zellen der Testpersonen A und B die stärkste Aktivitätssteigerung bei der Substanzkonzentration 1x10⁻¹² M auffällig. In der gemischten Lymphozytenkultur (MLC-II-Test) werden die Zellen, außer in der Konzentration 1x10⁻⁵ M, aktiviert. Auch hier kann bei der Konzentration 1x10⁻⁵ M eine stärkere Stimulation der Zellen gezeigt werden.

Abbildung 21b stellt die Wirkung der Substanz SKF 83566 auf zwei verschiedene Zellzahlen (2x10⁶ Zellen/ml und 4x10⁶ Zellen/ml) gegenüber: Bei Verdopplung der Zellzahl erkennt man einen annähernd identischen Trend, wie in dem in Abb. 21a dargestellten MLC-Test. Die stärkste proliferative Wirkung besitzt SKF 83566 in einer Konzentration von 1x10⁻¹² M. Auf eine Zellmenge von 4x10⁶ Zellen/ml wirkt SKF 83566 bei 1x10⁻⁵ M deutlich suppressiv.

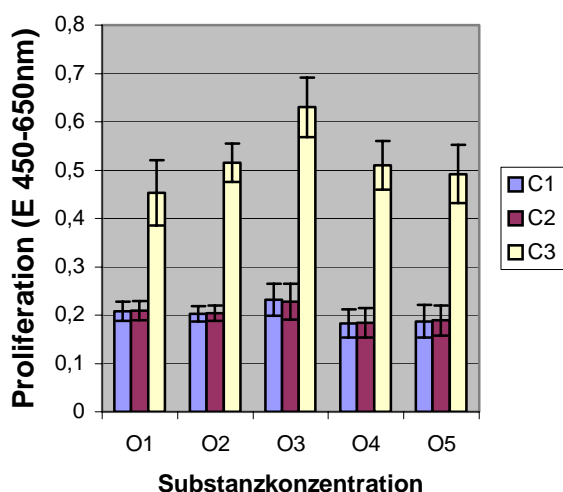


Abbildung 21a: Vergleich der Beeinflussbarkeit von ruhenden (C1 und C2) und allogenen-stimulierten (C3) PBMCs durch die Testsubstanz SKF 83566 (O), gemessen bei verschiedenen Konzentrationen (O1-O4). Jeweils ist eine Referenzmessung ohne Testsubstanz (O5) mit aufgeführt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

C1: ruhende Zellen des Individuums A (2×10^6 Zellen/ml)

C2: ruhende Zellen des Individuums B (2×10^6 Zellen/ml)

C3: MLC-II-Test (A+B jeweils 1×10^6 Zellen/ml)

O1: SKF 83566 1×10^{-5} M

O2: SKF 83566 1×10^{-9} M

O3: SKF 83566 1×10^{-12} M

O4: SKF 83566 1×10^{-15} M

O5: Referenzmessung ohne Testsubstanz:

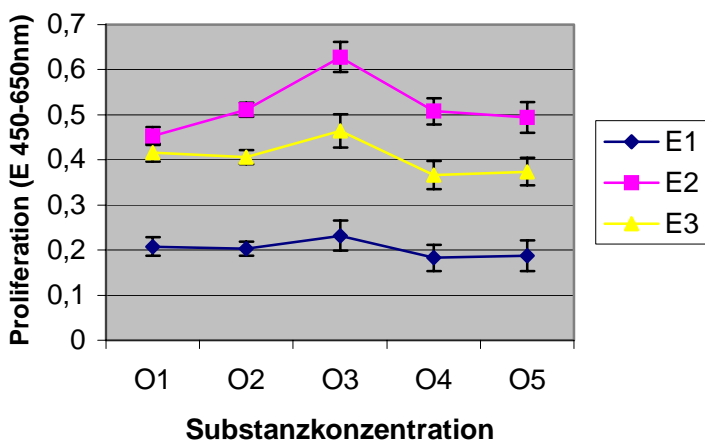


Abbildung 21b: Einfluss von unterschiedlichen Zellkonzentrationen (E1 und E2) auf die PBMC-Aktivität in Anwesenheit der Testsubstanz SKF 83566 (O) in verschiedenen Konzentrationen (O1-O4). O5 ist die jeweilige Referenzmessung ohne Testsubstanz. E3 ist fiktiv die doppelte Zellzahl von E1, dass heißt der Messwert bei der Konzentration von E1 wird mit dem Faktor 2 multipliziert und im Vergleich zum tatsächlichen Messwert bei doppelter Zellzahl (E2) dargestellt. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

E1: ruhende Zellen des Individuums A in einer $c= 2 \times 10^6$ Zellen/ml

E2: ruhende Zellen des Individuums A in einer $c= 4 \times 10^6$ Zellen/ml

E3: Messwert von E1 multipliziert mit Faktor 2

O1: SKF 83566 1×10^{-5} M

O2: SKF 83566 1×10^{-9} M

O3: SKF 83566 1×10^{-12} M

O4: SKF 83566 1×10^{-15} M

O5: Referenzmessung ohne Testsubstanz

3.7 Testung von Immunmodulatoren

Verschiedene potentiell immunstimulierende Substanzen werden nun in die unter 3.1 beschriebenen Testsysteme (48-Stunden-Test, PHA-Proliferationstest und MLC-I-Test) eingesetzt und untersucht.

3.7.1 Aminosäuren L-Arginin und D-/L-Cystein

Abbildung 22a lässt eine schwache suppressive Wirkung auf die mit L-Arginin inkubierten Zellen erkennen. Diese Tendenz lässt sich sowohl bei ruhenden Zellen (48-Stunden-Test), bei mitogen durch PHA stimulierten Zellen (PHA-Proliferationstest), als auch bei allogenen stimulierten Zellen (MLC-I-Test) nachweisen. Ein eindeutiger Trend bezüglich der Substanzkonzentration ist in diesen Tests nicht zu erkennen.

Abbildung 23a zeigt eine schwache aktivierende Wirkung auf die mit der Aminosäure D-/L-Cystein inkubierten mononukleären Zellen. Dieser Trend ist in allen drei Testansätzen zu sehen. Lediglich die mitogene Stimulation der Zellen durch PHA lässt bei einer Substanzkonzentration von 1×10^{-9} M eine leichte Suppression erkennen. Zusätzlich wird eine stärkere Aktivierung der Zellen durch die höhere Konzentration von D-/L-Cystein (1×10^{-5} M) deutlich.

Abbildung 24 stellt die beiden zuvor einzeln untersuchten Aminosäuren, L-Arginin und D-/L-Cystein gegenüber. Die Darstellung erfolgt hier nicht in absoluten Werten, sondern prozentual auf die jeweilige Referenz bezogen.

In allen Tests erwies sich D-/L-Cystein deutlich als aktivitätssteigernd. Die Steigerung ist bei der Konzentration 1×10^{-5} M, mit 10 % beim 48 Stunden-Test und sogar 23% beim MLC-I-Test, deutlich zu erkennen. L-Arginin besitzt dagegen eine schwach suppressive Wirkung, die bei der allogenen Stimulation, mit -23% (1×10^{-5} M) und 15% (1×10^{-9} M), am deutlichsten wird. Im Übrigen sind keinerlei Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Substanzkonzentrationen der Aminosäure L-Arginin auszumachen.

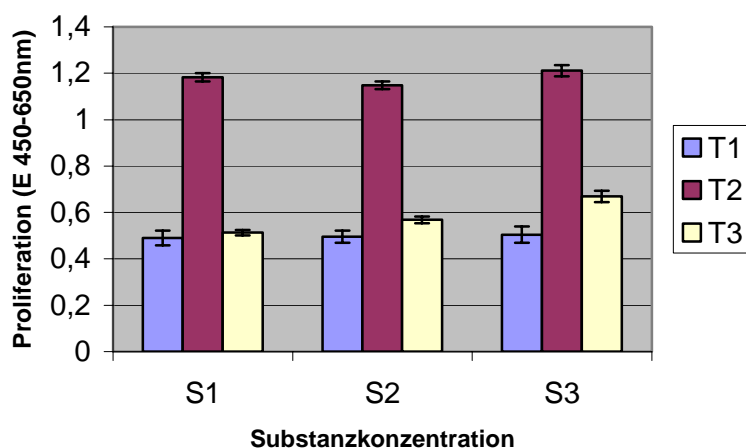


Abbildung 22a: Proliferation peripherer Lymphozyten ohne Stimulation (T1), nach mitogener Stimulation (T2) und nach allogener Stimulation (T3) in Anwesenheit der Testsubstanz L-Arginin (S) in zwei verschiedenen Substanzkonzentrationen (S1 und S2), sowie eine Referenzmessung ohne Substanz (S3). Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

T1: 48-Stunden-Test

S1: L-Arginin 1×10^{-5} M

T2: PHA-Proliferationstest

S2: L-Arginin 1×10^{-9} M

T3: MLC-I-Test (A+Bx)

S3: Referenzmessung ohne Testsubstanz

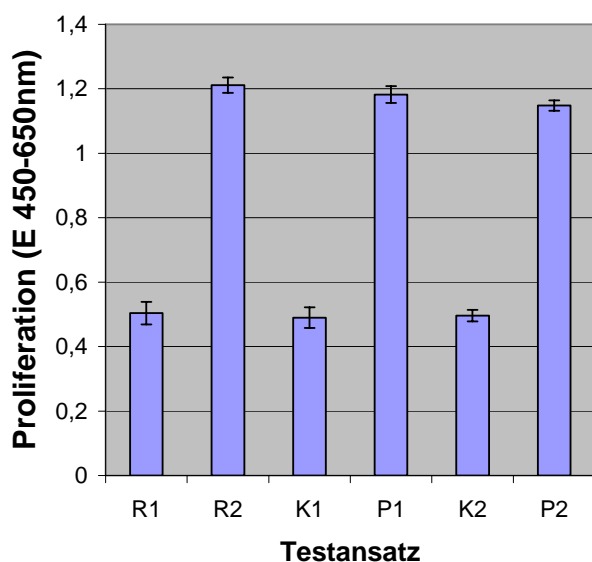


Abbildung 22b: Einfluss des Lektins PHA auf PBMCs in Anwesenheit der Substanz L-Arginin bei den Konzentrationen (1×10^{-5} M und 1×10^{-9} M). In diesem Diagramm werden zwei Referenzmessungen dargestellt: ohne Substanz und ohne PHA (R1), und mit PHA aber ohne Substanz (R2). Es handelt sich um die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

R1: Referenz ohne Testsubstanz und ohne PHA

R2: Referenz ohne Testsubstanz aber mit PHA

K1: L-Arginin 1×10^{-5} M ohne PHA

K2: L-Arginin 1×10^{-9} M ohne PHA

P1: L-Arginin 1×10^{-5} M mit PHA

P2: L-Arginin 1×10^{-9} M mit PHA

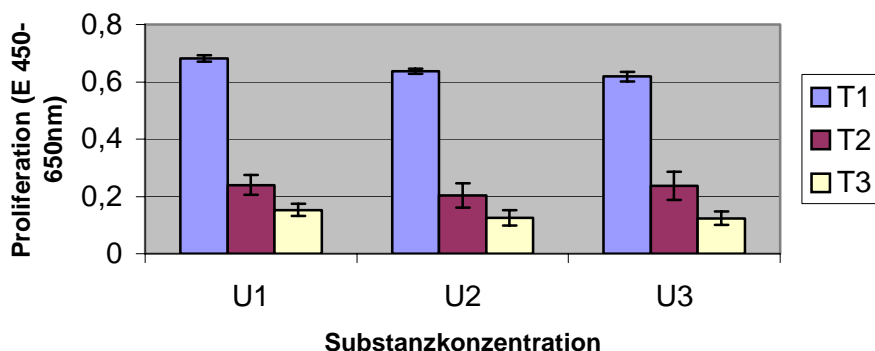


Abbildung 23a: Proliferation peripherer Lymphozyten ohne Stimulation (T1), nach mitogener Stimulation (T2) und nach allogener Stimulation (T3) in Anwesenheit der Testsubstanz D-/L-Cystein (U) in zwei verschiedenen Substanzkonzentrationen (U1 und U2), sowie eine Referenzmessung ohne Substanz (U3). Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

T1: 48-Stunden-Test

U1: D-/L-Cystein 1×10^{-5} M

T2: PHA-Proliferationstest

U2: D-/L-Cystein 1×10^{-9} M

T3: MLC-I-Test (A+Bx)

U3: Referenzmessung ohne Testsubstanz

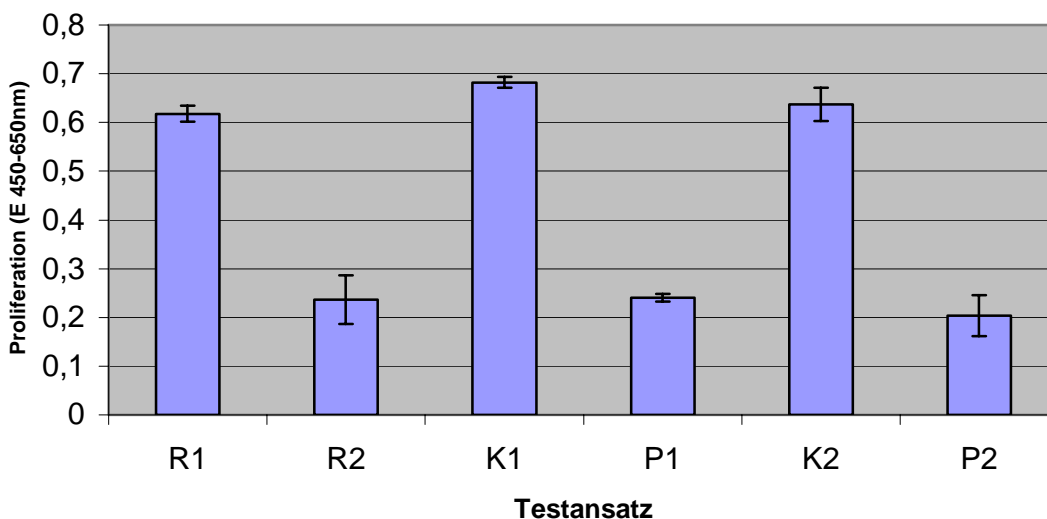


Abbildung 23b: Einfluss des Lektins PHA auf PBMCs in Anwesenheit der Substanz D-/L-Cystein bei den Konzentrationen (1×10^{-5} M und 1×10^{-9} M). In diesem Diagramm werden zwei Referenzmessungen dargestellt: ohne Substanz und ohne PHA (R1), und mit PHA aber ohne Substanz (R2). Es handelt sich um die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

R1: Referenz ohne Testsubstanz und ohne PHA

R2: Referenz ohne Testsubstanz aber mit PHA

K1: D-/L-Cystein 1×10^{-5} M ohne PHA

K2: D-/L-Cystein 1×10^{-9} M ohne PHA

P1: D-/L-Cystein 1×10^{-5} M mit PHA

P2: D-/L-Cystein 1×10^{-9} M mit PHA

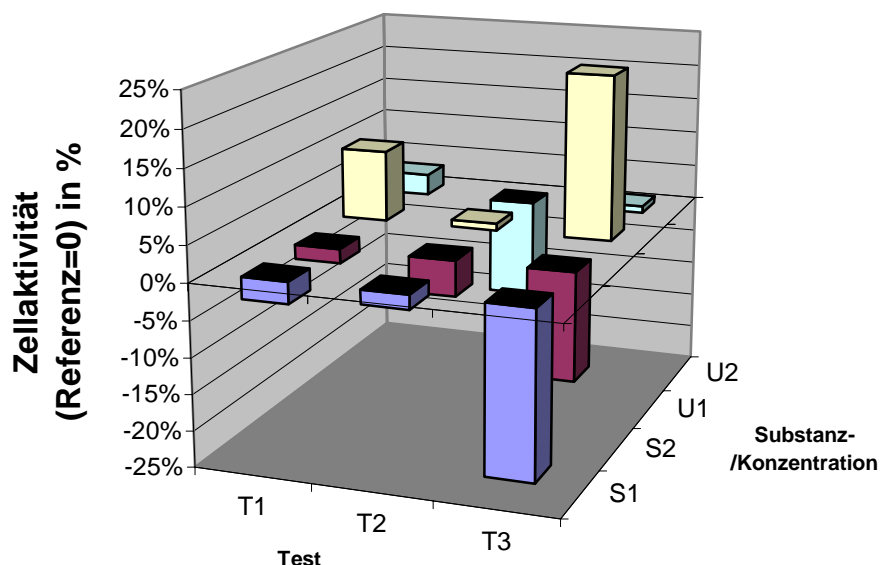


Abbildung 24: Vergleich des Einflusses von L-Arginin (S) und D-/L-Cystein (U) auf die Aktivität unstimulierter (T1), mitogen-stimulierter (T2) und auf allogenen-stimulierter (T3) PBMCs bei jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen (S1 und S2, sowie U1 und U2). Die Messwerte sind prozentual zur Referenzmessung dargestellt.

T1: 48 Stunden-Test

T2: PHA-Proliferationstest

T3: MLC-I-Test (A+Bx)

S1: L-Arginin 1×10^{-5} M

S2: L-Arginin 1×10^{-9} M

U1: D-/L-Cystein 1×10^{-5} M

U2: D-/L-Cystein 1×10^{-9} M

3.7.2 Das cAMP- System beeinflussende Substanzen Zaprinast und 8-Bromo-cGMP

Abbildung 25a demonstriert den aktivierenden Effekt auf periphere mononukleäre Zellen, die mit 8-Bromo-zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) inkubiert worden sind. Mit Ausnahme der allogenen Stimulation im MLC-I-Test lässt sich bei einer Konzentration von 1×10^{-5} M stets eine Proliferationssteigerung nachweisen.

Abbildung 26a hingegen veranschaulicht die immunsuppressive Fähigkeit der Substanz Zaprinast. Eine leichte Aktivierung ist lediglich bei ruhenden Zellen (48 Stunden-Test) bei einer Konzentration von 1×10^{-5} M zu beobachten. Eine Differenzierung der immunologischen Potenz der verwendeten Substanzkonzentrationen kann nicht vorgenommen werden.

Abbildung 27 vergleicht die Substanzen Zaprinast und 8-Bromo-cGMP. Diese beeinflussen das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP)-System.

Die Darstellung lässt eine deutlich immunsuppressive Wirkung der Substanz Zaprinast erkennen. Am deutlichsten wird dieser Trend beim Betrachten der allogenen Stimulation

(MLC-I-Test) mit der Konzentration 1×10^{-5} . Diese Suppression ist mit 18% eindrucksvoll erkennbar.

Die Substanz 8-Bromo-cGMP steigert die Proliferation der mononukleären Zellen. Dieser Trend ist bei den ruhenden Zellen am aussagekräftigsten nachzuweisen (24% beim 48 Stunden-Test bei einer Konzentration 1×10^{-5} M).

Ein Vergleich der unterschiedlichen Substanzkonzentrationen beider Substanzen lässt im Hinblick auf die Wirksamkeit keine nennenswerten Unterschiede erkennen.

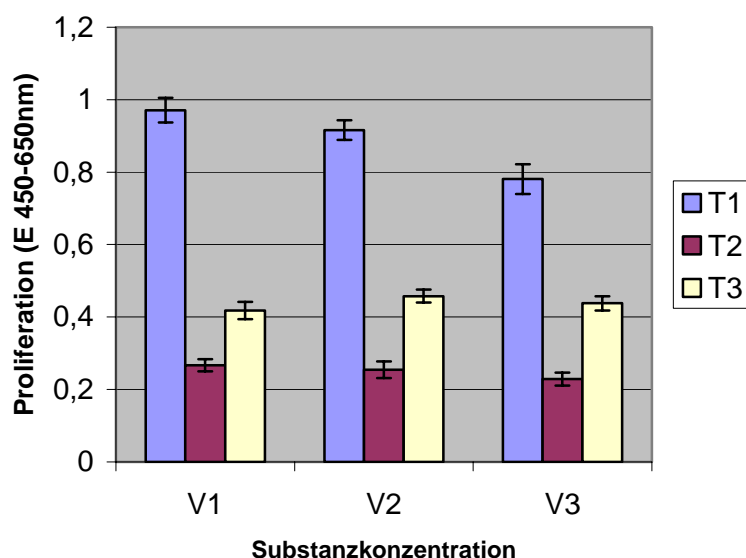


Abbildung 25a: Proliferation peripherer Lymphozyten ohne Stimulation (T1), nach mitogener Stimulation (T2) und nach allogener Stimulation (T3) in Anwesenheit der Testsubstanz 8-Bromo-cGMP (V) in zwei verschiedenen Substanzkonzentrationen (V1 und V2), sowie eine Referenzmessung ohne Substanz (V3). Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

T1: 48-Stunden-Test

T2: PHA-Proliferationstest

T3: MLC-I-Test (A+Bx)

V1: 8-Bromo-cGMP 1×10^{-5} M

V2: 8-Bromo-cGMP 1×10^{-9} M

V3: Referenzmessung ohne Testsubstanz

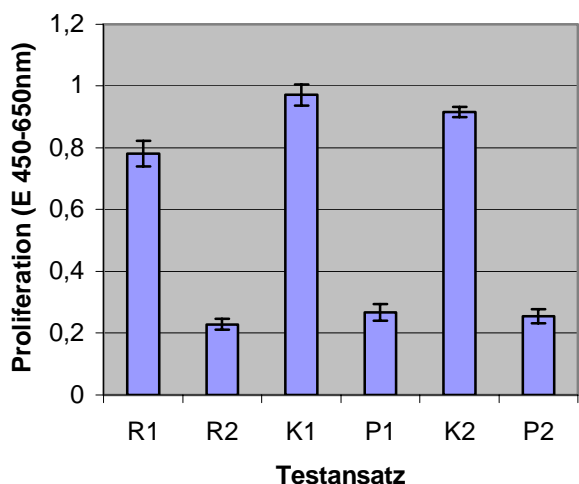


Abbildung 25b: Einfluss des Lektins PHA auf PBMCs in Anwesenheit der Substanz 8-Bromo-cGMP bei den Konzentrationen (1×10^{-5} M und 1×10^{-9} M). In diesem Diagramm werden zwei Referenzmessungen dargestellt: ohne Substanz und ohne PHA (R1), und mit PHA aber ohne Substanz (R2). Es handelt sich um die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

R1: Referenz ohne Testsubstanz und ohne PHA R2: Referenz ohne Testsubstanz aber mit PHA
 K1: 8-Bromo-cGMP 1×10^{-5} M ohne PHA K2: 8-Bromo-cGMP 1×10^{-9} M ohne PHA
 P1: 8-Bromo-cGMP 1×10^{-5} M mit PHA P2: 8-Bromo-cGMP 1×10^{-9} M mit PHA

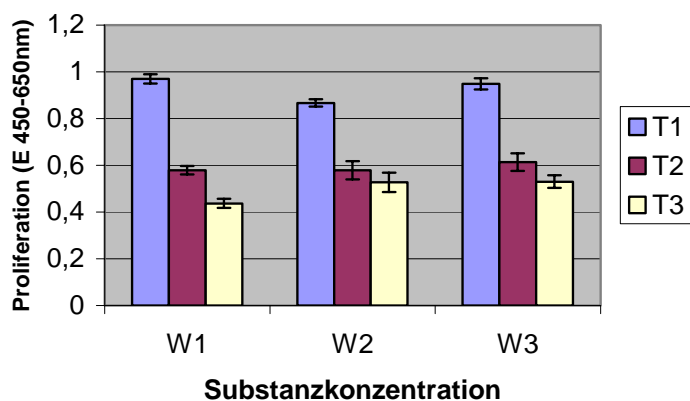


Abbildung 26a: Proliferation peripherer Lymphozyten ohne Stimulation (T1), nach mitogener Stimulation (T2) und nach allogener Stimulation (T3) in Anwesenheit der Testsubstanz Zaprinast (W) in zwei verschiedenen Substanzkonzentrationen (W1 und W2), sowie eine Referenzmessung ohne Substanz (W3). Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

T1: 48-Stunden-Test W1: Zaprinast 1×10^{-5} M
 T2: PHA-Proliferationstest W2: Zaprinast 1×10^{-9} M
 T3: MLC-I-Test (A+Bx) W3: Referenzmessung ohne Testsubstanz

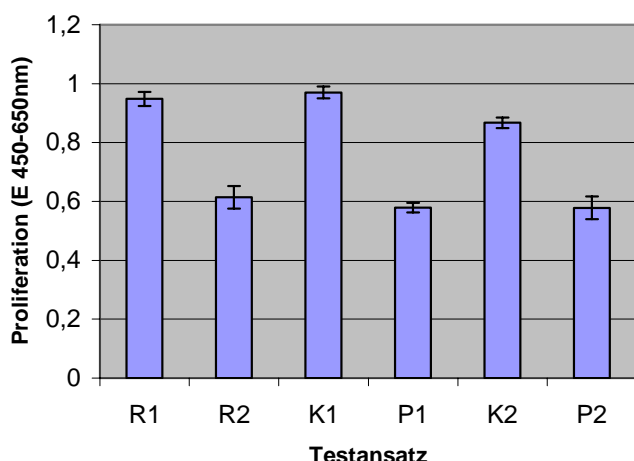


Abbildung 26b: Einfluss des Lektins PHA auf PBMCs in Anwesenheit der Substanz Zaprinast bei den Konzentrationen (1×10^{-5} M und 1×10^{-9} M). In diesem Diagramm werden zwei Referenzmessungen dargestellt: ohne Substanz und ohne PHA (R1), und mit PHA aber ohne Substanz (R2). Es handelt sich um die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

R1: Referenz ohne Testsubstanz und ohne PHA R2: Referenz ohne Testsubstanz aber mit PHA
 K1: Zaprinast 1×10^{-5} M ohne PHA K2: Zaprinast 1×10^{-9} M ohne PHA
 P1: Zaprinast 1×10^{-5} M mit PHA P2: Zaprinast 1×10^{-9} M mit PHA

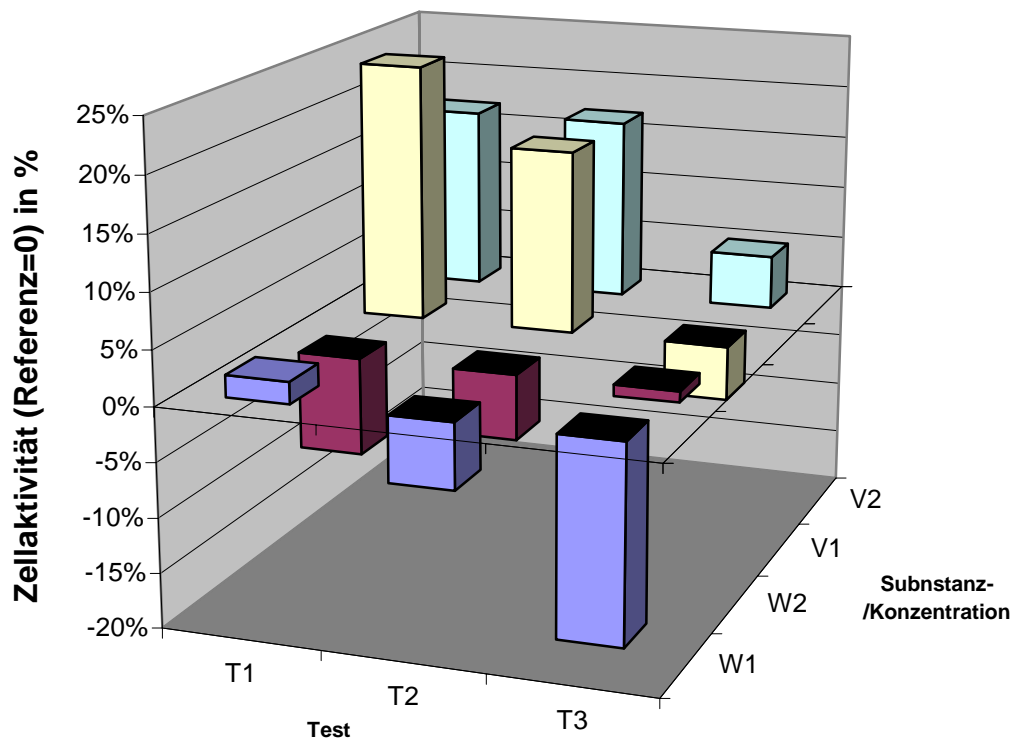


Abbildung 27: Vergleich des Einflusses der Testsubstanzen Zaprinast und 8-Bromo-cGMP auf die Aktivität unstimulierter (T1), mitogen-stimulierter (T2) und auf allogene-stimulierter (T3) PBMCs bei jeweils zwei

verschiedenen Konzentrationen (V1 und V2, sowie W1 und W2). Die Messwerte sind prozentual zur Referenzmessung dargestellt.

T1: 48 Stunden-Test

T2: PHA-Proliferationstest

T3: MLC-I-Test (A+Bx)

W1: Zaprinast 1×10^{-5} M

W2: Zaprinast 1×10^{-9} M

V1: 8-Bromo-cGMP 1×10^{-5} M

V2: 8-Bromo-cGMP 1×10^{-9} M

3.7.3 Das NO/ ROI- System beeinflussende Substanzen L-Canavanine und DiethylamineNONOate

Abbildung 28a stellt die immunologische Wirksamkeit der Substanz L-Canavanine dar. Auf die ruhenden Zellen im 48 Stunden-Test hat die Substanz bei den verwendeten Konzentrationen eine proliferierende Wirkung, im PHA-Proliferationstest und im MLC-I-Test dagegen eine suppressive Wirkung.

Abbildung 29a demonstriert keinen eindeutigen Trend der Beeinflussung von mononukleären Zellen mit der Substanz DiethylamineNONOate. Die Substanz hat auf ruhenden Zellen eine schwach proliferierende Wirkung. Bei der mitogenen (PHA-Test) und der allogenen (MLC-I-Test) Stimulierung ist eine suppressive Wirkung auszumachen.

Die in Abbildung 30 dargestellten Substanzen L-Canavanine und DiethylamineNONOate sind Substanzen des NO/ROI-Systems. Das Diagramm zeigt keine einheitlichen Trends, das heißt keine der beiden Substanzen kann als allein immunstimulierend beziehungsweise immun-supprimierend bezeichnet werden. Trotzdem lässt sich eine stimulierende Wirkung beider Substanzen auf ruhende Zellen nachweisen. Diese Wirkung ist bei L-Canavanine mit 50% und 19% (1×10^{-5} M und 1×10^{-9} M) am eindrucksvollsten zu beobachten. Auch bei DiethylamineNONOate ist dies nachzuweisen, jedoch in geringerer Ausprägung (10% bei 1×10^{-5} M und 1% bei 1×10^{-9} M). Zusätzlich ist die aktivitätssteigernde Fähigkeit bei der Konzentration 1×10^{-5} M deutlich höher als bei 1×10^{-9} M (jeweils bezogen auf den 48 Stunden-Test).

In den weiteren Tests (PHA-Proliferationstest und MLC-I-Test) lässt sich eine deutliche Suppression erkennen. Ein eindeutiger Trend, bezüglich der Substanz oder den verwendeten Substanzkonzentrationen, lässt sich jedoch nicht ausmachen.

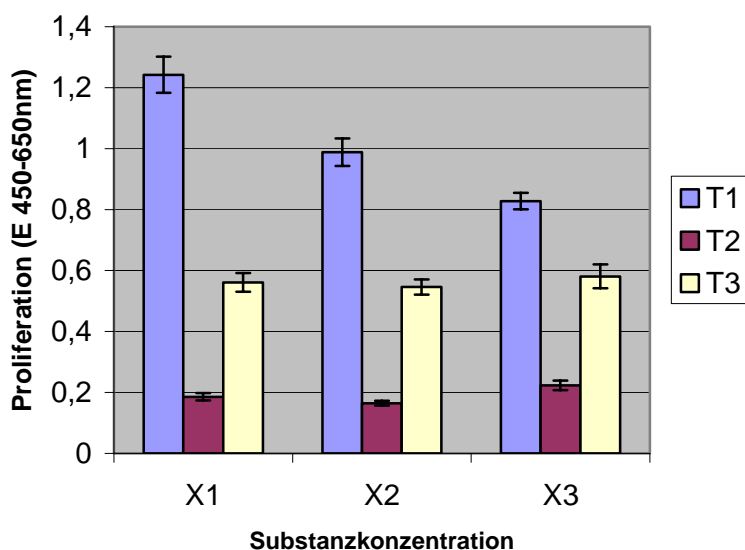


Abbildung 28a: Proliferation peripherer Lymphozyten ohne Stimulation (T1), nach mitogener Stimulation (T2) und nach allogener Stimulation (T3) in Anwesenheit der Testsubstanz L-Canavanine (X) in zwei verschiedenen Substanzkonzentrationen (X1 und X2), sowie eine Referenzmessung ohne Substanz (X3). Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

T1: 48-Stunden-Test

X1: L-Canavanine 1×10^{-5} M

T2: PHA-Proliferationstest

X2: L-Canavanine 1×10^{-9} M

T3: MLC-I-Test (A+Bx)

X3: Referenzmessung ohne Testsubstanz

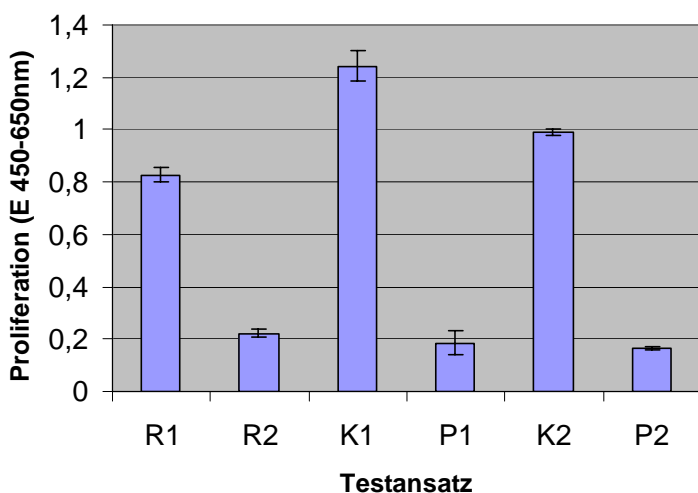


Abbildung 28b: Einfluss des Lektins PHA auf PBMCs in Anwesenheit der Substanz L-Canavanine bei den Konzentrationen (1×10^{-5} M und 1×10^{-9} M). In diesem Diagramm werden zwei Referenzmessungen dargestellt: ohne Substanz und ohne PHA (R1), und mit PHA aber ohne Substanz (R2). Es handelt sich um die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

R1: Referenz ohne Testsubstanz und ohne PHA

R2: Referenz ohne Testsubstanz aber mit PHA

K1: L-Canavanine 1×10^{-5} M ohne PHA

K2: L-Canavanine 1×10^{-9} M ohne PHA

P1: L-Canavanine 1×10^{-5} M mit PHA

P2: L-Canavanine 1×10^{-9} M mit PHA

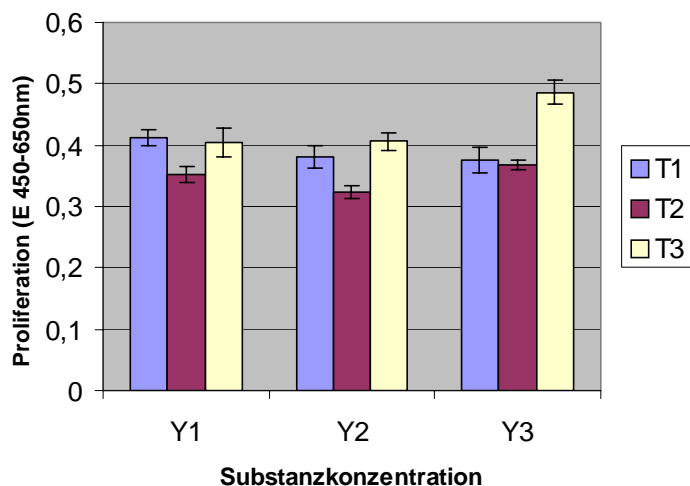


Abbildung 29a: Proliferation peripherer Lymphozyten ohne Stimulation (T1), nach mitogener Stimulation (T2) und nach allogener Stimulation (T3) in Anwesenheit der Testsubstanz DiethylamineNONOate (Y) in zwei verschiedenen Substanzkonzentrationen (Y1 und Y2), sowie eine Referenzmessung ohne Substanz (Y3). Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

T1: 48-Stunden-Test

Y1: DiethylamineNONOate 1×10^{-5} M

T2: PHA-Proliferationstest

Y2: DiethylamineNONOate 1×10^{-9} M

T3: MLC-I-Test (A+Bx)

Y3: Referenzmessung ohne Testsubstanz

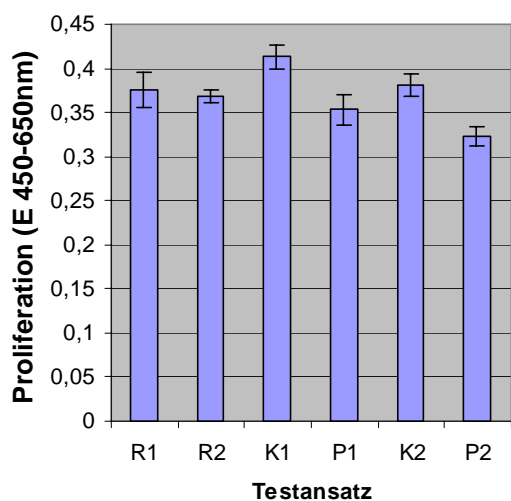


Abbildung 29b Einfluss des Lektins PHA auf PBMCs in Anwesenheit der Substanz DiethylamineNONOate bei den Konzentrationen (1×10^{-5} M und 1×10^{-9} M). In diesem Diagramm werden zwei Referenzmessungen dargestellt: ohne Substanz und ohne PHA (R1), und mit PHA aber ohne Substanz (R2). Es handelt sich um die Mittelwerte und die Standardabweichungen von jeweils sechs individuellen Proben.

R1: Referenz ohne Testsubstanz und ohne PHA **R2: Referenz ohne Testsubstanz aber mit PHA**
K1: DiethylamineNONOate 1×10^{-5} M ohne PHA **K2: DiethylamineNONOate 1×10^{-9} M ohne PHA**
P1: DiethylamineNONOate 1×10^{-5} M mit PHA **P2: DiethylamineNONOate 1×10^{-9} M mit PHA**

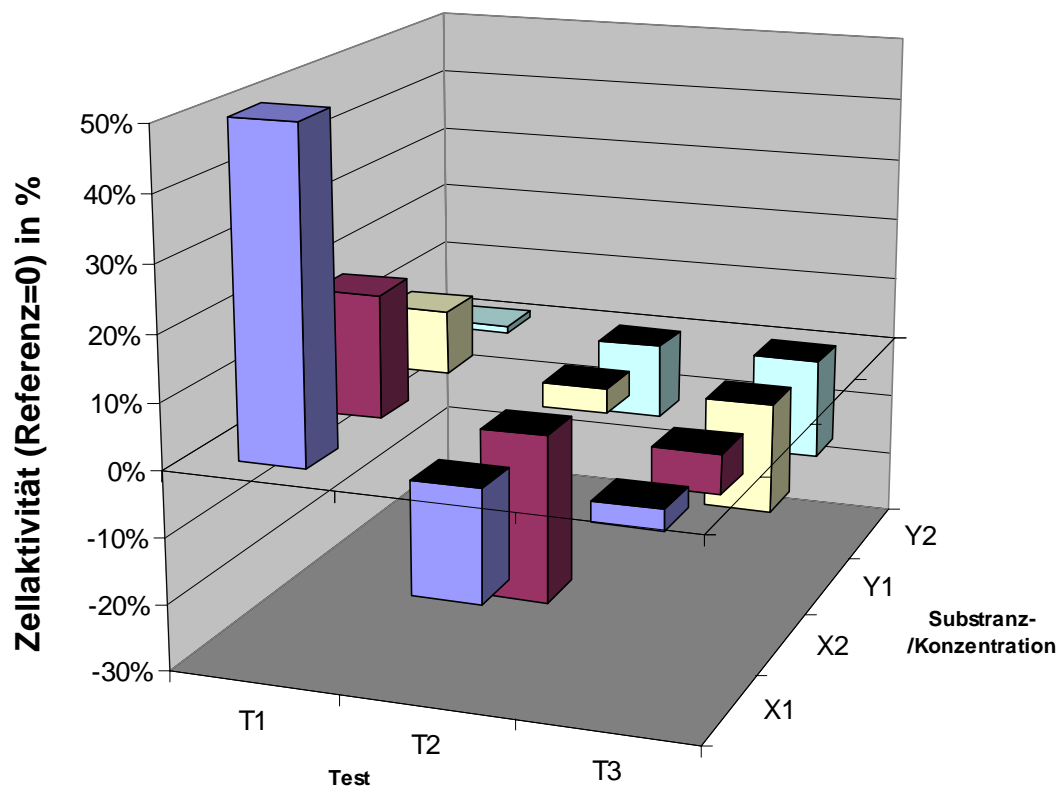


Abbildung 30: Vergleich des Einflusses der Testsubstanzen L-Canavanine und DiethylamineNONOate auf die Aktivität unstimulierter (T1), mitogen-stimulierter (T2) und auf allogen-stimulierter (T3) PBMCs bei jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen (X1 und X2, sowie Y1 und Y2). Die Messwerte sind prozentual zur Referenzmessung dargestellt.

T1: 48 Stunden-Test

T2: PHA-Proliferationstest

T3: MLC-I-Test (A+Bx)

X1: L-Canavanine 1×10^{-5} M

X2: L-Canavanine 1×10^{-9} M

Y1: DiethylamineNONOate 1×10^{-5} M

Y2: DiethylamineNONOate 1×10^{-9} M

4 Diskussion

4.1 Allgemeines

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung des Einflusses bestimmter Substanzen und Medikamente auf mononukleäre Zellen des peripheren Blutes.

Die verwendeten Methoden und die im Kapitel 3 dargestellten Eigenen Ergebnisse werden nun mit der gängigen Literatur verglichen.

4.2 Methoden und Testverfahren

Die abhängige Variable der durchgeführten Tests war die Proliferation auf die allogene (MLR) und die mitogene (Phytohämagglutinin) Stimulation.

Bei den hier beschriebenen Versuchen wurde auf die andersorts übliche radioaktive Behandlung der Zellen zur Inaktivierung verzichtet. Stattdessen wurden die Stimulatorzellen durch die Substanz Mitomycin inaktiviert.

Beobachtungseinheit waren mononukleäre Zellen des peripheren Blutes [Albrechtsen et al., 1978]. Diese Zellen repräsentieren in ausreichender Form das spezifische Immunsystem.

Die *Ficoll-Histopaque-Technik* ermöglicht die Isolation von rund 70 Prozent aller Lymphozyten des Vollblutes. Dabei bleiben die relativen Leukozytenunterklassen zum Grossteil erhalten und werden nur wenig durch Erythrozyten und Granulozyten verunreinigt [Mookerjee, 1976]. In der Literatur werden die Probleme im methodischen Alltag [Akiyoshi et al., 1987] mit verschiedenen Leukozytensubpopulationen und deren engen Interaktion oft diskutiert, um eine effektive Immunantwort zu erreichen [Ridge et al., 1998; Sanders, 1998]. Aus diesem Grund wurde bewusst darauf verzichtet mit solchen Subpopulationen zu arbeiten.

Die unabhängige, relevante Variable des Testsystems war die 48-stündige Inkubation der Regulatorzellen mit immunmodulierenden Substanzen und Medikamenten. Dabei wurde sowohl mit, als auch ohne mitogene Stimulierung der mononukleären Zellen gearbeitet. Zusätzlich wurden die Regulatorzellen entweder durch Mitomycin C inaktiviert, beziehungsweise wurde auf diese Inaktivierung der Regulatorzellen verzichtet.

Die häufig angewandte MLR ist ein *in vitro* Modell und stammt klassischerweise aus der Transplantationsimmunologie [Bach et al., 1973]. Sie dient in dieser Studie als Modell zur Beeinflussung eines Empfänger Immunsystems durch Spender-Vakzinezellen. Es wurde immer

gegen eine Referenzgruppe gemessen. Bei dieser handelte es sich um unbehandelte Zellen. Aus acht individuellen Proben wurden für jeden einzelnen Versuchsansatz die Mittelwerte bestimmt.

Die computergestützte Berechnung erfolgte durch die Software SigmaStat (Jandel Scientific). Die deskriptive, statistische Auswertung wurde mit dem Programm Microsoft Excel vorgenommen. Im Vergleich zu anderen Arbeiten wurde in dieser Studie auf eine hohe Zahl von individuellen Einzelmessungen Wert gelegt. Deshalb können diese Messungen aussagekräftig beurteilt werden [Jorgensen et al., 1974].

Es wurden Leukozyten verwendet, die nicht auf ihren HLA-Typ getestet wurden. Daher bestand grundsätzlich die Möglichkeit aller MHC-Kombinationen. In Vorversuchen derselben Laboreinheit zeigten sich keine statistisch signifikanten, interindividuellen Variabilitäten zufällig ausgesuchter Spender. Bei vergleichenden Versuchen wurden dagegen grundsätzlich Leukozyten identische Spender verwendet. Zusätzlich sind die technischen Variabilitäten im Vergleich zu den biologischen zu vernachlässigen [Thomsen et al., 1974].

4.3 Etablierung des Testsystems

In Vorversuchen wurde als geeignete Zeitdauer für die MLR neun Tage festgelegt. Dies entspricht der gängigen Versuchsdauer anderer Studien [Sato et al., 1999].

Die Inaktivierung der Regulatorzellen mit Mitomycin C wurde in allen Versuchen so vorgenommen, dass 80% der Zellen den ersten Tag überlebten. Dagegen sollte am neunten Tag keine der durch Mitomycin behandelten Zellen mehr am Leben sein. So konnte in Versuchen derselben Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Überlebensfähigkeit der peripheren mononukleären Zellen durch mitogene oder allogene Stimulation abnimmt.

Dagegen kann durch das Mitogen PHA und/oder durch eine Substanz mit bewiesener immunstimulierender Potenz, wie beispielsweise der H₂-Rezeptor Antagonist Cimetidin, die Proliferation mittels direkter Beeinflussung der Responderzellen signifikant gesteigert werden.

Immunsuppression wird durch eine Erhöhung der Zellkonzentration von mehr als eine Million Zellen pro Milliliter in einer gemischten Leukozytenreaktion erreicht und wird als *crowding* bezeichnet. Diese Form der Immunsuppression beruht weder auf einer Anhäufung suppressiver Zytokine oder toxischer Stoffwechselprodukte, noch auf einer Erschöpfung des Nährmediums. Die Ursache der Suppression ist eine Induktion von Suppressorzellen und eine Kontaktinhibition. Sie wurde bereits früh beschrieben, ist aber bis zum jetzigen Zeitpunkt nur wenig pa-

thophysiologisch erklärt [Aarden et al., 1980; Bois et al., 1974; Du Bois et al., 1973; Herva, 1977; Knight, 1982; Onsrud et al., 1980]. Experimente anderer Arbeiten unterstützen die These einer direkten Zell-Zell-Interaktion durch eine Kontaktinhibition. Diese Inhibition ist vom Typ der Immunabwehr (primär oder sekundär), aber auch von der Zusammensetzung der Lymphozytensubsets abhängig [Knight, 1982]. Aus diesem Grund wurde in den Versuchen der gemischten Leukozytenkultur eine Zellkonzentration, die nicht 1 Million Zellen pro Milliliter übersteigt, verwendet.

4.4 Wirkung der Substanzen

4.4.1 Rezeptorantagonisten

4.4.1.1 DMPX (Antagonist des purinergen Rezeptors)

DMPX ist ein A_2/P_2 -selektiver Rezeptorantagonist von Adenosin [RBI, 1996]. Adenosin dient in seiner Eigenschaft als Abbauprodukt von ATP, als Neurotransmitter. Es reguliert im Gehirn den Blutdruck. In der Niere besitzt Adenosin zusätzlich blutdruckregulatorische Fähigkeit.

Zu den purino₁-Rezeptoren (Adenosinrezeptoren) besitzt Adenosin die höchste Affinität. Die P_1 -Rezeptoren und auch ein Teil der P_2 -Rezeptoren sind an G-Proteine gekoppelt.

4.4.1.2 Atenolol, Metoprolol und Propranolol (beta-adrenozeptor Antagonisten)

Die verwendeten β -Rezeptorenantagonisten kommen, wie alle anderen Handelsüblichen, nicht in der Natur vor.

Propranolol ist der älteste und immer noch sehr häufig klinisch verwendete β -Blocker, der bereits 1964 in England eingeführt wurde [Forth et al., 1996]. Im Gegensatz zu den α -Antagonisten ähneln die β -Adrenozeptor-Antagonisten den Katecholaminen. Genauso wie bei den Agonisten macht ein großer Substituent am Stickstoff die Antagonisten so selektiv für die β -Rezeptoren, dass sie auf α -Adrenozeptoren praktisch keinen Einfluss haben.

Atenolol, Propranolol und Metoprolol ist die Ableitung vom Phenoxypropanolamin gemeinsam, was den Pharmaka eine hohe β -Affinität verleiht.

Eine Blockierung der β -Rezeptoren von Lymphozyten hat eine Steigerung der Proliferation auf unspezifische und spezifische Stimulation zur Folge. So kommt es bei Rezeptorblockade zur Stimulation der regulierten Proliferation. Dies hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass der T-Zellrezeptor der TH2-Zellen nicht mit dem IP_3 -Signaltransduktionsweg verbunden ist. Dabei

steigt in den TH2-Zellen nicht die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, dagegen ist in TH1-Zellen der Anteil von freiem intrazellulärem Ca^{2+} mit bis zu 500 % beträchtlich erhöht [Stam et al., 1993]. Die verschiedenen Lymphozytensubpopulationen werden auf unterschiedliche Weise beeinflusst. Dies hängt mit der differentiellen Rezeptordichte der beta-adrenergen Rezeptoren zusammen. NK und CD8(+) T-Lymphozyten besitzen die höchste Dichte an Rezeptoren, die bis zu dreifach höher ist als auf CD4(+) TH 1-Lymphozyten [Murray et al., 1992; Sanders 1998]. Zusätzlich besitzen TH2-Zellen so gut wie keine β -Rezeptoren [Stam et al., 1993] und besitzen eine hohen, intrazellulären cAMP-Spiegel [Novak et al., 1990], der mit einer hohen IL-4- und IL-5 Produktion einhergeht. Dies wird für die Vermittlung der humoralen Immunität verantwortlich gemacht [Ramer-Quinn et al. 1989; Sanders 1998].

Die zuvor schon angesprochene Ähnlichkeit der beta-adrenergen Rezeptoren zu den Katecholaminen ist wichtig zum Verständnis der Wirkung der β -Rezeptoren. Da Lymphozyten auch endogene Katecholamine bilden und sezernieren [Bergquist et al., 1994], liegt ein Gleichgewicht zwischen zellulärer, spezifischer und humoraler, unspezifischer Immunität in Abhängigkeit der unterschiedlichen Rezeptorexpression und der systemisch und lokalen Katecholaminfreisetzung vor.

Die Wirkung der untersuchten beta-Adrenozeptor Antagonisten (Atenolol, Metoprolol und Propranolol) auf Regulatorzellen werden in den eigenen Ergebnissen beschrieben. Demnach wird durch Blockade der β -Rezeptoren die Proliferation der T-Zellen in unterschiedlicher Ausprägung gefördert, was von der Expression der β_2 -adrenergen Rezeptoren auf CD 8 zytotoxischer Lymphozyten und CD4(+)-T-Lymphozyten abhängt. Wird durch β -Rezeptoren-Blocker die hemmende cAMP Wirkung blockiert, kommt es zur vermehrten Bildung von IL-2. Diese Proliferationsförderung durch Propranolol besitzt im Mausmodell Relevanz. Hier wird die melphalaninduzierte Tumorabstoßung durch Deblockierung der tumorspezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten gefördert [Kalinichenko et al., 1999].

4.4.1.3 H₂-Rezeptor-, Serotonin/5HT-Rezeptor-, D₂-Rezeptorantagonisten

Die H₂-Rezeptor-, Serotonin/5HT-Rezeptor-, D₂-Rezeptorantagonisten wirken auf Regulatorzellen in unterschiedlicher Ausprägung immunstimulierend.

Histamin ist bei vielen Erkrankungen, vor allem aus dem allergischen Formenkreis, aber auch bei Infektionen und auch bei Malignomen von wichtiger Bedeutung.

Die in der Literatur beschriebenen suppressiven Signale auf Lymphozyten durch Histamin können durch die Stimulation der IL-10-Sekretion und durch eine Hemmung der IFN- γ - und

IL-12-Synthese erklärt werden [Elenkov et al., 1998; Horvath et al., 1999]. Cimetidin fördert demnach die Proliferation unbehandelter Zellen durch Stimulieren der IFN- γ - und IL-2-Synthese und verhindert somit die durch Histamin sonst übliche Suppression [Gifford et al., 1987; Hahn et al. 1994; Horvath et al., 1999].

Die Funktion von TH2-Zellen wird durch eine Blockade der H₁-Rezeptoren gehemmt [Munakata et al., 1999]. H₂-Rezeptorantagonisten haben sogar bei gesunden Probanden immunsteigernde Effekte [Brockmeyer et al., 1989]. Auch bei Patienten nach schwerem Schädelhirntrauma, die immunsupprimiert waren [Rixen et al., 1996] und bei Malignompatienten [Kelly et al., 1999] konnten immunstimulierende Effekte durch Blockierung des H₂-Rezeptors gezeigt werden. Der H₂-Rezeptorblocker Cimetidin entfaltet sein Wirkung in den ersten 24 Stunden nach Exposition eines Alloantigens, indem es die T-Suppressorfunktion hemmt [Gifford et al., 1988, Nakajima et al., 1991; Rezay et al., 1990]. Dabei besitzen die aktivierten T-Suppressorzellen, die CD8 und CD25 positiv sind, eine sehr hohe Konzentration an H₂-Rezeptoren [Shibata et al., 1992]. In eigenen Versuchen konnte für das Medikament Cimetidin die eben beschriebene aktivierende Wirkung auf die Proliferation nur sehr unzureichend gezeigt werden.

Für den spezifischen D₂-Rezeptorblocker Sulpirid konnte im Gegensatz zu anderen Dopaminrezeptorantagonisten kein immunsuppressiver Effekt nachgewiesen werden [Roudebusch et al., 1991]. Dies erscheint verwunderlich, da nämlich sowohl B- als auch T-Lymphozyten D₂-Rezeptoren besitzen [Santamrogio et al., 1993]. Eine Rezeptorbindung von Dopamin führt über ein G_i-Protein zu einer Hemmung der Adenylatzyklase [Izenwasser et al., 1995; Santamrogio et al., 1993]. Wenn nun Sulpirid diese Hemmung verhindert, kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration.

Über die Wirkung der Substanz Cyproheptadin, die am 5-HT₂-Rezeptor angreift und sowohl antihistaminerge, als auch serotoninartige Eigenschaften besitzt, existieren in der Literatur keine Untersuchungen. Aufgrund der zuvor genannten Eigenschaften ist eine den Substanzen Sulpirid und Cimetidin ähnliche Wirkung anzunehmen.

Über den synthetisch hergestellten, D₁-Rezeptor selektiven Antagonist SKF-83566 waren in der Literatur ebenfalls keine passenden Wirkungsweisen auf Lymphozyten zu finden. Demnach ist eine ähnliche Wirkung, wie die anderer Dopaminrezeptorantagonisten (beispielsweise Chlorpromazin), die sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* immunsuppressiv wirken, anzunehmen.

Diese nur bruchstückhaften Erkenntnisse bedürfen jedoch noch weitere wissenschaftlicher Belege und vor diesem Hintergrund sind vielleicht auch die zum Teil konträren Ergebnisse dieser Arbeit zu bewerten.

4.4.1.3.1 Cimetidin (H_2 -Rezeptor, Antagonist)

Cimetidin besetzt genauso wie Ranitidin kompetitiv die H_2 -Rezeptoren von Histamin. Histamin, das durch Decarboxylierung aus der Aminosäure Histidin entsteht, ist in Gewebsmastzellen und im Blut gespeichert. In der Lunge führt Histamin zur Bronchokonstriktion, steigert im Darm die Peristaltik und wirkt auf Gefäße dilatierend, indem es die Nitritoxydase aktiviert. Zusätzlich wird Histamin aus enterochromaffinartigen Zellen in der Magenschleimhaut freigesetzt, um die Säuresekretion aus den Belegzellen zu stimulieren. Im zentralen Nervensystem (ZNS) wirkt es als Neurotransmitter [Forth et al., 1996].

Es existieren drei verschiedene Rezeptoren des Histamins, nämlich H_1 - und H_2 -Rezeptoren, die proteingekoppelt sind und der H_3 -Rezeptor.

Durch Aktivierung der H_1 -Rezeptoren kommt es zu einer vermehrten Kalziummobilisation; eine Aktivierung des H_2 -Rezeptors dagegen führt zur Stimulation der Adenylatzyklase. Die H_3 -Rezeptoren sind parasymphatische Histaminrezeptoren [Forth et al., 1996].

4.4.1.3.2 Cyproheptadin (Serotonin/ 5-HT-Rezeptor, Antagonist)

Cyproheptadin greift am 5-HT₂-Rezeptor an und hat sowohl antihistaminerge als auch serotoninantagonistische Eigenschaften. Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) entsteht in den enterochromaffinen Zellen des Darmepithels aus der Aminosäure L-Tryptophan. Serotonin wird auch in den Nervenzellen des Darmes des Plexus myentericus und im ZNS, wo es als Neurotransmitter dient, gebildet. In Thrombozyten ist 5-HT gespeichert, wird jedoch nicht in ihnen gebildet [Forth et al., 1996]. Derzeit kennt man sieben verschiedene Rezeptoren, unter denen noch verschiedenen Subtypen existieren. Diese Rezeptoren sind zum Großteil an G-Proteine gekoppelt. Die Signaltransduktion über die Adenylatzyklase ist den 5-HT₁-Rezeptoren gemeinsam. Dagegen funktioniert die Stimulation der 5-HT₂-Rezeptoren über eine Aktivierung der Phospholipase C. Der 5-HT₃-Rezeptor besitzt einen nicht selektiven, ligandengesteuerten Ionenkanal [Forth et al., 1996].

4.4.1.3.3 Sulpirid und SKF 83566 (Dopaminrezeptorantagonisten)

Sulpirid gehört zur großen Gruppe der Neuroleptika beziehungsweise in die Untergruppe der Benzamide. Das kardinale pharmakologische Merkmal der Neuroleptika ist ihre antagonistische Wirkung an Dopaminrezeptoren. Von diesen kennt man heute mindestens fünf Subtypen

(D₁ bis D₅). Neuroleptika blockieren den D₂-Typ. Die Affinität der Neuroleptika zu D₂-Rezeptoren korreliert sehr gut mit ihren bei der Therapie erreichten freien Plasmakonzentrationen. Dies weist darauf hin, dass die Blockade der D₂-Rezeptoren für die antipsychotische Wirkung der Neuroleptika verantwortlich ist [Forth et al., 1996].

Bei Sulpirid lässt sich die geringe Ausprägung extrapyramidal-motorischer Nebenwirkungen nicht auf die zusätzliche Wirkung an einem bestimmten Rezeptor zurückführen, da das Pharmakon fast nur Affinität zu den D₂-Rezeptoren besitzt.

SKF-83566 ist ein synthetisch hergestellter Dopaminantagonist, der seine Wirkung selektiv am D₁-Rezeptor entfaltet.

4.4.1.4 PGE₂-Rezeptor Antagonisten/ Metabolite des Arachidonsäurestoffwechsels

4.4.1.4.1 Acetylsalicylsäure (ASS)

ASS hemmt die Zyklooxygenase irreversibel durch Acetylierung eines Serin-Bausteins. Sie wirkt in einer Einzeldosis von 500 mg analgetisch und antipyretisch, in höherer Dosierung auch antiphlogistisch-antirheumatisch. Seit Mitte der neunziger Jahre vermutet man, dass ASS einen zweiten, Zyklooxygenase-unabhängigen molekularen Wirkungsmechanismus besitzt. Sie hemmt die Aktivierung von NFκB, einem am Entzündungsgeschehen maßgeblich beteiligten Transkriptionsfaktor [Forth et al., 1996].

Zusätzlich wird durch eine Gabe von 50-100 mg Acetylsalicylsäure infolge der Hemmung der Zyklooxygenase die Synthese von Thromboxan A₂ in den Thrombozyten vermindert und damit die Thrombozytenaggregation gehemmt. Dieser Effekt hält über mehrere Tage an, weil die kernlosen Thrombozyten nicht zur Proteinbiosynthese fähig sind. Demgegenüber können die Endothelzellen der Gefäße inaktivierte Zyklooxygenase durch Neusynthese ersetzen und dadurch wieder antiaggregatorische PGI₂ bilden. Salicylsäure, die durch Deacetylierung aus ASS gebildet wird, besitzt keine therapeutisch nutzbare thrombozytenaggregationshemmende Wirkung, da sie die Zyklooxygenase nur kompetitiv zur Arachidonsäure hemmt.

4.4.1.4.2 Indomethacin und Diclofenac

Bei Diclofenac (Voltaren®) handelt es sich um ein Arylessigsäurederivat. Indomethacin (Amunon®) dagegen ist ein Indolessigsäurederivat. Beide gehören in die große Gruppe der nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSA). Sie werden zur Behandlung starker akuter Schmerzen und bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises benutzt. Diclofenac wirkt in üblichen Dosierungen stärker analgetisch als ASS.

Die NSA hemmen, genauso wie die antipyretischen Analgetika, die Biosynthese von Prostanoiden, indem sie das Schlüsselenzym Zyklooxygenase blockieren. Ursprünglich wurden sie entwickelt um chronische Entzündungsreaktionen, wie beispielsweise die rheumatoiden Arthritis, langfristig behandeln zu können. Dabei sollten die bekannten unerwünschten Wirkungen von ASS (Schädigung der Magenschleimhaut) vermieden werden. Dies wurde jedoch erst in jüngster Zeit erreicht. Entscheidend dafür war die Entdeckung zweier verschiedener Isoenzyme, die sich hinter der Zyklooxygenase-Aktivität verbergen.

Die Cyclooxygenase-1 (COX-1) wird fast in allen Körpergeweben exprimiert. Die Prostanoidsynthese wird dabei durch die Verfügbarkeit des Substrats Arachidonsäure reguliert. Die somit gebildeten Prostanoiden sind als Gewebshormone (Autacoide) an der physiologischen Regulation vieler Organfunktionen beteiligt.

Im Gegensatz dazu wird die Cyclooxygenase-2 (COX-2) überwiegend nur nach Induktion und vor allem in Entzündungszellen exprimiert. Potente Induktoren sind die inflammatorische Zytokine, vor allem Interleukin-1 [Forth et al., 1996].

Beide Isoenzyme weisen sehr große Homologien auf. Trotzdem gelang es selektive COX-2 Inhibitoren (Cyclooxygenase-spezifische Inhibitoren (CSI)) zu entwickeln, da sich die Bindungstaschen für die Substrate deutlich unterscheiden. Die klassischen nicht-steroidalen Antiphlogistika, auch NSA der ersten Generation genannt, zu denen auch Diclofenac und Indomethacin zählen, sind alle Derivate organischer Säuren. Diese NSA der ersten Generation hemmen beide Isoenzyme, wobei hauptsächlich COX-1 bevorzugt wird. Sie sind somit alle analgetisch wirksam. Bei akuten, nicht-entzündlichen Schmerzen sind die selektiven COX-2-Inhibitoren nicht wirksam. Bei der Senkung von Fieber jedoch scheint die Hemmung der COX-2 von entscheidender Bedeutung zu sein.

Die immunologische Funktion von Regulatorzellen wird durch den Arachidonsäurestoffwechsel nicht entscheidend beeinflusst.

Das nicht-steroidale Antiphlogistikum Indomethacin zeigt in den T-Zellproliferationstests keine immunpotenzierende Wirkung. Diclofenac hingegen weist dagegen eine deutliche Aktivitätssteigerung auf.

In der Immunologie ist der Arachidonsäurestoffwechsel von wichtiger Bedeutung. Durch Hemmung der Phospholipase A (PLA 2) mit Hilfe von Glukokortikoiden wird die Bildung sowohl von Leukotrienen, als auch von Prostaglandinen inhibiert. Der stärkste Promotor für die Transkription proinflammatorischer Zytokine, AP-1, wird ebenfalls durch die Wirkung von Glukokortikoiden gehemmt [Barnes, 1995; Stam et al., 1993]. Die Glukokortikoide fördern die

B-Zellproliferation [Goodwin et al., 1986], zusätzlich auch die Immunglobulinbildung und hemmen zugleich die Proliferation der T-Zellen und auch die Bildung zytotoxischer T-Zellen (CTL) [Cheigh et al., 1975; Hirschberg et al., 1980; Stam et al., 1993]. Zudem wird die Bildung von TH2-Zellen und T-Suppressorzellen durch ihre Wirkung gefördert.

Glukokortikoide führen in vivo zu einer Leukozytose, die durch eine Granulozytose mit gleichzeitiger Lymphozytopenie und Monozytopenie gekennzeichnet ist. Dabei inhibieren sie die MLR der Lymphozyten, hemmen zusätzlich die Freisetzung lysosomaler Enzyme und stabilisieren lysosomale Zellmembranen [Cheigh et al., 1975; Onsrud, 1981].

Wie bereits zuvor erwähnt ist die COX das Schlüsselenzym der Prostaglandinsynthese. Die Zyklooxygenase wird durch die Wirkung nichtsteroidaler antiinflammatorischer Medikamente (NSAIDs), wie beispielsweise Diclofenac oder Indomethacin gehemmt [Goodwin, 1984].

Der eigentliche Entzündungsmediator PGE₂ wird physiologisch hauptsächlich durch Makrophagen gebildet [Goodwin, 1977; Goodwin, 1984; Onsrud, 1983], indem diese durch Lymphokine von spezifischen T8-Suppressorzellen dazu stimuliert werden.

PGE₂ hemmt die Proliferation von T-Zellen und fördert die Bildung von Immunglobulinen durch B-Zellen [Ceuppens et al., 1982; Goodwin et al., 1977; Goodwin, 1980; Goodwin, 1984]. Hingegen stimulieren die Hemmer der COX-Hemmer die Proliferation der T-Zellen in vitro, hemmen die Induktion allospezifischer Suppressorzellen und zugleich noch die Synthese des Rheumafaktors durch B-Zellen [Ceuppens et al., 1982; Goodwin, 1980, Goodwin et al., 1986; Goodwin et al., 1986; Goodwin, 1984; Goodwin, 1984, Goodwin et al., 1976; Hirschberg et al., 1980; Onsrud, 1983].

Einige Autoren beobachteten, dass PGE₂ nach Ablauf einer spezifischen Immunreaktion als negativer Feedbackinhibitor suppressiv auf die spezifischen Effektorzellen wirkt:

Demnach sollen nichtsteroidale antiinflammatorischer Medikamente, die keinen Einfluss auf die zelluläre Immunität beim Gesunden haben, die DTH-Reaktion bei DTH-anergen Patienten ermöglichen, und sogar noch verstärken [Goodwin, 1984]. Außerdem stimulieren die NSAIDs nicht gegen Antigene, sondern bei Antigenexposition den Titeranstieg gegen Recallantigene [Goodwin et al., 1978]. Zudem konnte in anderen Experimenten bei T-Suppressorzellen eine deutlich höhere PGE₂-Rezeptordichte als auf T-Helferzellen nachgewiesen werden. Der suppressive Effekt von PGE₂ wird durch die T8-Depletion aufgehoben. Durch den Einfluss von PGE₂ kann eine gesteigerte B-Zellfunktion erreicht werden:

Denn es wird nicht nur die T-Zellfunktion gehemmt [Goodwin et al., 1976], sondern auch die strahlensensiblen und durch MMC inaktivierten T8-Suppressorzellen [Ceuppens et al., 1982; Goodwin, 1984]. Diese Suppressorzellen hemmen wiederum die TH2-Helferzellen der Immunglobulinsynthese durch B-Lymphozyten.

Das nichtsteroidale Antiphlogistikum Indomethacin fördert die zelluläre Immunität und hemmt die die Immunglobulinbildung.

In den eigenen Ergebnissen fällt eine deutliche suppressive Wirkung auf die T-Zellfunktion durch Indomethacin auf. Die proliferationsfördernde Wirkung der nichtsteroidalen Antiphlogistika konnte hingegen, wie sie von anderen Autoren beschrieben wurde, im Gegensatz zu Indomethacin, bei Diclofenac gezeigt werden. Auch für das Medikament ASS konnte eine Förderung der Proliferation, ähnlich der bei Diclofenac, gefunden werden.

4.4.2 Immunmodulatoren

4.4.2.1 L- Arginin

L-Arginin ist für Säuglinge und Kinder eine essentielle Aminosäure, für Erwachsene eine nicht essentielle Aminosäure. L- Arginin ist besonders reich an NO und kann aus vielen Proteinen gebildet werden. Bei Säugetieren spielt es eine wichtige Rolle in der Harnstoff-Synthese. Erwachsene können L- Arginin aus Glutaminsäure synthetisieren [Forth et al., 1996].

L- Arginin ist an einer Reihe von Körperfunktionen beteiligt. Es ist ein Präkursor für Stickoxid, das beispielsweise für die Regulation der Blutgefäße beziehungsweise der Blutzirkulation und für die Übermittlung von Neuronen im Gehirn benötigt wird. L- Arginin verbessert die Pumpleistung des Herzens. Es trägt weiter dazu bei, dass verschiedene Hormone gebildet werden. Arginin ist daran beteiligt, dass Wachstumshormone aus der Hypophyse, Insulin aus dem Pankreas und Noradrenalin aus den Nebennieren freigesetzt werden. L- Arginin ist für das Immunsystem wichtig, denn es verbessert die zelluläre Immunantwort, trägt zur Bildung von T-Lymphozyten bei und senkt deren Funktionsstörungen, und es regt die Phagozytose an. L- Arginin trägt über seine Beteiligung an der Proteinsynthese bei Verletzungen und Operationen zur besseren Wundheilung bei. Im Harnstoffzyklus der Leber wird L- Arginin in Harnstoff und in die Aminosäure Ornithin gespalten und kann auch aus dieser gebildet werden. Es befreit auf diese Weise den Körper von überschüssigem Stickstoff, der danach mit dem Urin ausgeschieden wird [Forth et al., 1996].

4.4.2.2 D-/L-Cystein

Die nicht essentielle Aminosäure D-/L-Cystein wird im menschlichen Körper meist aus Serin und Methionin gebildet und kann in Cystin umgewandelt werden. D-/L-Cystein ist wie Methionin und Taurin eine schwefelhaltige Aminosäure mit antioxidativer Wirkung und kommt vorwiegend in tierischen Proteinen vor. Die Struktur als schwefelhaltiges Tripeptid wurde 1935 aufgeklärt. In der Leber wird aus Glutaminsäure, Glycin und Cystein Glutathion, eines der wichtigsten Antioxidantien im Körper, gebildet. Glutathion ist in fast allen Körperzellen in hoher Konzentration vorhanden, wobei sich das aktive, reduzierte Glutathion zusammen mit Glutathion-Disulfid im Gleichgewicht befindet [Forth et al., 1996].

D-/L- Cystein hat antioxidative Fähigkeiten und kann die toxischen Wirkungen von Medikamenten und Chemikalien verringern. Es trägt zur Synthese der Zellmembranen ebenso wie zu ihrer Reeneration bei. Glutathion wird für viele Prozesse im Stoffwechsel genutzt. Es unterstützt die Strukturen von Körperproteinen und hilft beim Transport von Aminosäuren durch die Zellmembranen. Glutathion spielt eine besonders wichtige Rolle im antioxidativen Immunsystem des Körpers. Es entfaltet seine Wirkung zusammen mit dem selenhaltigen Enzym Glutathionperoxidase. Glutathion kann freie Radikale entgiften und oxidiertes Vitamin C und E wieder so aufbereiten, dass der Körper diese Vitamine erneut nutzen kann. Die aktive, reduzierte Form von Glutathion ist relativ instabil, vor allem bei oxidativem Stress wird es schnell verbraucht. Glutathion ist weiterhin für das Immunsystem wichtig, das gilt speziell für die Reproduktion von Lymphozyten. Es trägt dazu bei, dass Leukotriene gebildet werden, die bei Entzündungen die Funktionen der Leukozyten und andere Immunreaktionen steuern [Forth et al., 1996].

4.4.2.3 Zaprinast und 8-Bromo-cGMP

Bei Zaprinast und 8-Bromo-cGMP handelt es sich um Substanzen, die das cAMP- System beeinflussen. Der intrazelluläre cAMP-Spiegel ist von entscheidender Bedeutung eine T-Helferzelle entweder in die Richtung der TH1- oder TH2-Zellen zu lenken.

Die intrazelluläre cAMP-Konzentration ist für die Steuerung, beziehungsweise für die Anpassung, der Zytokinsekretion maßgeblich entscheidend. So führt ein Anstieg der cAMP-Konzentration zu einer Sezernierung der TH2-Zytokine IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10. Gleichzeitig aber kommt es zu einer Hemmung der TH1-Zytokine IL-2, IL-12, INF- γ und des TNF- α [Haraguchi et al., 1995].

Die Proteinkinase A (PKA) wird durch den Einfluss des zyklischen Adenosinmonophosphats aktiviert und ist zusammen mit der Proteinkinase C (PKC) und dem Kalzium/Kalmodulin-Komplex das Regulatorenzym der Gentranskription der Zytokine.

4.5 Das TH1 / TH2-Zellkonzept

Die Untersuchung der Beeinflussung der beiden unterschiedlichen Subpopulationen von TH-Zellen (TH1- und TH2-Zellen), beziehungsweise die Umwandlung in eine TH1 vorherrschende Immunabwehr war für diese Arbeit von entscheidender Bedeutung.

Wie bereits im Kapitel 1.4 beschrieben unterscheiden sich TH-Zellen in ihrem Zytokinprofil und lassen sich daher in zwei verschiedene Klassen unterteilen nämlich TH1 und TH2-Zellen.

TH1-Zellen oder CD 4(+)-Lymphozyten produzieren hauptsächlich IL-2, INF- γ und TNF- β . Bei der zellulären Immunabwehr herrschen sie als Helferzellen vom Typ TH1 vor [Kelso, 1995].

TH2-Zellen hingegen produzieren vorwiegend IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 und IL-10. Bei der Produktion von Antikörpern (humorale Immunabwehr) sind TH2-Zellen vorherrschend, vor allem bei Infektionen mit Würmern und bei Erkrankungen aus dem allergischen Formenkreis. Zusätzlich unterdrücken TH2-Zellen die durch Helferzellen vom Typ TH1 vermittelte Stimulation der zellulär vermittelten Immunabwehr [Garside et al., 1995].

Die naive periphere T-Zelle erlangt während des ersten Antigenkontakts die Eigenschaft sich in Richtung TH1 oder TH2-Profil zu entwickeln. Diese Entwicklung, entweder Zytokine vom Typ TH1 oder TH2 auszuschütten, hängt stark mit den beeinflussenden Faktoren des lokalen Mikromilieus ab. Die Interleukine unspezifischer Entzündungszellen sind dabei von entscheidender Bedeutung [Garside et al., 1995; Kelso, 1995]. So sezernieren beispielsweise Makrophagen Zytokine, die eine TH1 beherrschte Immunantwort hervorrufen. Dabei spielt IL-12 eine vermittelnde Rolle, wodurch eine Produktion von IFN- γ durch NK und auch durch T-Lymphozyten hervorrufen wird [Gately et al., 1994; Seder et al., 1993].

IL-4 hat einen großen Einfluss auf naive T-Zellen sich zu TH2-Zellen zu differenzieren. Für die Ausschüttung von IL-4 werden zum einen Mastzellen verantwortlich gemacht, daneben wird auch eine autokrine Synthese über TH-Zellen selbst diskutiert. Demnach spielen die Mastzellen eine ähnliche Rolle wie die Makrophagen bei der zellulären Immunantwort [Garside et al., 1995].

Dem von TH-Zellen vom Typ TH2 produzierte IL-10 kommt eine entscheidende Bedeutung bei der Differenzierung der TH-Zellen zu:

Es hemmt die Synthese von IL-12 durch die Makrophagen und supprimiert damit die TH1 vermittelte Immunantwort [Kägi et al., 1994].

Ob eine Beeinflussung dieses TH1/TH2-Systems durch verschiedene immunaktivierende Substanzen, beziehungsweise bestimmte Rezeptorantagonisten möglich ist, soll nun im Folgenden diskutiert werden. Dafür bedarf es der Darstellung einiger Grundlagen der zellulären Signaltransduktion.

4.6 Die zelluläre Signaltransduktion

Viele der in dieser Studie untersuchten Substanzen greifen in die zelluläre Signaltransduktion ein.

Diese Immunmodulatoren und Antagonisten der Rezeptoren von Adrenalin, Dopamin, Histamin, Prostaglandine und Serotonin stimulieren, beziehungsweise inhibieren die Adenylatzyklase über GTP bindende Proteine (G-Proteine) durch eine Erhöhung oder Erniedrigung des zellulären Spiegels von cAMP [Dhanasekaran et al., 1998].

Die Signaltransduktionssystem von extrazellulären Signalen nach intrazellulär besteht aus drei Proteinen, nämlich Rezeptor, G-Protein und Effektor.

So interagieren beispielsweise Neurotransmitter (extrazelluläre Moleküle) mit der Rezeptoruntereinheit [Gudermann et al., 1997], was eine Konformationsänderung dessen Quartärstruktur hervorruft, die sich dann auf das GTP-bindende Protein fortleitet und den Effektor beziehungsweise dessen Funktionsstand verändert.

Die Beeinflussung dieser Mechanismen dieses Gesamtsystems ist eines der zentralen Themen der vorliegenden Arbeit. Wie bereits zuvor erwähnt sollen nun die einzelnen Prozesse der zellulären Signaltransduktion vom G-Protein, über die second-messenger-Systeme, bis hin zur Veränderung des cAMP-Spiegels im Zytoplasma erläutert werden.

4.6.1 G-Proteine

Dieses heterotrimere Protein besteht aus einer alpha-, einer beta- und einer gamma-Untereinheit [Damle et al., 1982].

Die alpha-Untereinheit ist für das GTP-bindende Protein von entscheidender Bedeutung. Sie macht das Protein in seiner Struktur, in seiner Affinität und seinem Einfluss auf das Effektorprotein einzigartig. Aus diesem Grund aktiviert die alpha-Untereinheit G_s (stimulierendes G-Protein) ein Effektorprotein, dagegen hemmt die Untereinheit G_i (inhibierendes G-Protein) demzufolge jenes Protein.

Im Gegensatz zur alpha-Untereinheit besitzen sowohl beta-, als auch gamma-Untereinheit einen homologen Aufbau und eine weitgehend ähnliche Funktion.

Adenylatzyklase, Phospholipase C (PLC), Guanylatzyklase und Phospholipase A_2 sind die Effektorproteine für die an das G-Protein gekoppelten Rezeptoren [Clapham et al., 1993].

Feste Rezeptoren sind nicht einem G-Protein zugeordnet, vielmehr besteht eine Zuordnung bestimmter Rezeptortypen. Rezeptoren, die an das G-Protein gekoppelt sind, sind beispielsweise Adrenalin, Dopamin, Histamin, Prostaglandine und Serotonin.

Zusätzlich können G-Proteine seitlich in der Zellmembran diffundieren [Lyllmann et al., 1994].

4.6.2 Second Messenger

Der intrazelluläre cAMP-Spiegel wird durch das G-Protein entscheidend beeinflusst. So kann das G-Protein entweder durch G_s oder durch G_i zu einer Erhöhung beziehungsweise Erniedrigung des cAMP-Spiegels führen. Das G-Protein wiederum hängt von einer Aktivierung der Adenylatzyklase ab, die es als Effektorprotein aktiviert.

Das intrazelluläre cAMP bindet je nach Spiegel an bestimmte dimere Enzyme, die genau an das zyklische Adenosinmonophosphat durch die spezifische cAMP-Bindungseinheit angepasst sind. Zusätzlich besitzen diese Enzyme, meist Kinasen oder Phosphatasen, eine katalytische Einheit durch die wichtige Zellfunktionen sichergestellt werden. Dies umfasst Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Zellproliferation und auch die Steuerung von wichtigen Ionenkanälen, was durch Phosphorylierungsvorgänge und Dephosphorylierungsvorgänge geschieht [Skalhegg et al., 1997].

Durch die heterogene Struktur der cAMP-abhängigen Proteinkinasen, sowohl der Bindungseinheiten ($RI\alpha$, $RI\beta$, $RI\gamma$), als auch der katalytischen Einheit ($C\alpha$, $C\beta$, $C\gamma$), konnten unterschiedliche Isoenzyme demaskiert werden. Die Isoenzyme unterscheiden sich in ihrem zellspezifischen Erscheinungsbild und auch in ihren biochemischen Eigenschaften [Skalhegg et al., 1992].

Die cAMP-abhängige Proteinkinase A ist bei diesen Schritten von entscheidender Bedeutung. Sie phosphoryliert OH-Gruppen von Aminosäureketten in einigen Proteinen, wobei es sich zu meist um Serylreste handelt [Cohen, 1989].

Eine andere durch G-Proteine vermittelte Signaltransduktionskaskade wird durch eine Aktivierung der PLC in Gang gebracht. Diese Aktivierung bewirkt eine Spaltung des Membranphospholipids Phosphatidylinositolbiphosphat (PIP₂) und es entstehen dadurch die beiden Signalmoleküle Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) [Löffler, 1988].

IP₃ ruft eine Freisetzung von Kalzium (Ca²⁺) aus den Speichern des Endoplasmatischen Retikulums hervor und führt somit zu einer Erhöhung des zytosolischen Ca²⁺-spiegels, was sich direkt auf den Zellstoffwechsel auswirkt. Das hierbei freigesetzte Ca²⁺ wirkt nicht direkt auf die enzymatischen Systeme, sondern über zwischengeschaltete Ca²⁺-bindende Proteine. Das dafür verantwortliche kalziumbindende Protein Kalmodulin konnte in Nichtmuskelzellen nachgewiesen werden. Es besitzt eine Ähnlichkeit zu dem in der Kardiologie zur akuten Herzinfarkt Diagnostik oft bestimmten Troponin C. Das zuvor genannte Protein Kalmodulin ändert nach der Bindung an Kalzium seine Konformation und unterschiedliche Proteine der Zelle binden nun an den Kalzium-Kalmodulin-Komplex. Dadurch werden die katalytischen Aktivitäten von Kalzium-Kalmodulin-abhängigen Enzymen, wie membrangebundene Kalzium-ATPasen, die Adenylatzyklase, Phosphorylasekinasen und Zyklonukleotidphosphodiesterasen verändert [Berridge et al., 1984; Löffler, 1988].

Das bei der Spaltung von Phosphoinositiden ebenfalls freiwerdende DAG hat ebenfalls eine wichtige Bedeutung bei der zellulären Signaltransduktion. Durch DAG und Ca²⁺ wird die spezifische Proteinkinase C aktiviert, die sich in ihrer Substratspezifität von der durch cAMP abhängigen Proteinkinase deutlich unterscheidet. So ist die aktivierte Proteinkinase C häufig bei der Differenzierung und beim Wachstum von Zellen beteiligt, indem sie an der Proteinbiosynthese beteiligte Faktoren sowie Hormonrezeptoren und auch Teile des Zytoskeletts phosphoryliert [Andersen et al., 1985; Hokin, 1985].

Analog zur G-Protein vermittelten Aktivierung der Adenylatzyklase findet man darüber hinaus die Aktivierung der Guanylatzyklase und der Phospholipase A₂.

Die Guanylatzyklase ist seit den sechziger Jahren bekannt und konnte in den meisten Zellen, wie zum Beispiel glatten Muskelzellen und Monozyten, unterschiedlicher Herkunft nachgewiesen werden. Die Guanylatzyklase katalysiert die Synthese von cGMP aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP). Aufgrund von unterschiedlichen strukturellen Merkmalen wird die Guanylatzyklase in die membrangebundene und in die lösliche Form eingeteilt:

Die membrangebundene oder auch partikuläre Guanylatzyklase (pGC) ist ein Homodimer, das von natriuretischen Peptiden stimuliert wird.

Die lösliche Guanylatzyklase (sGC) wird von NO aktiviert. Sie besteht aus zwei Untereinheiten und enthält pro Heterodimer ein Häm als prosthetische Gruppe. Beide Untereinheiten sind für die Katalyse notwendig. Die Guanylatzyklase ist verstärkt in cholinergen Geweben zu finden [Löffler, 1988] und besitzt eine hohe Aktivität in fetalem Gewebe [Löffler, 1988].

Arachidonsäure wird durch Aktivierung der Phospholipase A₂ aus Membranphospholipiden abgespalten. Dabei handelt es sich fast ausschließlich um Phosphatidylinositol. Prostaglandin H₂ wird durch den Einfluss einer Cyclooxygenase gebildet und gilt als Muttersubstanz der Prostaglandine PG I₂, PG E₂, PG F₂ und auch des Thromboxans A₂. Eine Lipoxygenase bewirkt über einen alternativen Weg die Bildung der Leukotriene, die zur Gruppe der Eicosanoide gehören. Dies geschieht durch Bildung eines Hyperoxids und durch Umlagerungen der Doppelbindungen der Arachidonsäure [Löffler, 1988].

Prostaglandin H₂ wirkt, genauso wie auch andere Prostaglandine, intrazellulär über eine Erhöhung des cAMP-Spiegels.

4.6.3 Das NO/cGMP-System

Eines der wichtigsten zellulären Übertragungssysteme ist das cGMP. Es bildet zusammen mit NO das NO/cGMP-System und spielt als *second messenger* eine entscheidende Rolle bei einer Vielzahl von unterschiedlichen physiologischen Prozessen, insbesondere bei der Relaxation von glatten Muskelzellen, der Verminderung der Plättchenadhäsion und -aggregation und der neuronalen Signalübertragung und auch bei immunologischen Prozessen. Daher dienen Arzneistoffe, die zu einer Steigerung der cGMP-Konzentration in den Zielzellen (Zellen der glatten Gefäßmuskulatur, Thrombozyten) führen, zur Vorbeugung und Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Der biologische Effekt von NO wurde 1980 von Furchgott und Sawadzki entdeckt. Da die Struktur aufgrund der geringen Halbwertszeit noch ungeklärt war, nannten sie die Substanz *endothelium derived relaxing factor* (EDRF) [Furchgott et al., 1980]. 1987 gelang es Palmer und Mitarbeitern NO über Chemilumineszenzmessungen zu identifizieren. Stickstoffmonoxid, das aus den Endothelzellen durch vasoaktive Substanzen (Acetylcholin, Bradykinin) freigesetzt wird, führt über die Aktivierung der sGC zu einer Erhöhung des cGMP-Spiegels [Palmer et al., 1987]. Die daraus resultierende Abnahme der Ca²⁺-Konzentration bewirkt unter anderem eine Vasodilatation und Verminderung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation.

Die Effekte des cGMP werden durch cGMP-abhängige Proteinkinasen vermittelt. Ein NO-Mangel, der durch funktionseingeschränkte Endothelzellen in atherosklerotisch veränderten Gefäßen verursacht wird, kann durch Gabe von NO-Donoren (Glyceroltrinitrat, Isosorbiddinitrat) teilweise oder vollständig ausgeglichen werden. NO-Donoren werden seit Jahren bei der Behandlung von Angina pectoris verwendet. Die Bildung von Nitrat-Toleranzen machte aber die Suche nach NO-unabhängigen sGC-Aktivatoren unverzichtbar.

5 Zusammenfassung

Die Therapie von Tumorerkrankungen hat sich in den letzten Jahren rasant gewandelt. Setzte man bei der Behandlung von Krebs noch vor kurzem große Hoffnungen in die Chemotherapien, so machte sich aufgrund der hohen Remissionsraten schnell Ernüchterung breit. Zu einer viel versprechenden Therapieoption dieser Erkrankungen sind in letzter Zeit zelluläre Immunvakzine geworden. Doch leider ist es bisher noch nicht in ausreichendem Maße gelungen, die *in vitro* und im Tierversuch erreichten Erfolge, auf Patienten mit Tumorerkrankungen zu übertragen. Das Hauptproblem stellt die mangelnde Immunkompetenz der Rezipienten, und vor allem auch die Suppressionsmechanismen der Vakzine selbst, dar.

Die vorliegende experimentelle Studie untersucht die immunologische Potenz von Medikamenten des klinischen Alltags und von Immunmodulatoren auf periphere mononukleäre Lymphozyten. Die *in vitro* Experimente basieren auf dem aus der Transplantation stammenden Modell MLC. Relevante abhängige Variable der Beobachtungseinheit PBLs (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) ist die polyklonale Lektinstimulation (PHA) und die Proliferation auf allospezifische Zielzellen. Als unabhängig Variable wurde eine 48-stündige Vorinkubation von lektinstimulierten Regulatorzellen, sowie ruhenden Regulatorzellen mit immunmodulierenden Pharmaka definiert. Es wurden sowohl Versuchsreihen mit inaktivierten Regulatorzellen, als auch ohne Inaktivierung durchgeführt. Die Regulatorzellen wurden mit MMC inaktiviert.

In den Versuchsreihen zeigte sich für 8-Bromo-cGMP, DMPX, Atenolol, Diclofenac und Cyproheptadin eine Potenzierung der Funktion der Regulatorzellen. Viele andere untersuchten Stoffe, somit auch andere Rezeptorenblocker, supprimieren hingegen die Regulatorzellen. Auffallend ist, dass sich viele Substanzen der gleichen Substanzklasse völlig unterschiedlich verhalten. Auch konnten bei vielen Testsubstanzen keine einheitliche Wirkung nachgewiesen werden.

Beim Vergleich der Ergebnisse mit der gängigen Literatur zeigt sich, dass es sich bei der T-Zellaktivierung und der Suppression um äußerst komplexe Vorgänge handelt. Dieses hoch komplexe System ist von vielen verschiedenen Faktoren abhängig und bedarf sicher noch weiterer intensiver Erforschung. Als Erklärungsversuch für eine mangelhafte Immunantwort könnte eine funktionelle Blockierung der intrazellulären *second-messenger*-Systeme dienen, die durch ein pathologisches Mikromilieu entsteht.

Literaturverzeichnis

Aardn, L., Corley, R.B., Söderberg, A., Lefkovits, I., Limiting dilution analysis of the suppressive effect mediated by alloantigen- primed cells, *Immunol* 41 (1980): 399-406.

Akiyoshi, T., Arinaga, S., Tsuji, H., Augmentation of the generation of cell- mediated cytotoxicity in culture by mitomycin C, *Cancer Immunol Immunother* 24 (1987): 259-262.

Albrechtsen, D., Lied, M., Stimulating capacity of human lymphoid cell subpopulations in mixed lymphocyte cultures, *Scand J Immunol* 7 (1978): 427-434.

Andersen, W. B., Estival, A., Tapiovaara, H., Gopalakrishna, R., Altered subcellular distribution of protein kinase C (phorbol ester receptor). Possible role in tumor promotion and the regulation of cell growth: relationship to changes in adenylate cyclase activity, *Adv Cyclic Nucleotide Res* 19 (1985): 287;306.

Ardawi, M. S. M., Glutamine and glucose metabolism in human peripheral lymphocytes, *Metabolism* 37 (1988): 99-103.

Arndt, G., In vitro Versuche zur Wirkung verschiedener homöopathischer Dilutionen von Lachesis und Echinacea auf Lymphozyten aus dem peripheren Blut von Kaninchen, *Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn, Dissertation* (1992).

Arno, J. N., Ricker, V.A., Batteiger, B.E., Kats, B.P., Caine, V., Jones, E.B., Interferon gamma in endocervical secretions of women infected with chlamydia trachomatis, *J Infect Dis* 162 (1990): 1385-1389.

Austyn, J. M., Wood, K.J. Principles of cellular and molecular Immunology, in: Oxford University Press (1993): 1-17.

Bach, F., Hirschhorn, K., Lymphocyte interaction: a potential histocompatibility test in vitro, *Science* 143 (1964): 813-814.

Bach, F., Voynow, N.K., One- way stimulation in mixed leucocyte cultures, *Science* 153 (1966): 545-547.

Bach, F. H., Bach, M.L., Cell mediated immunity: separation of cells involved in recognitive and destructive phases, *Science* 180 (1973): 403-406.

Bachwich, P. R., Chensue, S.W., Larrick, J.W., Kunkel, S.L., Tumor necrosis factor stimulates IL-1 and prostaglandin E2 production in resting macrophages, *Biochem Biophys Res Commun* 136 (1986): 94.

- Bancroft, G. L., Schreiber, R.D., Bosma, G.C., Bormar, M.J., Unanue, E.R.**, T cell independent mechanism of macrophag activation by Interferon gamma, *J Immunol* 139 (1897): 1104-1107.
- Barbul, A.**, The role of arginine as an immune modulator, In: "Nutritient modulation of the immune response", *Cunningham-Rundless, S.*, New York (1993): 47-61.
- Barnes, P. J.**, Anti- inflammatory machanisms of glucocortikoids, *Biochem Soc Transactions* 23 (1995): 940-945.
- Bellardelli, F.**, Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response, *A P M I S* 103 (1995): 161-179.
- Bellone, G., Trinchieri, G.**, Dual stimulatory and inhibitory effect of NK cell stimulatory factor / IL12 on human hematopoiesis, *J Immunol* 153 (1994): 930-937.
- Benjamin, D., Knobloch, T.J., Dayton, M.A.**, Human B cell IL10: B-cell lines derived from patients with acquired immuodifficencysyndrome and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of Il10, *Blood* 80 (1992): 1289.
- Bergquist, J., Tarkowski, A., Ekman, R., Ewing, A.**, Discovery of endogenous catecholamins in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop, *Proc Nat Acad Sci U S A* 91 (1994): 12912-12916.
- Berridge, M. J.**, Capasitative calicum entry, *Biochem J* 312 (1995): 1-12.
- Berridge, M. V., Tan, A.S.,McCoy, K.D., Wang, R.**, The biochemical and cellular basis of cell proloferation assays that use tetrozolium salts, *Biochemica* 4 (1996): 15-20.
- Beutler, B., Cerami, A.**, The biology of cachectin/TNF alpha primary mediator of the host response, *Annu Rev Immunol* 7 (1989): 625.
- Biron, C. A., Nguyen, K.B., Pien, G.C., Cousens, L.P., Salazar-Mather, T.P.**, Natural killer cells in antiviral defense: funktion and regulation by innate cytokines, *Annu Rev Immunol* 17 (1999): 189-220.
- Bloom, B. R., Salgame, T., Diamond, B.**, Revisiting and revising suppressor T cells, *Immunol Today* 13 (1992): 131-136.
- Bluman, E. M., Bartynski, K.J., Avalos, B.R., Caligiuri, M.A.**, Human natural killer cells produce abundant macrophag inflammatory protein-1 alpha in response to monocyte- derived cytokines, *J Clin Invest* 97 (1996): 2722-2727.

- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J.C.**, Cellular responses to interferon- gamma, *Annu Rev Immunol* 15 (1997): 749-795.
- Boehringer**, "Produktinformation zu cell proliferation reagent WST-1 Cat.No. 1644 807", *Boehringer GmbH*, Mannheim (1994) 1-4.
- Bois, R. D., Meinesz, A., Bierhorst-Eijlander, A., Groenewoud, M., Schellekens, P.T.A., Eijvoogel, V.P.**, The use of microtiter plates in mixed lymphocyte cultures, *Tissue antigens* 4 (1974): 458-468.
- Bondevik, H., Helgesen, A., Thoresen, A.B., Thorsby, E.**, A mixed lymphocyte culture micro- technique and its application in differend family and unrelated combinations, *Tissue antigens* 4 (1974): 469-481.
- Bönig, H., Banning, U., Hannen, M., Kim, Y.M., Verheyen, J., Mauz-Körholz, C., Körholz, D.**, Transforming growth factor- beta1 supresses IL12- mediated interferon- gamma production in human T lymphocytes, *Scand J Immunol* 50 (1999): 612-618.
- Brinkmann, V., Geiger, T., Alkan, S., Heussere, C.H.**, Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma- producing human CD4 cells, *J Exp Med* 178 (1993): 1655-1663.
- Brockmeyer, N. H., Kreuzfelder, E., Chalabi, N., Scheiermann, N., Heinecke, H.O., Goos, N., Ohnhaus, E.F.**, The immunolatory potency of cimetidine in healthy donors, *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 27 (1989): 458-462.
- Brown, M. A., Hanifin, J.N.**, Atopic dermatitis, *Curr Opin Immunol* 2 (1990): 531-534.
- Brown, M. A., Hural, J.**, Funktions of IL4 and control of its expression, *Crit Rev Immunol* 17 (1997): 1-32.
- Brunda, M. J.**, Antimetastatic activity of IL12 against murine tumors, *J Exp Med* 178 (1993): 1223-1230.
- Burdin, N., Peronne, C., Banchereau, J., Rousset, F.**, Epstein- Barr virus transformation induces B lymphocytes to produce human Il10, *J Exp Med* 177 (1993): 295.
- Burshtyn, D. N., Long, E.O.**, Regulation through inhibitory receptors: lessons from natural killer cells, *Trends Cell Biol* 7 (1997): 473-479.
- Buschle, M., Campana, D., Cariding, S.R., Richard, C., Hoffbrand, A.V., Brenner, M.K.**, Interferon gamma inhibits apoptotic cell death in B cell chronik lymphatic leucemia, *J Exp Med* 177 (1993): 213-218.

Calder, P. C., Newsholme, E.A., Glutamin promotes IL2 production by concanavalin A-stimulated lymphocytes, *Proc Nut Soc* 51 (1992): 105A.

Calder, P. C., Glutamin and the immune system, *Clin Nutrition* 13 (1994): 2-8.

Canobbio, L., Miglietta, L., Boccado, F., Medical treatment of advanced renal cell carcinoma: present opinions and future directions, *Cans Treat Rev* 22 (1996): 85-104.

Carswell, E. A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B., An endotoxine induced serum factor that causes necrosis of tumors, *Proc Nat Acad Sci U S A* 72 (1975): 3666.

Cassatella, M. A., Meda, L., Gasperini, S., D'Andrea, A., Ma, X., Trinchieri, G., IL12 production by human polymorphonuclear leucocytes, *Eur J Immunol* 25 (1995): 1-5.

Castro, A. G., Silva, R.A., Appelberg, R., Endogenously produced IL12 is required for the induction of protective T cells during mycobacterium avium infections in mice, *J Immunol* 155 (1995): 2013-2019.

Caux, C., Massacrier, C., Dezutter-Dambuyant, C., Vanbervliet, B., Jacquet, C., Schmitt, D., Bancherau, J., Human dendritic Langerhans cells generated in vitro from CD 34+ progenitors can prime naive CD4+ cells and process soluble antigen, *J Immunol* 155 (1995): 5427-5435.

Celluzzi, C. M., Mayordomo, J.I., Storkus, W.J. Lotze, M.T., Falo, L.D. Jr., Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity, *J Exp Med* 183 (1996): 283-287.

Cerami, A., Tumor necrosis factor as a mediator of shock, cachexia and inflammation, *Blood Purif* 11 (1993): 108.

Ceuppens, J. L., Goodwin, J.S., Endogenous prostaglandin E2 enhances polyglonal immunoglobulin production by tonically inhibiting T suppressor cell activity, *Cell Immunol* 70 (1982): 41-54.

Chehimi, J., Valiante, N.M., D'Andrea, A., Rengaraju, M., Rosado, Z., Kobayashi, M., Perussia, B., Wolf, S.F., Starr, S.E., Trinchieri, G., Enhancing effect of natural killer cell stimulatory factor (NKSF/ IL12) on cell-mediated cytotoxicity against tumor-derived and virus-infected cells, *Eur J Immunol* 23 (1993): 1826-1830.

Chehimi, J., Stuart, E.S., Frank, I., D'Andrea, A., Ma, X., MacGregor, R.R., Sennelier, J., Trinchieri, G., Impaired IL12 production in human immunodeficiency virus-infected patients, *J Exp Med* 179 (1994): 1361-1366.

- Cheigh, J. S., Stenzel, K.H., Riggio, R.R., Katz, B.B., Rubin, A.L.**, Effects of intravenous methylprednisolone on mixed lymphocyte cultures in normal humans, *Transplant Proc* 7 (1975): 31-35.
- Chen, S. H., Kobayashi, N., Santoli, D., Perussia, B., Trinchieri, G.**, Mechanisms of IFN gamma induction by natural killer cell stimulatory factor (NKFS/IL12), *J Immunol* 148 (1992): 92-98.
- Childs, R., Chernoff, A., Contentin, N., Bahceci, E., Schrump, D., Leitman, S., Read, E.J., Tisdale, J., Dunbar, C., Linehan, W.M., Young, N.S., Barrett, J.**, Regression of metastatic renal cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem, *N Engl J Med* 343 (2000): 750-758.
- Chizzonite, R., Truitt, T., Podlaski, F.J., Wolitky, A.G., Quinn, P.M., Nunes, P., Stern, A.S., Gateley, M.K.**, IL12: monoclonal antibodies specific for the 40kD subunit block receptor binding and biologic activity an activated human lymphoblasts, *J Immunol* 147 (1991): 1548-1556.
- Chizzonite, R., Truitt, T., Desai, B.B., Nunes, P., Podlaski, F.J., Stern, A.S., Gateley, M.K.**, IL12 receptor: I. characterization of the receptor on phytohemagglutinin-activated human lymphoblasts, *J Immunol* 148 (1992): 3117-3124.
- Chomarat, P., Rissoan, M.C., Banchereau, J., Miossec, P.**, IFN gamma inhibits IL10 production by monocytes, *J Exp Med* 177 (1993): 523.
- Chua, A. O., Chizzonite, R., Desai, B.B., Troitt, T.N., Nunes, P., Minetti, L.J., Warrier, R.R., Presky, D.H., Levine, J.F., Gateley, M.K., Gubler, O.**, Expression cloning of a human IL12 receptor component. A new member of the cytokine receptor super family with strong homology to gp130, *J Immunol* 153 (1994): 128-136.
- Clamann, H., Chaperon, E., Trippled, R.**, Thymus- marrow cell combinations synergism antibody production, *Proc Soc Exp Biol Med* 122 (1966): 1167.
- Clapham, D. E., Neer, E.J.**, New roles for G- protein beta gamma- dimers in transmembrane signalling, *Nature* 365 (1993): 403-406.
- Clerici, M., Shearer, G.M.**, The TH1 / TH2 model of HIV infection: new insights in sight, *Immunol Today* 15 (1994): 575-581.

Clerici, M., Ballotta, C., Meroni, L., Ferrario, E., Riva, C., Trabattoni, D., Ridolpho, A., Villa, M., Shearer, G.M., Morroni, M., Galli, M., Type1 cytokine production and low prevalence of viral isolation correlate with long- term nonprogression in HIV infection, *AIDS Res Hum Retroviruses* 12 (1996): 1053-1061.

Clerici, M., Galli, M., Bosis, S., Gervasconi, C., Moroni, M., Norbiato, G., Immunoendocrinologic abnormalities in human immunal deficiency virus infection, *Ann N Y Accad Sci* 917 (2000): 956-961.

Cohen, P., The structure and regulation of protei phosphatases, *Annu Rev Biochem* 58 (1989): 453-508.

Cotter, T. W., Ramsey, K.H., Miranpuri, G.S., Poulsen, C.E., Byrne, G.I., Disemmination of chlamydia trachomatis chronik genital tract infection in gamma interferon gene knock out mice, *Infect Immun* 65 (1997): 2145-2152.

Cuturi, M. C., Murphy, M., Costa-Giomi, M.P., Weinmann, R., Perussia, B., Trinchieri, B., Independant regulation of tumor necrosis factor and lymphotoxine production by human peripheral blood lymphocytes, *J Exp Med* 165 (1987): 1581-1594.

D'Andrea, A., Rengaraju, M., Valiante, N.M., Chehimi, J., Kubin, M., Aste-Amezaga, M., Chan, S.H., Kobayashi, M., Young, D., Nickbarg, E., Chinzzonite, R., Wolf, S.F., Trinchieri, G., Production of natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12) by peripheral blood mononuclea cells, *J Exp Med* 176 (1992): 1387-1398.

D'Andrea, A., Aste-Amezaga, M., Valiante, N.M., Ma, X., Kubin, M., Trinchieri, G., IL10 inhibits human lymphocyte IFN-gamma production by supressing natural killer cell stimulatory factor/IL12 synthesis in accessory cells, *J Exp Med* 178 (1993): 1041-1048.

Daeron, M., Fc receptor biology, *Annu Rev Immunol* 15 (1997): 203-234.

Dalton, D. K., Piits-Meek, S., Keshav, S., Figari, I.S., Bradley, S., Stuart, T.A., Multiple deffects of immune cell funktion in mice with disrupted interferon gamma genes, *Science* 259 (1993): 1739-1742.

Damle, N. K., Gupta, S., Heterogeneity of concanavalin A- induced suppressor T cells in man defined with monoclonal antiboies, *Clin Exp Immunol* 48 (1982): 581-588.

de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C.G., de Vries, J.E., IL10 inhibits cytokins synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL10 produced by monocytes, *J Exp Med* 174 (1991): 1209.

- Defrance, T., Aubry, J.P., Roussey, F., Arai, K., De Vries, J., Banchereau, J.**, Human recombinant IL4 induces CD23 on normal human B lymphocytes, *J Exp Med* 165 (1987): 1459-1467.
- DeMatos, P., Abdel-Wahab, Z., Vervaert, C., Hester, D., Seigler, H.**, Pulsing of dendritic cells with cell lysates from either B16 melanoma or MCA-106 fibrosarcoma yields equally effective vaccines against B16 tumors in mice, *J Surg Oncol* 68 (1998): 79-91.
- Desai, B. B., Quinn, P.M., Wolitzky, A.G., Mongini, P.K.A., Chizzonite, R., Gately, M.K.**, IL12 receptor: II. distribution and regulation of receptor expression, *J Immunol* 148 (1992): 3125-3132.
- Dhanasekaran, N., Prasad, M.V.**, G protein subunits and cell proliferation, *Biol Sign Recept* 7 (1998): 109-117.
- Dinarello, C. A., Cannon, J.G., Wolff, S.M., Bernheim, H.A., Beutler, B., Cerami, A., Figari, I.S., Palladino, M.A., O'Connor, J.V.**, Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of IL-1, *J Exp Med* 163 (1986): 1433.
- Du Bois, M. J. G., Hoismans, D.R., Schellekens, P.T.A., Eijvoogel, V.P.**, Investigation and standardization of the conditions for micro- lymphocyte cultures, *Tissue antigens* 3 (1973): 402-409.
- Elenkov, I. J., Webster, E., Papanicolaou, D.A., Fleisher, T.A., Chrousos, G.P., Wilder, R.L.**, Histamine potently suppresses human IL12 and stimulates IL10 production via H2 receptors, *J Immunol* 161 (1989): 2586-2593.
- Enbergs, H.**, Wirkung potentiierter Suis-Organpräparate und von Traumeel auf die Aktivität von Phagozyten aus dem peripheren Blut gesunder Menschlicher Probanden, *Biologische Tiermedizin*(1998): 45-49.
- Evans, R. L., Breard, J.M., Lazarus, H., Schlossman, S.F., Chess, L.**, Detection, isolation and funktional characterization of two human T- cell subclasses bearing unique differentiation antigens, *J Exp Med* 145 (1977): 221.
- Feldmann, M.**, Cell cooperation in the antibody response, In: "Immunology", *Roitt, I.M., Brostoff, J., Male, D.* Mosby, St. Louis, Baltimore, Boston, Chicago, London, Philadelphia, Sydney, Toronto (1996): 8.1-8.1.6.
- Feldmann, M.**, Cell cooperation in the antibody response, In: "Immunology", *Roitt, I.M., Brostoff, J., Male, D.*, Mosby, St. Louis, Baltimore, Boston, Chicago, London, Philadelphia, Sydney, Toronto (1996): 8.1-8.16.

Figary, I. S., Mori, M.A., Paladino, M.A., Regulation of neutrophil migration and superoxid production by recombinant tumor necrosis factors - alpha and beta: comparison to recombinant interferon-gamma and interleukine-1alpha, *Blood* 70 (1987): 979.

Fiorentino, D. F., Bond, M.W., Mosmann, T.R., Two types of mouse T helper cells IV. TH2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by TH1 clones, *J Exp Med* 170 (1989): 2081-2087.

Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R., Howard, M., O'Garra, A., IL10 inhibits cytokine produktion by activated macrophages, *J Immunol* 147 (1991): 3815.

Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K., "Pharmakologie und Toxikologie", 7. Auflage, *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, Berlin, Oxford (1996): 17; 50; 132;182;198; 219-220; 285; 326; 332; 453; 517; 518; 525; 750; 846.

Furchgott, R. F., Zawadzki, J. V, The obligatory role of the endothelium in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature* 288 (1980): 373-376.

Gabius, H.-J., Rüdiger, H., Uhlenbruck, G., "Lektine", *Spektrum der Wissenschaft* (1988): 50-60.

Gallob, J. A., Kawasaki, H., Ritz, J., Interferon- gamma and IL4 regulate T cell IL12 responsiveness through different modelation of high- affinity IL12 receptor expression, *Eur J Immunol* 27 (1997): 647-652.

Gamble, J. R., Harlan, J.M., Klebanoff, S.J., Vadas, M.A., Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor, *Proc Natl Accad Sci U S A* 82 (1985): 8667.

Garside, P., Mowat, A., Polarization of TH-cell responses: a phylogenetic consequence of non specific immune defence?, *Imm Today* 16 (1995): 220-224.

Gately, M. K., Warriier, R.R., Honasoge, S., Adminisration of recombinant IL12 to normal mice enhances cytolyt. Lymphocyte activity and induces production of IFN- gamma in vivo, *Int Immunol* 6 (1994): 157-167.

Gazzinelli, R. T., Oswald, I.P., James, S.L., Sher, A., IL10 inhibits parasite killing and nitrogen oxid production by IFN-gamma-activated macrophages, *J Immunol* 148 (1992): 1792.

Gerlier, D., Thomasset, N., Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation, *J Immunol Meth* 94 (1983): 57-63.

Gifford, R. R., Tilberg, A.F., Histamin type-2 receptor antagonists immune modulation. II. cimetidine and ranitidine increase IL2 production, *Surgery* 102 (1987): 242-247.

- Gifford, R. R., Voss, B.V., Schmidtke, J.R., Ferguson, R.R.,** Histamine type-2 receptor antagonist immune modulation. I. increased cell- mediated cytotoxicity in normal and in down-regulated systems, *Surgery* 103 (1988): 184-192.
- Glick, B., Chang, T.S., Jaap, R.G.,** The bursa of fabricius and antibody production, *Poultry Science* 35 (1956): 224.
- Gong, J., Apostolopoulos, V., Chen, D., Koido, S., Gendler, S.J., McKenzie, I.F., Kufe, D.,** Selection and characterization of MUCI-specific CD8+ T cells from MUCI transgenic mice immunized with dendritic-carcinoma fusion cells, *Immunol* 101 (2000): 316-324.
- Goodwin, J. S., Messner, R.P., Bankhurst, A.D., Peake, G.T., Saiki, J.H., Williams, R.C.,** Prostaglandin- producing suppressor cells in Hodgkine's disease, *N Engl J Med* 295 (1976): 927-936.
- Goodwin, J. S., Bankhurst, A.D., Messner, R.P.,** Suppression of human T cell mitogenesis by prostaglandin, *J Exp Med* 146 (1977): 1719-1734.
- Goodwin, J. S., Selinger, D.S., Messner, R.P., Reed, W.P.,** Effect of indomethacin in vivo an humoral and cellular immunity in humans, *Infect Immun* 19 (1978): 430-433.
- Goodwin, J. S.,** Modulation of concanavalin- A- induced suppressor cell activation by prostaglandin E2, *Cell Immunol* 49 (1980): 421-425.
- Goodwin, J. S.,** Mechanism of abtion of nonsteoridal anti- inflammatory agents, *Am J Med* 77 (1984): 7-15; 57-64.
- Goodwin, J. S., Atluru, D.,** Mechanism of action of glucocorticoid- induced immunoglobulin production: role of lipoxygenase metabolites of arachidonic acid, *J Immunol* 136 (1986): 3455-3466.
- Goodwin, J. S., Atluru, D., Sierakowski, S., Lianso, E.A.,** Mechanism of action of glucocorticosteroids. Inhibition of T cell proliferation an IL2 production by hydrocortisone is reversed by leukotriene B4, *J Clin Invest* 77 (1986): 1244-1250.
- Grewal, I. S., Xu, J., Flavell, R.A.,** Impairment of antigen- specific T cell priming in mice lacking the CD40 ligand, *Nature* 378 (1995): 617-620.
- Grewal, I. S., Xu, J., Flavell, R.A.,** The role of CD40 Ligand in costimulation and T cell activation, *Immunol Rev* 153 (1996): 85-106.

Gründel, O., Wildfang, I., Schmoll, H-J., Intratumorale Zytokintherapie, In: "Kompendium Internistische Onkologie", Schmoll, H-J., Höffken, K., Possinger, K., Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hong Kong, London, Mailand, Paris, Santa Clara, Singapur, Tokio (1997): 1881-1889.

Grunefeld, C., Palladino, M.A., Tumor necrosis factor: immunologic antitumor, metabolic and cardiovascular activities, *Adv Intern Med* 35 (1990): 45.

Gudermann, T., Schoeneberg, T., Schulz, G., Functional instructional complexity of signaltransduction via G-protein- coupled receptors, *Annu Rev Neurosci* 20 (1997): 399-427.

Hahm, K. B., Lee, S.I., Chung, J.P., Kim, J.H., Park, I.S., Comparison of immunomodulative effects of histamine- 2 receptor antagonists ingestric cancer patients: focus on the lymphoblystogenesis and cytotoxicity of peripheral blood mononuclear cells, *Int J Immunopharmacol* 16 (1994): 985-993.

Haliotis, T., Roder, J., Klein, M., Chediak-Higashi gene in humans. I. Impairment of natural killer funktion, *J Exp Med* 151 (1980): 1039-1048.

Halverson, D. C., Schwartz, G.N., Carter, C., Gress, R.E. Fowler, D.H., In vitro gereneration of allow specific human CD8+ T cells of Tc1 and Tc2 phenotype, *Blood* 90 (1997): 2089-2096.

Hanahan, D., Weinberg, R.A., The Hallmarks of Cancer, *Cell* 100 (2000): 57-70.

Haraguchi, S., Good, R.A., Day, N.K., Immunosuppressive retroviral peptides: cAMP cytokine patterns, *Imm Today* 16 (1995): 595-603.

Hart, D. N., Dendritic cells: unique leukocyte populations witch control the primary immune response, *Blood* 90 (1997): 3245-3287.

Havell, E. A., Fiers, W., North, R.J., The antitumor funktion of TNF, I. therapeutic action of TNF agains an established murine sarcoma is indirect, immunologically dependent, and limited by severe toxicity, *J Exp Med* 167 (1988): 1067.

Hayes, M. P., Wang, J., Norcross, M.A., Regulation of Interleukin 12 expression in human monocytes: selective priming by Interferon gamma of Lipopolysacharide- inducible p35 and p40 genes, *Blood* 86 (1995): 646-650.

Heinly, C. S., Sempowaski, G.D., Lee, D.M., Patel, D.D., MacDermott, P.M., Searce, R.M., Thompson, C.B., Haynes, B.F., Comparison of thymocyte development and cytikine production in CD7- deficient, CD28 - deficient and CD7/ CD28 double- deficient mice, *Int Immunol* 13 (2001): 157-166.

Herva, E., Comparison of micotitre plates with flat- bottomed and round- bottomed wells for mixed lymphocyte culture, *Acta Path Microbiol Scand Sect C* 85 (1977): 90-98.

Heufler, C., Koch, F., Stanzl, U., Topar, G., Wysocka, M., Trinchieri, G., Enk, A., Steinmann, R.M., Romani, N., Schuler, G., IL12 is produced by dendritic cells and mediates T helper I development as well as interferon-gamma production by T helper I cells, *Eur J Immunol* 26 (1996): 659-668.

Hikon, L. E., Receptors and phosphoinositide generated second messengers, *Annu Rev Biochem* 54 (1985): 205-235.

Hirschberg, T., Randazzo, B., Hirschberg, H., Effects of methylprednisolone on the in vitro induction and function of suppressor cells in man, *Scand J Immunol* 12 (1980): 33-39.

Horvath, B. V., Szalai, C., Mandi, Y., Laszlo, V., Radvany, Z., Darvas, Z., Falus, A., Histamine and histamine- receptor antagonist modify gene expression and biosynthesis of interferon gamma in peripheral human blood mononuclear cells and CD19- depleted cell subsets, *Immunol Lett* 70 (1999): 95-99.

Howard, M., Farrar, J., Hamoaka, T., Paul, W.E., Identification of a T cell derived B cell growth factor distinct from IL 2, *J Exp Med* 155 (1982): 914-923.

Hsieh, C. S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., Murphy, K.N., Developpment of TH1 CD4 T cells through IL12 produced by listeria-induced macrophages, *Science* 260 (1993): 547-549.

Huang, S., Hendriks, W., Althage, A., Hemmi, S., Bluethmann, H., Kamijo, R., Vilcek, J., Zinkernagel, R.M., Aguet, M., Immune response in mice that lack the interferon gamma receptor, *Science* 259 (1993): 1742-1745.

Ibelgaufts, H., IL4 ; IFN alpha, In: "Lexikon Zytokine", *Medikon Verlag*, München (1992): 145-147; 120-125.

International, R. B., "Neurochemicals for the neuroscientist", Catalog/ Handbook (1996): 164.

Ishiyama, M., Suiga, M., Sasamoto, K., Mizoguchi, M., He, P.-G., A new sulfonated terazolium salt that produces a highly water- soluble formazan dye, *Chem Pahrn Bul* 41 (1993): 1118-1122.

Izenwasser, S., Cote, T.E., Inhibition of adenylyl cyclase activity by a homogenous population of dopamin receptors: selective blockade by antisera directed against Gi1 and / or Gi2, *J Neurochem* 64 (1995): 1614-1621.

Jacobs, R. Veränderungen von NK-Zellen beim Menschen - Physiologie und Pathologie. *Hannover, Medizinische Hochschule, Dissertation* (1993).

Jacobsen, S. E. W., Veiby, O.P., Smeland, E.B., Cytotoxic lymphocyte maturation factor (IL12) is a synergistic growth factor for hematopoietic stem cells, *J Exp Med* 178 (1993): 413-418.

James, N. D., Sikora, K., Immunotherapy of Tumors, In: "Encyclopedia of Immunology", San Diego, London (1998): 1359-1364.

Jelinek, D. F., Braaten, J.K., Role of IL 12 in human B lymphocyte proliferation and differentiation, *J Immunol* 154 (1995): 1606-1613.

Jorgensen, F., Lamm, L.U., MLC- a micro- modification of the mixed leucocyte culture technique, *Tissue Antigens* 4 (1974): 482-494.

Kadowski, N., Antonenko, S., Ho, S., Rissoan, M.C., Soumelis, V., Porcelli, S.A., Lanier, L.L., Liu, Y.J., Distinct cytokine profiles of neonatal natural killer T cells after expansion with subsets of dendritic cells, *J Exp Med* 193 (2001): 1221-1226.

Kägi, D., Ledermann, B., Zinkernagel, R.M., Cytotoxicity mediated by T cells, *Eur J Immunol* 24 (1994): 3068-3077.

Kalinichenko, V. V., Mokyr, M.B., Graf, L.H., Cohen, R.L., Chambers, D.A., Norepinephrine- mediated inhibition of antitumor cytotoxic T lymphocyte generation involves a beta- adrenergic receptor mechanism and decreased TNF- alpha gene expression, *J Immunol* 163 (1999): 2492-2499.

Kang, K., Kubin, M., Cooper, K.K., Lessin, S.R., Trinchieri, G., Rook, A.H., IL12 synthesis by human Langerhans cells, *J Immunol* 156 (1996): 1402-1407.

Kärre, K., Role of target histocompatibility antigens in regulation of natural killer activity: a reevaluation and a hypothesis in: Hebermann RB, Callewaert DM, Hrsg. Mechanisms of cytotoxicity by NK cells. *Academic Press Inc.* Orlando (1985): 81-92.

Kärre, K., How to recognize a foreign submarine, *Immunol Rev* 155 (1997): 5-9.

Keller, R., Zytokine, In: "Immunologie und Immunopathologie", Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1994) 53-86.

Keller, U., Aman, M.J., Derigs, D., Huber, C., Peschel, C., Human IL4 enhances stromal cell- dependant hematopoiesis: Costimulation with stem cell factor, *Blood* 84 (1994): 2189-2196.

- Kelly, M. D., King, J., Cherian, M., Dwerryhouse, S.J., Finlay, I.G., Adams, W.J., King, D.W., Lubowski, D.Z., Morris, D.L.**, Randomized trial of preoperative cimetidine in patients with colorectal carcinoma with quantitative assessment of tumor-associated lymphocytes, *Cancer* 85 (1999): 1658-1663.
- Kelso, A.**, TH1 and TH2 subsets: paradigms lost?, *Imm Today* 16 (1995): 374-380.
- Kendall, A., Smith, M.**, Interleukin 2, *Ann Rev Immunol* 2 (1984): 319-333.
- Kim, S.**, NK cell granule exocytosis and cytokine production inhibited by ly-49A engagement, *Cell Immunol* 183 (1998): 106-112.
- Kinzler, K. W., Vogelstein, B.**, Lessons from hereditary colorectal cancer, *Cell* 87 (1996): 159-170.
- Kirmidjiaan-Schumacher, L., Roi, M., Wishe, H.I., Cohen, M.W., Stotzky, G.**, Selenium and immune cell functions I. effect on lymphocyte proliferation and production of IL1 and IL2, *Proc Soc Exp Biol Med* 193 (1990): 136-142.
- Kirmidjiaan-Schumacher, L., Roi, M., Wishe, H.I., Cohen, M.W., Stotzky, G.**, Supplementation with selenium and human immune cell functions II. effect on cytotoxic lymphocytes and natural killer cells, *Biol Trace Elem Res* 41 (1994): 115-127.
- Kitani, A., Fuss, I.J., Nakamura, K., Schwarz, O.M., Usui, T., Strober, W.**, Treatment of experimental (trinitrobenzenesulfonic acid) intranasal administration of transforming growth factor (TGF)- beta1 plasmid: TGF- beta1 mediated suppression of cell type1 response occurs by IL10 induction IL12 receptor beta2 chain downregulation, *J Exp Med* 192 (2000): 41-52.
- Klebanoff, S. J., Vadas, M.A., Harlan, J.M., Sparks, L.H., Gamble, J.R., Agosti, J.M., Walterdorff, A.M.**, Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor, *J Immunol* 136 (1986): 4220.
- Klein, J.**, Lektine, In: "Immunologie Kapitel 11: Antigene und andere Lymphozyten aktivierende Substanzen", VCH Verlagsgesellschaft (1991): 301-304.
- Knight, S. C.**, Control of lymphocyte stimulation in vitro: help and suppression in the light of lymphoid population dynamics, *J Immunol Meth* 50 (1982): R51-R63.
- Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R.M., Clark, S.C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B., Trinchieri, G.**, Identification and purification of natural killer cell stimulation factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes, *J Exp Med* 170 (1989): 827-845.

Köhler, G., Milstein, C., Continuous culture of fused cell secreting antibody of predefined specificity, *Nature* 256 (1975): 495.

Körholz, D., Banning, U., Bönig, H., Grewe, M., Schneider, N., Mauz-Körholz, C., Klein-Vehne, A., Krutmann, J., Burdach, S., The role of IL10 in IL15 mediated T cell responses, *Blood* 90 (1997): 4513-4520.

Krakauer, T., Inhibition of toxic shock syndrome toxin-1-induced cytokine production and T cell activation by IL10, IL4 and dexametasone, *J Infect Dis* 172 (1995): 988.

Kroegel, C., Costabel, U., Immune functions of constitutive pulmonary cells: the salt in the soup [editorial;comment], *Eur Respir J* 7 (1994): 2106.

Kugler, A., Stuhler, G., Walden, P., Zöllner, G., Zobywalski, A., Brossart, P., Trefzer, U., Ullrich, S., Müller, C., Becker, V., Gross, A.J., Hermmmerlein, B., Kanz, L., Müller, G.A., Ringert, R-H., Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids, *Nature Med* 6 (2000): 332-336.

Kuhn, L., Coutoudis, A., Moodley, D., Mungqudaniso, N., Trabattoni, D., Shearer, G.M., Clerici, M., Cooradia, H.M., Interferon gamma and Interleukin 10 production among HIV-1-infected and uninfected infants of HIV-1-infected mothers, *Pediatr Res* 50 (2001): 412-416.

Lanier, L. L., Le, A.M., Phillips, J.H., Warner, N.L., Babcock, G.F., Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the leu-7 (HNK-1) and leu-11 (NK-15) antigens, *J Immunol* 131 (1983): 1789-1796.

Lanier, L. L., NK cell receptors, *Annu Rev Immunol* 16 (1998): 359-393.

Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Genetic instabilities in human cancers, *Nature* 396 (1998): 643-649.

Leskovar, P., Neue Modellvorstellungen zu einigen Kernfragen der Immunologie unter besonderer Berücksichtigung der Tumorummunologie, *Dtsch Zschr Onkol* 22 (1990): 1-9.

Leskovar, P., Spielt die anhaltende immunsuppressive Lage nicht nur bei der Turorentwicklung, sondern auch bei der Auslösung von autoimmunen und allergischen Erkrankungen eine kausalgenetische Rolle? Teil 1, *Dtsch Zschr Onkol* 23 (1991): 125-131.

Leskovar, P., Spielt die anhaltende immunsuppressive Lage nicht nur bei der Turorentwicklung, sondern auch bei der Auslösung von autoimmunen und allergischen Erkrankungen eine kausalgenetische Rolle? Teil 2, *Dtsch Zschr Onkol* 23 (1991): 215-221.

Leskovar, P., Down- regulation of immune response by overstimulated T cells and/or hyperactivated monocytes/macrophages and 1st reversal by "filtering-out" of the non-specific signals, *Dtsch Zschr Onkol* 25 (1993): 137-138.

Leskovar, P., Verbesserte Knochenmarks-Transplantation eröffnet neue Möglichkeiten der Tumorthherapie, *Dtsch Zschr Onkol* 25 (1993): 77-82.

Leskovar, P., Hyperaktivierter Zustand von immunkompetenten Zellen (Makrophagen, T-Zellen): Molekularbiologische und zellphysiologische Hintergrund, *Dtsch Zschr Onkol* 26 (1994): 41-46.

Leskovar, P., Downregulation of overstimulated, anergic lymphocytes (T cells, monocytes/macrophages) resulted in tumor shrinkage and disappearance of metastases, *Dtsch Zschr Onkol* 27 (1995): 46-49.

Leskovar, P., Bielmeier, J., Treatment of solid tumors should obligatorily be combined with the in vivo codepletion of tumor- protecting, CD8+/HLA-DR+ suppressor T cells by alloreactive donor T cells whose preprogrammed cell death allows a high GvL-effect before GvHD can be established, *Eur J Physiol* 431 (1996): 229-230.

Levy, J. A., Humoral and cell mediated immune responses to HIV infection. HIV and the pathogenesis of AIDS, In: "ASM Press", Washington (1994): 153-180.

Lis, H., Sharon, N., Lectins, In: "Encyclopedia of Immunology", Roitt, I.M., Delves, P.J. (1992): 952-956.

Liu, Y. U., Kadowaki, N., Rissoan, M.C., Soumelis, V., T cell activation and polarisation by DC1 and DC2, *Curr Top Microbiol Immunol* 251 (2000): 149-159.

Löffler, G., Hormonwirkung über Wechselwirkung mit der Zellmembran, In: "Physiologische Chemie", Löffler, G., Petrides, P.E., Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokio (1988): 651-652.

Löffler, G., Hormonwirkung über Wechselwirkung mit der Zellmembran, In: "Physiologische Chemie", Löffler, G., Petrides, P.E., Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokio (1988): 648-650.

Löffler, G., Intermediärstoffwechsel III: Lipide, In: "Physiologische Chemie", Löffler, G., Petrides, P.E., Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokio (1988): 408-410.

Long, E. O., Wagtmann, N., Natural killer cell receptors, *Curr Opin Immunol* 9 (1997): 344-350.

Long, E. O., Regulation of immune responses through inhibitory receptors, *Annu Rev Immunol* 17 (1999): 875-904.

Lucey, D. R., Clerici, M., Shearer, G.M., Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic and inflammatory diseases, *Clin Microbiol Rev* 9 (1996): 532-562.

Ludviksson, B. R., Segers, D., Resnick, A.S., Strober, W., The effect of TGF- beta1 on immune responses of naive vers memory CD4+ TH1/ TH2 T cells, *Eur J Immunol* 30 (2000): 2101-2111.

Lüllmann, H., Mohr, K., Ziegler, A., Arzneistoff-Rezeptor- Interaktion, In: "Taschenatlass der Pharmakologie", Lüllmann, H., Mohr, K., Ziegler, A., Stuttgart, New York (1994): 63-64.

Lydart, P., Grossi, C., Cells involved in the immune responses, In: "Immunology", Mosby, St. Louis, Baltimore, Boston, Chicago, London, Philadelphia, Sydney, Toronto, (1993): 2.2-.2.20.

Manetti, R., parronchi, P., Giuditi, M.G., Piccinni, M.P., Maggi, E., Trinchieri, G., Romagni, S., Natural killer cell stimulatory factor (IL12) induces T helper type 1 (TH1)-specific immune responses and inhibits the development of IL4 producing TH cells, *J Exp Med* 177 (1993): 1199-1204.

Mannel, D. N., Moore, R.N., Mergenhagen, S.E., Macrophages as a source of tumoricidal activity (tomur-necrotizing factor), *Infect Immun* 30 (1980): 523.

Martino, G., Filippi, M., Martinelli, V., Brambilla, E., Comi, G., Grimaldi, L.M., Clinical and radiologic correlates of a novel T lymphocyte gamma interferon- activated CA2+ influx in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis, *Neurol* 46 (1996): 1416-1421.

Mayodormo, J. L., Zorina, T., Storkus, W.J., Zitvogel, L., Celluzzi, C., Falo, L.D., Melief, C.J., Ildstad, S.T., Kast, W.M., Deleo, A.B., Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synergic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity, *Nat Med* 1 (1995): 1297-1302.

Minami, Y., Kono, T., Miyazaki, T., Taniguchi, T., The IL2 receptor complex: its structure, function and targets genes, *Annu Rev Immunol* 11 (1993): 245-258.

Mishell, B. B., Shiige, N., "Selected methods in cellular immunology", Freeman and Company, U S A (1980) 14-17; 128-137; 461-462.

Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegava, S., Papaioannou, V.E., RAG-1 difficient mice have no mature B and T lymphocytes, *Cell* 68 (1995): 869-877.

Mookkerjee, B. K., Influence of separation techniques on the distribution and function of lymphocyte subpopulations, *Transplant* 22 (1976): 101-107.

- Moore, K. W., O'Garra, A., de Waal Malefyt, R., Viera, P., Mosmann, T.R.**, IL10, *Annu Rev Immunol* 11 (1993): 165-190.
- Morgan, D. A., Ruscetti, F.B., Gallo, R.C.**, Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows, *Science* 193 (1976): 1007-1008.
- Mosmann, T.**, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Meth* 65 (1983): 55-63.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H.M., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L.**, Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins, *J Immunol* 136 (1986): 2348-2357.
- Mosmann, T. R., Coffman, R.L.**, TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties, *Ann Rev Immunol* 7 (1989): 145-173.
- Mosmann, T. R.**, Properties and functions of IL10, *Adv Immunol* 56 (1994): 1.
- Mosmann, T. R., Sad, S.**, The expanding universe of T cell subsets: TH1, TH2 and more, *Immunol Today* 17 (1996): 138-146.
- Mosmann, T. R. C., R.L.**, Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells, *Adv Immunol* 46 (1989): 111-147.
- Munakata, Y., Umezawa, Y., Iwata, S., Dong, R.P., Yoshida, S., Ishii, T., Morimoto, C.**, Specific inhibition of TH2- type cytokine production from human peripheral T cells by terfenadine in vitro, *Clin Exp Allergy* 29 (1999): 1281-1286.
- Murphy, W. J., Reynolds, C.W., Tiberghien, P., Longo, D.L.**, Natural killer cells and bone marrow transplantation, *J Nat Can Inst* 85 (1993): 1475-1482.
- Murray, D. R., Irwin, M., Rearden, C.A., Ziegler, M., Motulsky, H., Maisel, A.S.**, Sympathetic and immune interactions during dynamic exercise. Mediation via a beta- 2- adrenergic- dependant mechanism, *Circulation* 86 (1992): 205-213.
- Nadeau, R. R., Ostrowski, C., Ni-Wu, G., Liberato, D.J.**, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human IL12 in male rhesus monkeys, *J Pharma A Exp Therap* 274 (1995): 78-83.
- Nakajima, I., Chu, T.M.**, Synergistic antitumor activity of IL2 and cimetidine against syngeneic murine tumor, *Cancer Immunol Immunother* 33 (1991): 9-14.

- Noelle, R., Krammer, P.K., OHarra, J., Uhr, J.W., Vittete, E.S.**, Increased expression of Ia antigens on resting B cells: an additional role for B cell growth factor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 (1984): 6149-6153.
- North, R. J., Havell, E.A.**, The antitumor function of TNF: II. analysis of the role of endogenous TNF in endotoxin-induced hemorrhagic necrosis and regression of an established sarcoma, *J Exp Med* 167 (1988): 1086.
- Novak, T. J., Rothenberg, E.V.**, cAMP inhibits induction of IL2 but not of IL4 in T cells, *Proc Nat Acad Sci U S A* 87 (1990): 9353-9357.
- Old, L. J.**, Tumor necrosis factor (TNF), *Science* 230 (1985): 630.
- Onsrud, M., Thorsby, E.**, Radiosensitivity of non-primed and primed human T cells in vitro, *Int Archs Allergy Appl Immun* 62 (1980): 370-381.
- Onsrud, M.**, Influence of in vivo hydrocortisone on some human blood leucocyte subpopulations II effects on T cell - monocyte cooperation, *Acta Path Microbiol Scand Sect C* 89 (1981): 321-327.
- Onsrud, M.**, Depressed in vitro lymphoproliferation after radiation therapy, *Acta Radiol Oncol* 22 (1983): 61-64.
- Oppenheim, J. J., Feldmann, M.**, "Volume 1: Ligands, Volume 2: Receptors", Academic Press (2001): 65-69.
- Pala, P., Hussel, T., Openshaw, P.J.**, Flow cytometric measurement of intracellular cytokines, *J Immunol Methods* 243 (2000): 107-124.
- Paludan, S. R.**, Interleukin-4 and Interferon-gamma: the quintessence of a mutual antagonistic relationship, *Scand J Immunol* 48 (1998): 459-468.
- Parham, P.**, NK cells, MHC class I antigens and missing self, *Immunol Rev* 155 (1997): 5-221.
- Paul, J.**, "Zell- und Gewebekulturen", Übers. und bearb. von Sigrid Maurer und Reiner Maurerde Gruyter, Berlin, New York, 1979, 311-314; 347-348; 350-352.
- Pauling, L.**, A theory of the structure and process of formation of antibodies, *J Am Chem Soc* 62 (1940): 2643.

Paull, K. D., Shoemaker, R.H., Boyd, M.R., Parsons, J.L., Risbood, P.A., Barbera, W.A., Sharma, M.N., Baker, D., Hand, E., Scudiero, D.A., Monks, A., Grote, M., The synthesis of XTT: a new tetrazolium reagent bio-reducible to a water-soluble formazan, *J Hetero Cyclic Chem*(1988): 315-319.

Penn, N. D., Purkins, L., Kelleher, J., Heatley, R.V., Mascie-Taylor, B.H., Belfield, P.W., The effect of dietary supplementation with vitamins A, C and E on cell-mediated immune function in elderly long-stay patients: a randomized controlled trial, *Age and ageing* 20 (1991): 169-174.

Perrit, D., Robertson, S., Grie, G., Showe, L. Aste-Ameyaga, M., Trinchieri, G., Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets, *J Immunol* 161 (1998): 5824-5824.

Perussia, B., Starr, S., Abraham, S., Funning, V., Trinchieri, G., Human natural killer cells analysed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. I. Characterization of the lymphocyte subset reactive with B73.1, *J Immunol* 130 (1983): 2133-2141.

Philip, R., Epstein, L.B., Tumor necrosis factor is immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, gamma-interferon and interleukin 1, *Nature* 323 (1986): 86.

Ramer-Quinn, D. S., Baker, R.A., Sanders, V.M., Activated T helper 1 and T helper 2 cells differentially express the beta-2-adrenergic receptor, *J Immunol* 159 (1997): 4857-4867.

Reinhardt, G., Seidel, H.J., Sonntag, H.G., Gaus, W., Hingst, V., Mattern, R., "Ökologisches Stoffgebiet", 2. Auflage, Hippokrates Verlag, Stuttgart (1995): 169.

Reyburs, H., Mandelboim, O., Vales-Gomez, M., Sheu, E.G., Pazmany, L., Davis, D., Strominger, J.L., Human NK cells: their ligands, receptors and functions, *Immunol Rev* 155 (1997): 119-125.

Rezai, A. R., Salazar-Gonzalez, J.F., Martinez-Maza, O., Bramhall, J., Afrasiabi, R., Karmani-Arab, V., Histamine blocks IL2 gene expression and regulates IL2 receptor expression, *Immunopharmacol Immunotoxicol* 12 (1990): 345-346.

Ricci, M., IL4: a key cytokine in atopy, *Clin Exp Allergy* 24 (1994): 801-812.

Ridge, J. P., DiRosa, F., Matzinger, P., A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell, *Nature* 393 (1989): 474-477.

Rixen, D., Livingston, D.H., Loder, P., Denny, T.N., Ranitidine improves lymphocyte function after severe head injury: results of a randomized double-blind study, *Crit Care Med* 24 (1996): 1787-1792.

- Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Amigorena, S.,** Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells, *Nat Cell Biol* 1 (1999): 362-368.
- Roehm, N. W., Rodgers, G.H., Hatfield, S.M., Glasebrook, A.L.,** An improved calorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT, *J Immunol Meth* 142 (1991): 257-265.
- Roitt, I. M.:** Leitfaden der Immunologie, 4. Auflage, Berlin: Blackwell Wissenschaft (1993): 18-33, 117-130
- Rojas, R., Roman, J., Torres, A., Ramirez, R., Carracedo, J., Lapez, R., Garcia, J.M., Martin, C., Pintado, O.,** Inhibition of apoptotic cell death in B- CLL by interferon gamma correlates with clinical stage, *Leucemia* 10 (1996): 1782-1788.
- Romagnani, S., Maggi, E., Del Prete, G.,** An alternative view of the TH1/ TH2 switch hypothesis in HIV infection, *AIDS Res Hum Retroviruses* 10 (1994): III-IX.
- Romagnani, S.,** TH1 and TH2 in human diseases, *Clin Immunol Immunopathol* 80 (1996): 225-235.
- Romagnani, S.,** T cell subsets (TH1 versus TH 2), *Ann Allergy Asthma Immunol* 85 (2000): 9-18.
- Romani, L., Menacci, A., Tonnetti, L., Speaccapelo, R., Cenci, E., Puccetti, P., Wolf, S.F., Bistoni, F.,** IL12 is both required and prognostic in vivo for T helper type 1 differentiation in murine candidiasis, *J Immunol* 152 (1994): 5167-5172.
- Roudebush, R. E., Berry, P.L., Layman, N.K., Butler, L.D., Bryant, H.U.,** Dissociation of immunosuppression by chlorbromazine and trifluoperazine from pharmacologic activities as dopamin antagonists, *Int J Immunopharmacol* 13 (1991): 961-968.
- Rousset, F., Garcia, E., Defrance, T., Peronne, C., Vezzio, N., Hsu, H., Kastelein, R., Moore, K.W., Banchereau, J.,** IL10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992): 1890.
- Ruggeri, L., Capanni, M., Casucci, M., Vorlpi, I., Tosti, A., Perruccio, A., Urbani, E., Negrin, R.S., Martelli, M.F., Velardi, A.,** Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation, *Blood* 94 (1999): 333-339.
- Sabbe, L. J. M., DeBode, L., VanRood, J.J.,** Analysis of variability in lymphocyte transformation tests, *J Immunol Meth* 57 (1983): 21-32.

- Saksela, E., Timun, T., Ranki, A., Hayry, P.**, Morphological and funktional characterization of isolated effector cells responsible for human natural killer activity to fetal fibroblasts and to cultured cell line targets, *Immunol Rev* 155 (1979): 175-182.
- Sanders, V. M.**, The role of norepinephrine and beta-2 adrenergic receptor stimulation in the modulation of TH1, TH2 and B lymphocyte function, *Adv Exp Med Biol* 437 (1989): 269-278.
- Santamrogio, L., Lipartiti, M., Bruni, A., DalToso, R.**, Dopamine receptors on human T- and B- lymphocytes, *J Neuroimmunol* 45 (1993): 113-119.
- Sato, T., Deiwick, A., Raddatz, G., Koyama, K., Schlitt, H.J.**, Interactions of allogeneic human mononuclear cells in two-way mixed leucocyte culture: influence of cell numbers, subpopulations and cyclosporin, *Clin Exp Immunol* 13 (1999): 344-351.
- Scharton-Kersten, T. M., Sher, A.**, Role of natural killer cells in innate resistance to protozoan, infections, *Curr Opin Immunol* 9 (1997): 44-51.
- Scheurich, P., Thoma, B., Ucer, U., Pfizenmaier, K.**, Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor- alpha: induction of TNF receptors on human T cells and TNF- alpha- mediated enhancement of T cell responses, *J Immunol* 138 (1987): 1786.
- Schultz, R. M., Kleinschmidt, W.**, Functional identity between murine interferon and macrophag activating factor, *Nature* 305 (1983): 239-240.
- Scott, P., Trinchieri, G.**, The role of natural killer cells in host-parasite interactions, *Curr Opin Immunol* 7 (1995): 34-40.
- Seder, R. A., Gazzinelli, R., Sher, A., Paul, W.E.**, IL12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for gamma interferon production and diminishes IL4 inhibition of such priming, *Proc Nat Acad Sci U S A* 90 (1993): 10188-10192.
- Shahiniam, A., Pfeffer, K., Lee, K.P., Kundik, T.M., Kishihara, K., Wakeham, A., Kawai, K., Ohashi, P.S., Thompson, C.B., Mac, T.W.**, Differential T cell costimulatory requirements in CD28 deficient mice, *Science* 261 (1993): 609-612.
- Shibata, M., Hoon, D., Okun, E., Morton, D.**, Modualtion of histamine type 2 receptors on the CD8+ T cells by IL2 and cimetidine, *Int Archs Allergy Appl Immun* 1997 (1992): 8-16.
- Shinkai, Y., Rathbon, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Stall, A.M., Alt, F.W.**, RAG-2 difficient mice lack nature lymphocytes owing to inability to inicieate V(D), *J Rearrangement Cell* 68 (1992): 855-867.

Siefener, A., Untersuchungen über den Einfluss von bestimmten Suis-Organpräparaten in homöopathischen Zubereitungen auf die Aktivität von Lymphozytenkulturen des Menschen, *Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn, Dissertation* (1994).

Sigma, D. T. S., "Produktinformation zu Accuspin-System-Histopaque -1077", Sigma, St.Louis (1994): 1E-2E.

Silberstein, D. S., Owen, W.F., Gasson, J.C., DiPersio, J.F., Golde, D.W., Bina, J.C., Sobermann, R., Austen, K.F., David, J.R., Enhancement of human eosinophil cytotoxicity and leukotriene synthesis by biosynthetik (recombinant) granulocyte- macrophag colony- stimulating factor, *J Immunol* 137 (1986): 3290.

Skalhegg, B. S., Landmark, B.F., Doskeland, S.O., cAMP- dependent protein kinase type 1 mediates the inhibitory effects of cAMP on cell replication in human T lymphocytes, *J Biol Chem* 267 (1992): 15707-15714.

Skalhegg, B. S., Tasken, K., Specificity in the cAMP/ PKA signaling path way. Differential expression, regulation and subcellular localization of subunits of PKA, *Front Biosci* 1 (1997): 331-342.

Slater, T. F., Sawyer, U., Strauli, O., Studies on succinate- tetrazolium reductase systems. III points of coupling of four different tetrazolium salts, *Biochem Biophys Acta* 77 (1963): 383.

Smith, H. R. C., Chuang, H.H., Wang, L.L., Salcedo, M., Heusel, J.W., Yokoyama, W.M., Nonstochastic coexpression of activation receptors on murine natural killer cells, *J Exp Med* 191 (2000): 1341-1354.

Snapper, C. M., Paul, W.E., Interferon gamma and B cell stimulatory factor- 1 reciprocally regulate Ig isotype production, *Science* 236 (1987): 944-947.

Snapper, C. M., Peschel, C., Paul, W.E., Interferon gamma stimulates IgG2a secretion by murine B cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide, *J Immunol* 140 (1988): 2121-2127.

Snijders, A., Hilkens, C.M.U., van der Pouw Kraan T.C.T.M., Engel, M., Aarden, L.A., Kapsenberg, M.L., Regulation of bioactive IL-12 production in lipopolisaccharide-stimulated human monocytes is determined by the expression of the p35 subunit, *J Immunol* 156 (1996): 1207-1212.

Spitz, H., Lanier, L.L., Phillips, J.H., Development of human T and natural killer cells, *Blood* 85 (1995): 2654-2670.

Stam, W. B., van Oosterhout, A.J.M., Nijkamp, A., Pharmacologic modulation of TH1- and TH2 associated lymphokine production, *Life sciences* 53 (1993): 1921-1934.

Steinmann, R. m., The dendritic cell system and its role in immunogenicity, *Annu Rev Immunol* 9 (1991): 271-296.

Steinmann, R. M., Cohn, Z.A., Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution, *J Exp Med* 137 (1973): 351-354.

Stern, A. S., Podlaski, F.J., Hulmes, J.D., Pan, Y.C.E., Quinn, P.M., Wolitzky, A.G., Familletti, P.C., Stremlo, D.L., Truitt, T., Chizzonite, R., Gately, M.K., Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells, *Proc Nat Acad Sci U S A* 87 (1990): 6808-6812.

Stryer, L., "Kohlenhydrate", Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg, (1990): 345-363.

Sullivan, J. L., Bryan, K.S., Brewster, F.E., Purtilo, D.T., Deficient natural killer cell activity in x-linked lymphoproliferative syndrome, *Science* 210 (1980): 543-545.

Swain, S. L., Weinberg, A.D., English, M., Huston, G., IL4 directs the development of TH2-like helper effectors, *J Immunol* 145 (1990): 3796-3806.

Szondy, Z., Newsholme, E.A., The effect of various concentrations of nucleobases, nucleosides or glutamin on the incorporation of (H3) thymidine into DNA in rat mesenteric lymph node lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin, *Biochem J* 270 (1990): 437-440.

Tao, X., Constant, S., Jorritsma, P., Bottomly, K., Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for TH1 and TH2 CD4+ T cell differentiation, *J Immunol* 159 (1997): 5956-5963.

Thomsen, M., Hansen, G.S., Svejgaard, A., Jersild, C., Hansen, J.A., Good, R.A., Dupont, B., Mixed lymphocyte culture technique, *Tissue Antigens* 4 (1974): 495-506.

Thorsby, E., Bois, R.D., Bondevik, H., Dupont, B., Eijvoogel, V., Hansen, J.A., Jersild, C., Jorgensen, F., Kissmeyer-Nielsen, F., Lamm, L.U., Schellekens, P.T.A., Syvejgaard, A., Thomsen, M., Joint report for a mixed lymphocyte culture workshop, *Tissue antigens* 4 (1974): 507-525.

Townsend, A. B., H., Antigen recognition by class 1 - restricted T lymphocytes, *Ann Rev Immunol* 7 (1989): 601-624.

Tracey, K. J., Cerami, A., Tumor necrosis factor, other cytokines and disease, *Annu Rev Cell Biol* 9 (1993): 317.

Trefzer, U., Weingart, G., Chen, Y., Herberth, G., Adrian, K., Winter, H., Audring, H., Guo, Y., Sterry, W., Walden, P., Hybrid cell vaccination for cancer immune therapy: First clinical trial with metastatic melanoma, *Int J Cancer* 85 (2000): 618-626.

Trinchieri, G., Biology of natural killer cells, *Adv Immunol* 47 (1989): 187-376.

Trinchieri, G., Producer cells of Interleukin 12; Interleukin 12 and its role in the generation of TH1 cells, *Immunol Today* 14 (1993): 237-238; 335-337.

Trinchieri, G., Interleukine 12: a cytokine produced by antigen-presenting cells immunoregulatory functions in the generation of T helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes, *Blood* 84 (1994): 4008-4027.

Ullum, H., Cozzi Lepri, A., Bendtzen, K., Victor, J., Gotzsche, P.C., Phillips, A.N., Skinhoj, P., Klarlund Pedersen, B., Low production of interferon gamma is related to disease progression in HIV infection: evidence from a cohort of 347 HIV infected individuals, *AIDS Res Hum Retroviruses* 13 (1997): 1039-1046.

Unanue, E. R., Inter-relationship among macrophages, natural killer cells and neutrophils in early stages of listeria resistance, *Curr Opin Immunol* 9 (1997): 35-43.

Valez-Gomez, N., Reyburn, H., Strominger, J., Interaction between the human Nk receptors and their ligands, *Crit Rev Immunol* 20 (2000a): 223-244.

Valez-Gomez, N., Reyburn, H., Strominger, J., Molecular analysis of the interactions between human NK receptors and their HLA ligands, *Hum Immunol* 61 (2000b): 28-38.

Van Voorhis, W. C., Barret, L.K., Cosgrove Sweeney, J.T., Kuo, C.C., Patton, D.L., Analysis of lymphocyte phenotype and cytokine activity in inflammatory infiltrates of the upper genital tract of female macaques infected with chlamydia trachomatis, *J Infect Dis* 174 (1996): 647-650.

Vistica, D. T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A., Boid, M.R., Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production, *Cancer Research* 51 (1991): 2515-2520.

Wallace, C., Keast, D., Glutamin and macrophage function, *Metabolism* 41 (1992): 1016-1020.

Warren, H. S., Kinnear, B.F., Phillips, J.H., Lanier, L.L., Production of IL5 by human NK cells and regulation of IL-5 secretion by IL-4, IL-10 and IL-12, *J Immunol* 154 (1995): 5144-5152.

Wheelock, F. F., Interferon-like virus-inhibitor induced in human leucocytes by phytohemagglutinin, *Science* 149 (1965): 310-311.

Whiteside, T. L., Herberman, R.B., The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer, *Curr Opin Immunol* 7 (1995): 704-710.

Witte, T., Heterogenität von NK-Zellen in der menschlichen Milz. Hannover, *Medizinische Hochschule, Dissertation* (1989) .

Wu, C., Warriar, R.R., Wang, X., Presky, D.K., Gately, K., Regulation of IL12 receptor beta1 chain expression and IL12 binding to human peripheral blood mononuclear cells, *Eur J Immunol* 27 (1997): 147-154.

Wyllie, A., Donahue, V., Fischer, B., Hill, D., Keeseey, J., Manzow, S., Methods for studying cell proliferation and viability in cell populations, In: "Apoptosis and cell proliferation", Boehringer GmbH, Biochemica, Mannheim (1989) 70-85.

Young, H. A., Hardy, K.J., Role of interferon gamma in immune cell regulation, *J Leuc Biol* 58 (1995): 373-381.

Ziegler-Heitbrock, H. W., The biology of the monocyte system, *Eur J Cell Biol* 49 (1989): 1.

Zuo, X. J., Jordan, S.C., Wilkinson, A., Danovitch, G.M., Barba, L., Schwieger, J., Nast, C.C., IL12 mRNA levels in renal allograft fine-needle aspirates do not correlate with acute transplant rejection, *Transplant* 60 (1995): 1360-1362.

Danksagung

Herrn Univ. Prof. Dr. med. R. Hartung danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Möglichkeit, den experimentellen Teil meiner Doktorarbeit im Urologischen Forschungslabor seiner Klinik durchführen zu dürfen.

Herrn Dr. Leskovar danke ich vielmals für die unermüdliche Betreuung und Unterstützung während der Durchführung der Arbeit. Seine Faszination an wissenschaftlichen Details und Freude an der Forschung hat mich tief beeindruckt und meinen Weg als Arzt wesentlich beeinflusst.

Meinen Mitdoktoranden sage ich vielen Dank für die stets angenehme und kollegiale Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des urologischen Forschungslabors für ihre ständige Hilfestellung während der experimentellen Arbeit.

Vor allem richtet sich mein Dank an meine Eltern, meine Oma und meine Geschwister, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Mein besonderer Dank richtet sich an meine Freundin Luise für ihre tatkräftige Unterstützung, sowie an ihre Familie.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Maximilian Alexander Graw
Geburtsdatum: 26. August 1976
Geburtsort: Ostfildern-Ruit (Baden-Württemberg)
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Assistenzarzt:

Seit 12/05
10/04 – 11/05
Abteilung für Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Agatharied
Abteilung für Innere Medizin; Rotkreuzkrankenhaus München

Arzt im Praktikum

07/03 – 09/04
Allgemeinchirurgische Abteilung; Krankenhaus Dritter Orden

Studium:

04/03
04/02 – 03/03
03/02
09/00 – 07/01
03/99
11/96
Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Praktisches Jahr
1. Terial: Pädiatrie, Haunersches Kinderspital
2. Terial: Chirurgie, Städtisches Krankenhaus Neuperlach
3. Terial: Innere Medizin, Klinikum Großhadern
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Auslandsstudium an der Universitat Autònoma de Barcelona
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Wehrdienst:

10/95 – 07/96
Jagdbombergeschwader 34, Memmingen

Schulbildung:

06/95
09/86 – 06/95
09/82 – 07/86
Allgemeine Hochschulreife
Robert-Bosch-Gymnasium Wendlingen/Neckar
Grundschule Oberboihingen

