

Aus dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. H. Kirchner

**Funktionelle Untersuchungen zur immunsuppressiven und
antiinflammatorischen Wirkung von Sanglifehrin A im
Vollblutstimulationstest**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von

Peter Iblher
aus Neumünster

Lübeck 2006

1. Berichterstatter/ Berichterstatterin:

Privatdozent Dr. med. habil. Michael Müller-Steinhardt

2. Berichterstatter/ Berichterstatterin:

Professor Dr. med. Lutz Fricke

Tag der mündlichen Prüfung: 04. Oktober 2006

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 04. Oktober 2006

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Die Immunabwehr	1
1.2. Aktivierung und Effektorfunktionen von Immunzellen	2
1.3. Zytokine als Marker der Immun-Zell-Funktion	6
1.4. T-Zell-Proliferation	10
1.5. Immunsuppression	11
1.5.1. Etablierte Immunsuppressiva	12
1.5.1.1. Glukokortikoide	12
1.5.1.2. Azathioprin	13
1.5.1.3. Mycophenolat Mofetil (MMF)	13
1.5.1.4. Cyclosporin A (CsA)	13
1.5.1.5. Tacrolimus (FK506)	14
1.5.1.6. Rapamycin	15
1.5.2. Sanglifehrin A (SFA)	15
1.6. Fragestellung	16
2. Material	17
2.1. Reagenzien	17
2.2. Antikörper und Stimulanzen für Zellkulturen	17
2.3. Geräte/ Hilfsmittel	18
2.4. Enzyme	18
2.5. Untersuchungsmaterial von Probanden	18
3. Methoden	20
3.1. Vollblutstimulationstest mit Sanglifehrin A	20
3.2. UVID (Ultra-Violet Induced Detection)	20
3.3. Vitalitätsprüfung	22
3.3.1. 7-AAD (7-Amino-actinomycin D)	22
3.3.2. CD4 PE/ CD45 Fitc 7-AAD	23
3.3.3. Trypan blue	23
3.4. Simultane quantitative Messung von Zytokinen (Luminex)	23
3.5. RNA-Isolierung	24
3.6. RT-PCR	26
3.7. IL-6 ELISA	28
3.8. Durchflußzytometer FACS® (fluorescence-activated cell sorter)	28
3.9. Statistik	28

4. Ergebnisse	29
4.1. Funktionelle Charakterisierung des Effektes von SFA im Stimulationstest mit adultem Vollblut	29
4.1.1. Vitalitätsmessung bei Leukozyten unter SFA	29
4.1.2. Quantitative Analyse der T-Zell-Proliferation	30
4.1.2.1. 72h-Stimulation mit Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation und Einfluss von SFA	30
4.1.2.2. Zeitliche Kinetik der Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation und Einfluss von SFA	31
4.1.2.3. Dosis-Wirkungsbeziehung	32
4.1.3. Der Einfluss von SFA auf die Zytokin-mRNA-Expression in costimulierten T-Lymphozyten und Monozyten	34
4.1.3.1. Stimulation mit Anti-CD3/Anti-CD28 mAb (T-Zellen)	35
4.1.3.2. Stimulation mit LPS (Monozyten)	36
4.1.4. Quantitative Bestimmung der Zytokin-Sekretion	38
4.1.4.1. Stimulation mit Anti-CD3/Anti-CD28 mAb (T-Zellen)	38
4.1.4.2. Stimulation mit LPS (Monozyten)	39
4.2. Der funktionelle Einfluss von SFA in Nabelschnurblutproben im Vergleich zu adultem Vollblut	40
4.2.1. Untersuchung der T-Zell-Proliferation	40
4.2.2. Quantitative Analyse der Zytokin-Sekretion	41
4.2.2.1. IL-2	41
4.2.2.2. IL-4	43
4.2.2.3. IL-6	45
4.2.2.4. IL-10	46
4.2.2.5. TNF- α	48
4.2.2.6. IFN- γ	49
4.3. Untersuchung der Genotyp-assoziierten Effekte von SFA	51
4.3.1. Quantitative Analyse der IL-6-Proteinsekretion	51
4.3.1.1. IL-6-Protein-Sekretion in Vollblut-Monozyten	51
4.3.1.2. IL-6-Protein-Sekretion in Vollblut-T-Lymphozyten	52
4.3.1.3. Genotyp-spezifische Analyse der IL-6-Protein-Sekretion zwischen Monozyten und T-Lymphozyten	53
4.3.2. Quantitative Analyse der IL-6-mRNA-Expression	53
4.3.2.1. IL-6-mRNA-Expression in Vollblut-Monozyten	53
4.3.2.2. IL-6-mRNA-Expression in Vollblut-T-Lymphozyten	54
4.3.2.3. Genotyp-spezifische Analyse der IL-6-mRNA-Expression zwischen Monozyten und T-Lymphozyten	55
5. Diskussion	56
6. Zusammenfassung	68
7. Literaturverzeichnis	69
8. Danksagung	79
9. Lebenslauf	80

Abkürzungsverzeichnis

Anti	Antikörper gegen
APC	antigenpräsentierende Zellen
BCG	Bacille Calmette Guerin
CD	Differenzierungsmarker (cluster of differentiation)
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CI	confidence intervall
CsA	Cyclosporin A
CSF	colony stimulating factors
Cyp A	Cyclophilin A
DC	dendritische Zellen
DIC	disseminated intravascular coagulation
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure (-acid)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Erw.	Erwachsene
FACS [®]	fluorescence-activated cell sorter
FKBP	FK-binding protein
FK506	Tacrolimus
FSC	forward scatter
GF	growth factors
GVHD	Graft-versus-host-disease
h	Stunde
IC 50	50%ige Hemmung (inhibitory concentration)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LBP	LPS-binding protein
LPS	Lipopolysaccharid
mAb	monoklonale Antikörper (-antibody)
MHC	major histocompatibility complex
MLC	mixed lymphocyte reaction
MMF	Mycophenolat Mofetil

MOV	Multiorganversagen
mRNA	messenger Ribonukleinsäure (-acid)
m-TOR	mammalian target of rapamycin (Immunophilin von Rapamycin)
MW	Mittelwert
NF	nuclear factor (NF κ B)
NFAT	Transkriptionsfaktor (nuclear factor of activation in T cells)
Ngb.	Neugeborene
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
ns	nicht signifikant
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PCR	Polymerase chain reaction
PHA	Phythämagglutinin
PMA	Phorbol12-myristate 13-acetate
RNAsen	Ribonukleasen
RT	reverse Transkription
sec	Sekunden
SFA	Sangliferin A
7-AAD	7-Amino-actinomycin D (DNA-Farbstoff)
SSC	sideward scatter
s.u.	siehe unten
Taq	Thermus aquaticus
T _C	zytotoxische T-Zelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TCM	T-Gedächtniszellen („central memory“)
TEM	T-Gedächtniszellen („effector memory“)
T _H	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
UVID	Ultra-Violet Induced Detection

1. Einleitung

1.1. Die Immunabwehr

Die immunologische Antwort ist dadurch charakterisiert, dass körperfremde Strukturen zunächst erkannt und anschließend durch induzierte Abwehrmechanismen beseitigt werden. Die verschiedenen Möglichkeiten der Immunreaktion lassen sich in zwei Kategorien einteilen: die angeborene und die erworbene Immunität. Es gibt zwei bedeutende Merkmale, welche das erworbene Immunsystem auszeichnen: einerseits die Fähigkeit zur spezifischen Antwort auf körperfremdes Material und andererseits die verstärkte Abwehrreaktion bei erneutem Kontakt mit dem Pathogen zu einem späteren Zeitpunkt (immunologisches Gedächtnis). Die Hauptakteure der angeborenen (unspezifischen) Immunität sind Phagozyten, zu denen Monozyten, Gewebsmakrophagen und Granulozyten gehören. Ihre Funktion besteht darin, körperfremde Pathogene aufzunehmen und zu zerstören. Außerdem sind Monozyten und Gewebsmakrophagen in der Lage, eine Vielzahl löslicher Substanzen zu produzieren, wodurch andere Immunzellen einwandern können bzw. aktiviert werden.

Die spezifische Erkennung der Pathogene im Rahmen der erworbenen Immunabwehr ist Hauptaufgabe der Lymphozyten, die sich in T-Lymphozyten (T-Zellen) und B-Lymphozyten (B-Zellen) unterteilen lassen. Die Bindung der immunogenen Fremdschubstanz (Antigen) an eine B- oder T-Zelle bewirkt deren Proliferation, so daß viele Lymphozyten entstehen, die eine gleiche Antigenspezifität aufweisen. Die B-Zellen differenzieren sich nach ihrer Aktivierung in Plasmazellen und bilden spezifische Antikörper gegen die extrazelluläre Fremdschubstanz. Da Antikörper die am zugänglichsten Wirkstoffe der spezifischen Immunität darstellen, ist es relativ einfach, die Funktionalität der B-Zellen durch Messung der Antikörperproduktion zu überprüfen. Die T-Zellen können - je nach Subpopulation - unterschiedliche Funktionen innehaben, zum einen als CD8-positive zytotoxische T-Zellen, die an der Elimination von Tumorzellen oder virusinfizierten Zellen beteiligt sind, zum anderen als CD4-positive T-Helferzellen, die mit Phagozyten oder B-Zellen in Verbindung treten und somit die Immunabwehr regulieren, sowie als CD4- oder CD8-positive T-

Suppressorzellen, die eine Immunantwort unterdrücken bzw. beenden können. T-Gedächtniszellen („central memory“ (TCM) und „effector memory“ (TEM)) stellen eine besondere Gruppe der zellulären Immunabwehr dar. Diese speziellen Helferzellen können die einmal gelernte spezifische Immunreaktion nach überstandener Infektionskrankheit speichern. Kommt der Organismus wieder mit demselben Antigen in Kontakt, lösen die T-Gedächtniszellen schneller als bei Erstkontakt eine gezielte Abwehrreaktion aus. Diesen Mechanismus kennt man auch bei den B-Zellen, man macht ihn sich beispielsweise bei der Impfung zunutze. Ihre Wirkung entfalten die T-Zellen über direkte Zell-Zell-Kommunikation oder die Freisetzung von löslichen Proteinen, die als Zytokine bezeichnet werden. Im Folgenden sollen die T-Lymphozyten als Koordinator der Immunantwort im Mittelpunkt der Betrachtungen stehen.

1.2. Aktivierung und Effektorfunktionen von Immunzellen

Die Aktivierung der T-Zellen setzt die Erkennung des fremden antigenen Peptidfragments in Assoziation mit MHC (*major histocompatibility complex*) - Molekülen voraus. Dafür besitzen die T-Zellen einen Rezeptor, den T-Zell-Rezeptor (TCR), der zwar eine den Antikörpern ähnliche Struktur aufweist, jedoch fest in der Zellmembran verankert ist und somit als Produkt nicht ausgeschüttet werden kann. Neben den T-Zell-Rezeptoren, die ihre hohe Antigenspezifität durch eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten der einzelnen Genregionen erzielen (TCR-Diversität), sind zur Antigenerkennung und T-Zellaktivierung noch weitere assoziierte Moleküle notwendig. CD4- bzw. CD8-Corezeptoren gewährleisten, dass CD4-positive T-Zellen nur mit MHC II-tragenden Zellen und CD8-positive T-Zellen nur mit MHC I-tragenden Zellen in Kontakt treten. Die Signale zur Stimulation der T-Zelle werden hauptsächlich durch den TCR-assoziierten CD3-Komplex übermittelt.

Während der T-Zellaktivierung ereignet sich eine Vielzahl intrazellulärer biochemischer Veränderungen ⁽²⁰⁾. Die frühen Signaltransduktionswege, vor allem die des intrazellulären Ca^{2+} -Einstroms und der Aktivierung der Proteinkinase C zur Mobilisierung von Transkriptionsfaktoren, werden physiologischerweise durch die Interaktion von spezifischem Antigen mit dem TCR-assoziierten CD3-Komplex in Gang gesetzt. Experimentell gelingt die

(antigen-) unspezifische T-Zellaktivierung durch den Zusatz von mitogenen Stimulanzen wie PHA (Phytohämagglutinin) oder monoklonale Anti-CD3-Antikörper^(95,104).

Für die Auslösung einer T-Zellantwort sind außer der spezifischen Antigenerkennung weitere costimulatorische Signale, die durch die antigenpräsentierenden Zellen (APC) übertragen werden, essentiell. APC, die sich in erster Linie aus dendritischen Zellen, Makrophagen oder B-Zellen zusammensetzen, befinden sich u.a. in den lymphatischen Organen, wo sie mit den T-Zellen während ihrer Rezirkulation interagieren. Die Expression von komplementären Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche stabilisiert die Bindung zwischen T-Zelle und APC, womit der T-Zelle ermöglicht wird, eine große Anzahl von MHC-Molekülen nach gebundenem Antigen zu untersuchen⁽²⁸⁾. Andererseits werden Oberflächenmoleküle gebildet, die das zweite notwendige Signal für die T-Zellaktivierung übertragen⁽⁷¹⁾. Dazu werden die APC-Glykoproteine B7.1 und B7.2 gezählt, deren Rolle als antigenunspezifische Costimulatoren für die T-Zellaktivierung durch Experimente mit Fibroblasten, welche nach Transfektion mit B7.1 und B7.2 das Wachstum von naiven T-Zellen ohne bisherigen Antigenkontakt induzierten, gezeigt wurde⁽⁹³⁾. Ausschlaggebend für die costimulierende Wirkung ist die Bindung von B7 an das Rezeptormolekül CD28, das auf 80 % der T-Zellen im peripheren Blut exprimiert wird⁽¹⁰¹⁾. Es ist von großer Bedeutung, dass sowohl das spezifische Antigensignal als auch die Costimulation von ein und derselben antigen-präsentierenden Zelle vermittelt wird. Dadurch wird eine Immunantwort naiver T-Zellen gegenüber eigenen Gewebeantigenen verhindert. Kommt es nicht zur Costimulation über den Rezeptor CD28, wird die stimulierte T-Zelle anerg⁽⁶⁹⁾.

Bevor die aktivierten T-Lymphozyten spezielle Funktionen im Rahmen der Immunabwehr übernehmen können, müssen sie proliferieren und sich in Effektorzellen differenzieren. Dies erfordert die Anwesenheit von Interleukin (IL)-2, das vorwiegend von T-Zellen gebildet wird und im Sinne einer autokrinen, positiven Rückkopplung auf die Produzentenzelle zurückwirkt. Gleichzeitig zur beginnenden IL-2-Synthese durch die aktivierten T-Zellen wird die α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD 25) auf der Oberfläche der T-Zellen exprimiert, wodurch der IL-2-Rezeptor eine sehr hohe Affinität für IL-2 erhält.

Die Proliferation und Differenzierung der T-Zellen werden somit entscheidend durch die IL-2-Produktion beeinflusst. Das Signal durch den TCR/CD3-Komplex aktiviert zwar verschiedene Transkriptionsfaktoren wie z.B. NFAT (nuclear factor of activation in T cells), die sich an die Promotorregion des IL-2-Gens binden und dessen Transkription induzieren, jedoch führt die IL-2-Transkription nicht automatisch zur IL-2-Proteinsynthese ⁽⁹⁶⁾.

Das costimulatorische Signal zur T-Zellaktivierung, welches über die B7/CD28-Interaktion vermittelt wird, bewirkt eine Stabilisierung der IL-2 mRNA Expression, was die IL-2-Produktion um das 20-30fache erhöht. Außerdem wird die IL-2-Transkriptionsrate verdreifacht, womit eine 100fache Steigerung der IL-2-Synthese erreicht wird ^(36,68). Da das B7/CD28-Signal durch den Gebrauch von Anti-CD28 monoklonale Antikörper (mAb) in vitro nachgeahmt werden kann, ist es möglich, durch synergistische Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation in T-Zellen eine ähnliche Antwort hervorzurufen wie nach spezifischem Antigenkontakt. Während sich die antigenspezifisch aktivierte T-Zelle über die Bildung von IL-2 selbst zur Proliferation anregt, kann sie gleichzeitig über die Produktion des Wachstumsfaktors IL-3 die Proliferation von Stammzellen und deren Differenzierung in Granulozyten und Makrophagen induzieren. Ein weiteres wichtiges Signal der T-Zelle ist die Synthese von Interferon (IFN)- γ , durch dessen Sekretion die Expression von MHC II - Molekülen auf den APC verstärkt wird. Unter dem Einfluss von IL-2, IL-4, IL-6 und IFN- γ werden gleichermaßen morphologische Veränderungen der T-Zelle und deren Differenzierung zu einer speziellen Effektorzelle eingeleitet.

Die Bildung von T-Helferzellen (T_H) spielt eine zentrale Rolle bei der Immunantwort, da diese entscheiden müssen, welche Effektormechanismen gegen das jeweilige spezifische Antigen aktiviert werden sollen. Diese Abwehrmöglichkeiten beinhalten: (a) zytotoxische T-Zellen, (b) die Antikörperproduktion kombiniert mit der Aktivierung von Mastzellen und eosinophilen Granulozyten und (c) die Aktivierung von Makrophagen für eine proinflammatorische Immunantwort bzw. die Hypersensitivitätsreaktion Typ IV nach Coombs und Gell.

Die Auswahl des Effektormechanismus ist mit der Freisetzung von bestimmten Zytokinen durch die T_H -Zellen assoziiert ^(78,105). Ein kurzer

Antigenreiz führt zur Entwicklung von T_H0-Zellen. Nach längerer Stimulation mit spezifischem Antigen entstehen die spezialisierten T_H1-Zellen, die IL-2 und IFN- γ bilden, und T_H2-Zellen, welche IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 ausschütten. T_H1-Zellen reagieren bevorzugt auf makrophagenpräsentiertes Antigen und aktivieren Makrophagen wiederum zur Immunantwort (Hypersensitivitätsreaktion Typ IV nach Coombs und Gell) oder fördern eine inflammatorische Reaktion. Im Gegensatz dazu tendieren T_H2-Zellen zur Förderung der Produktion von Mastzellen und eosinophilen Granulozyten und unterstützen gleichzeitig die Reifung der B-Zellen mit nachfolgender gesteigerter Antikörperproduktion, vor allem die Synthese von IgE. Zytokine wie IL-3 und TNF- α können sowohl von T_H1 als auch T_H2-Zellen produziert werden. Wenn eine bestimmte Zytokin-Antwort induziert wurde, kann diese durch einen anderen Abwehrmechanismus unterdrückt werden. Es wurde beschrieben, dass beispielsweise IL-10 die Sekretion von T_H1-Zytokinen hemmen kann, während IFN- γ die Proliferation von T_H2-Zellen inhibiert^(34,77). Alle T-Zell-Subpopulationen werden zusätzlich durch T-Regulatorzellen beeinflusst.

Die Darstellung der vielseitigen Effektorfunktionen der T-Lymphozyten kann nicht darüber hinwegtäuschen, dass nur durch die Zusammenarbeit und Koordination der humoralen und zellulären Effektorsysteme eine wirksame Immunantwort ausgelöst werden kann. Insbesondere bei Infektionen mit gram-negativen Bakterien sind die Monozyten von herausragender Bedeutung, da sie das Lipopolysaccharid (LPS/ Endotoxin), das einen wesentlichen Bestandteil der äußeren Membran dieser Bakterien darstellt, erkennen. LPS bindet an LBP (LPS-binding protein) und wird über den Zelloberflächen-Rezeptor CD14 internalisiert. Die LPS-Stimulation humaner Monozyten aktiviert verschiedene Signaltransduktionswege, die schließlich unter anderem über Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen initiiert⁽⁴⁰⁾. Insbesondere TNF- α stellt hier ein entscheidendes Zytokin dar, das bei lokaler, isolierter Wirkung die Elimination von Erregern unterstützt, bei systemischer Inflammation (Sepsis) als Mediator allerdings zu disseminierter intravasaler Koagulopathie (DIC), Multiorganversagen (MOV) bis hin zum Tod führen kann.

1.3. Zytokine als Marker der Immun-Zell-Funktion

Definition

Zytokine sind Mediatoren, die die Differenzierung und Aktivierung von Zellen des Immunsystems regulieren sowie die vielen Effektorfunktionen dieser Zellen koordinieren. Aufgrund des komplexen synergistischen oder antagonistischen Zusammenwirkens aller Zytokine und der Vielfalt der Steuerungsmöglichkeiten wird deren Wirkungsgefüge innerhalb des Immunsystems auch als Zytokinnetzwerk bezeichnet ⁽⁶⁾.

Da es in der Natur keine isolierten Systeme gibt, ist die Abgrenzung der Zytokine von anderen biologischen Wirkstoffen wie z.B. Hormonen schwierig. Im Gegensatz zu klassischen Peptidhormonen werden sie nicht nur von einer spezifischen Zellart gebildet, sondern sie beeinflussen gleichzeitig eine Vielzahl von Zellen mit unterschiedlichsten Funktionen (z.B. Immun-, Nerven- und Endothelzellen). Die Zytokine zeichnen sich dadurch aus, dass sie sich mit hoher Affinität an ihre Rezeptoren binden und daher in sehr geringen Wirkungs-dosen ($< 0.1 \mu\text{g/ml}$) hohe biologische Aktivität zeigen. Unter dem Begriff „Zytokin“ werden heute die Interleukine, Interferone, koloniestimulierenden Faktoren (*colony stimulating factors*, CSF) sowie die Tumornekrosefaktoren (TNF) und Wachstumsfaktoren (*growth factors*, GF) zusammengefasst. Die Charakterisierung von Zytokin-Untergruppen beinhaltet häufig noch neben „Interleukin“ („zwischen Leukozyten etwas bewegen“) Bezeichnungen wie „Lymphokin“ oder „Monokin“, die auf die Hauptproduzentenzellen der benannten Immunregulatoren hinweisen sollen. Als bester allgemeingültiger Ausdruck hat sich jedoch „Zytokin“ erwiesen, da er unabhängig vom Zelltyp für jeden Mediator, der als Signal zwischen den Zellen dient, benutzt werden kann.

Funktionen einzelner Zytokine

Die Gentechnologie hat durch die Herstellung reiner rekombinanter Zytokine die Identifizierung von Zytokinfunktionen *in vitro* sehr erleichtert. Allerdings sollten diese Experimente nicht vorbehaltlos auf die *In-vivo*-Situation übertragen werden, wofür es mehrere Gründe gibt: (a) die Zytokine arbeiten

in vivo nicht isoliert, sondern sind in ein Netzwerk verschaltet, auf das die Zelle reagiert; (b) die Zytokine unterliegen in vivo starken wechselseitigen Regulationsvorgängen, was anhand der Bedeutung der T_H1/T_H2 -Dichotomie ersichtlich wird; (c) es gibt in vivo Zytokininhibitoren, die selbst autokrine Effekte der Zytokine auf die Ursprungszelle unterdrücken können (IL-1-Inhibitor, löslicher TNF- α -Rezeptor). Auch wenn In-vivo-Experimente Hinweise zur biologischen Bedeutung der multifunktionellen Zytokine erbracht haben, ist deren vollständige Interpretation ebenfalls schwierig, da beobachtete Effekte auch durch sekundäre Mediatoren oder Signalkaskaden hätten ausgelöst werden können.

Im Folgenden sollen allgemeine Eigenschaften der Zytokine, die für die Untersuchungen in dieser Arbeit Relevanz haben, erläutert werden.

Interleukin 2

Der Protein-Mediator Interleukin 2 (IL-2) wurde erstmals im Überstand von Zellkulturen, die mit T-Zell-Mitogenen stimuliert worden waren, gefunden ⁽⁷⁶⁾. IL-2 erzeugt seine hauptsächlichsten Wirkungen auf Zellen, die den IL-2-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren (T-, B-, NK-Zellen, Makrophagen). Einerseits stimuliert IL-2 autokrin und parakrin die T-Zellproliferation und -differenzierung, die eng mit der Regulation der eigenen IL-2-Rezeptor-Synthese auf den T-Zellen assoziiert sind ⁽²⁶⁾. Zum anderen bewirkt IL-2 die Freisetzung von Zytokinen aus T-Zellen und reguliert weitere Lymphozytenfunktionen. Außerdem ist IL-2 an der IFN- γ -Synthese u.a. zur Aktivierung von Makrophagen und NK-Zellen sowie an der Förderung der B-Zell-Proliferation bzw. Antikörperproduktion beteiligt.

Interleukin 4

Das von aktivierten T-Zellen gebildete Interleukin 4 (IL-4) wurde zuerst als „B cell growth factor“ beschrieben ⁽²⁶⁾. Ähnlich dem IL-2 vermittelt IL-4 seine Wirkungen über einen spezifischen IL-4-Rezeptor, der auf zahlreichen

Zielzellen exprimiert wird. Der funktionelle IL-4-Rezeptor ist ein Heterodimer bestehend aus der IL-4-Rezeptor-Alpha-Kette (IL-4R α , CD124) und der vielen Zytokin-Rezeptoren gemeinsamen Gamma-Kette (γ_c , CD 132) ^(54,56). Bedeutsame Funktionen des IL-4 als T_H2-Zytokin sind die Aktivierung ruhender B-Zellen, die Steigerung der Expression von MHC-Klasse II-Antigenen und Erhöhung der Antikörperproduktion. Des Weiteren kann IL-4 als Wachstumsfaktor für T-Zellen wirksam werden sowie die Reifung und Aktivierung von Makrophagen, Mastzellen und hämatopoetischen Stammzellen fördern ⁽⁴¹⁾.

Interleukin 6

IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin mit zentraler Rolle in der Immunabwehr. So bewirkt es die Stimulation der Akut-Phase-Protein-Produktion in der Leber und hat einen Einfluss auf Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen, B- und T-Zellen. Neben der pro-inflammatorischen Wirkung von IL-6 beschrieben verschiedene Autoren für IL-6 anti-inflammatorische und immunsuppressive Fähigkeiten ^(54,56,67,103,109). So konnten Rincon und Mitarbeiter zeigen, dass von APC freigesetztes IL-6 eine Differenzierung von aktivierten CD4⁺-T-Zellen in T_H2-Zellen unterstützten ⁽⁸²⁾. Dies spielt in sofern eine wichtige Rolle, da die T_H1-Wirkung für die Transplantatabstoßung verantwortlich gemacht wird, so dass postuliert werden kann, dass IL-6 einen protektiven Effekt in der Transplantation haben könnte.

IL-6 ist ein Zytokin, das vor allem von Monozyten/Makrophagen und T-Zellen, aber auch von Endothel, Fibroblasten, Hepatozyten, bestimmten Tumorzellen und Endothel freigesetzt wird. So sezernieren Monozyten/Makrophagen innerhalb kurzer Zeit nach Bakterienkontakt IL-6. Sowohl Gewebshypoxie als auch Trauma verursachen eine massive Freisetzung des Zytokins. IL-6 findet in der Klinik auch Anwendung als Prognosemarker bei Sepsis, Trauma und Herzinsuffizienz, wenig gesichert ist die Indikation bei Aktivitätsdiagnostik chronisch inflammatorischer Prozesse. Des Weiteren können Autoimmunerkrankungen, Lymphome, AIDS, alkoholtoxischer Leberschaden und Organabstoßung zu erhöhten IL-6- Werten führen.

Interleukin 10

Die Entdeckung von Interleukin 10 (IL-10) gelang durch die Beobachtung, dass IL-10 als Zytokin der T_H2-Zellen die Produktion von T_H1-Zytokinen zu inhibieren vermag ⁽³³⁾. Möglicherweise beruht der antagonistische Mechanismus auf einem indirekten Effekt (Verminderung der Expression von MHC-Molekülen auf der APC-Oberfläche, Hemmung costimulatorischer Signale) ⁽²³⁾. Darüber hinaus kann IL-10 auch aktivierend auf Wachstum und Differenzierung von T-Zellen ⁽¹⁴⁾, B-Zellen ⁽³⁸⁾ und Mastzellen wirken ⁽¹⁰²⁾.

Interferon- γ

Interferone (IFN) wurden erstmals als Substanzen beschrieben, die Zellen vor einer Virusinfektion schützen ⁽⁵⁵⁾. Das säurelabile IFN- γ wirkt im Gegensatz zu den säurestabilen IFN- α und IFN- β schwach antiviral. Im Synergismus mit IL-2 ist IFN in der Lage, die Differenzierung der naiven T-Zellen in T_C-Zellen zu aktivieren. IFN- γ schafft damit die Grundvoraussetzung für die T_C-Effektorfunktion im Rahmen der zellulären Immunabwehr und wirkt gleichzeitig aktivierend auf Monozyten, NK-Zellen und im besonderen auf Makrophagen ⁽⁵⁾. Einen hemmenden Einfluss weist das T_H1-Zytokin IFN- γ gegenüber der IL-4-induzierten Wachstumsstimulation von B-Zellen auf ⁽²⁵⁾.

Tumornekrosefaktor- α

Das aufgrund seiner eigenständigen, T-Zell-unabhängigen zytostatischen bzw. zytolytischen Aktivität benannte Zytokin Tumornekrosefaktor (TNF) wurde erstmalig in BCG (*Bacille Calmette Guerin*)-sensibilisierten Mäusen, denen LPS injiziert worden war, nachgewiesen ⁽¹²⁾. Aktivierte Monozyten sowie gleichermaßen T_H1- und T_H2-Zellen sind in erster Linie für die TNF- α -Synthese verantwortlich. TNF- α bewirkt hauptsächlich eine Steigerung der Phagozytose und Zytotoxizität bei Monozyten, Makrophagen und Granulozyten. TNF- α besitzt einen synergistischen Effekt mit IL-1 zur

Aktivierung von antigenstimulierten T-Zellen in der Akute-Phase-Reaktion von Entzündungsvorgängen ⁽²⁷⁾. Außerdem kann TNF- α die Expression von Adhäsionsmolekülen und MHC-Klasse-I-Molekülen auf APC erheblich steigern.

1.4. T-Zell-Proliferation

Naive T-Zellen haben die Fähigkeit, viele Jahre ohne Zellteilung zu überleben (G_0 -Phase). Kommt es zum Antigen-Kontakt und damit verbunden zu einer regelrechten vollständigen Costimulation, treten die Zellen wieder in den Zellzyklus ein (G_1 -Phase), um eine große Anzahl an spezifischen T-Zellen zur Immunabwehr zu bilden. Sowohl Proliferation als auch Differenzierung wird über das Zytokin Interleukin-2 (IL-2) vermittelt, das durch diese Zellen selbst gebildet wird. Gleichzeitig kommt es zur Expression hoch-affiner IL-2-Rezeptoren, an die das IL-2 bindet und so im Sinne eines autokrinen Rückkopplungsmechanismus das Wachstum der T-Zellen unterstützt.

Der Zellzyklus selbst stellt die wiederkehrende Abfolge der Zellreifung und Zellteilung dar. Insbesondere die Phase der DNA-Reduplikation in der S-Phase kann experimentell genutzt werden, um durch Einbringen spezifischer Substanzen die Proliferationsleistung zu quantifizieren (siehe 3.2.). Im Folgenden sind die vier Phasen des Zellzyklus beschrieben:

G₁-Phase

Die G_1 -Phase wird auch postmitotische Ruhephase oder diploide Interphase genannt, in der es zur kontinuierlichen Erhöhung der RNA- und Protein-Synthese kommt. Kommt es nicht zum Übergang in die S-Phase, bezeichnet man diese Phase auch als G_0 -Phase, in der die Zellen zwar nicht mehr am Zellzyklus teilnehmen, aber dennoch unter bestimmten Bedingungen wieder rekrutiert und zur Proliferation befähigt werden können.

S-Phase

Die S-Phase, auch tetraploide Phase, stellt die DNA-Synthesephase dar, in der es zur Reduplikation der DNA kommt. Die Zelle wird tetraploid.

G₂-Phase

Man bezeichnet die G₂-Phase auch als die prämitotische Ruhephase. Sie stellt eine relativ kurze Periode vor erneutem Beginn der M-Phase dar.

M-Phase

In der M-Phase finden Mitose (Kernteilung) und Zytokinese (Zytoplasma-Teilung) statt. Der Chromosomensatz wird halbiert und es kommt zur Bildung von zwei diploiden Tochterzellen.

1.5. Immunsuppression

Durch Selektion von Immunzellen im Rahmen der immunologischen Reifung wird im menschlichen Körper ein individuelles Abwehrsystem geschaffen, das zum einen gegen eine Vielzahl von Bedrohungen (Viren, Bakterien, Protozoen, Tumorzellen, Fremdzellen) kompetent wirksam ist, dabei die körpereigenen Zellen aber unversehrt lässt. Im Rahmen von angeborenen und erworbenen Abweichungen der Immun-Wirts-Homöostase kann es zu Störungen dieser Balance kommen, so dass sich die Immunabwehr gegen den Wirtsorganismus, beziehungsweise für diesen lebenswichtige fremde (transplantierte) Organsysteme richtet und konsekutiv schädigt.

Die Behandlung einer autoimmunen Erkrankung (als Ausdruck einer Imbalance der Immun-Wirts-Homöostase), beziehungsweise die Verhinderung einer für den Menschen unerwünschten Immunreaktion, wie der Transplantatabstoßung, macht eine konsequente, häufig lebenslange immunsuppressive Pharmakotherapie notwendig. Diesem erwünschten Effekt stehen die Nachteile eines immuninkompetenten Systems gegenüber, so dass es bereits bei generell „banalen“ Infektionskrankheiten zu lebensbedrohlichen Zuständen kommen kann. Auch die unerwünschten und toxischen Nebenwirkungen einer immunsuppressiven Pharmakotherapie stehen dem Benefit einer solchen Behandlung gegenüber.

Um eine besonders wirkungsvolle Immunsuppression mit möglichst wenigen Nebenwirkungen zu erhalten, kombiniert man heute Immunsuppressiva mit

unterschiedlichem Wirkmechanismus. Diese werden im Folgenden dargestellt.

1.5.1. Etablierte Immunsuppressiva

Bei der immunsuppressiven Therapie im Rahmen der allogenen Organtransplantation unterscheidet man die Basisimmunsuppression von der Behandlung akuter Abstoßungsreaktionen. Die Basisimmunsuppression bei der allogenen Nierentransplantation besteht in der Regel aus einer Dreifachtherapie, die sich weltweit am häufigsten aus Azathioprin, Glukokortikoiden und Cyclosporin A zusammensetzt. Um die Nebenwirkungen und langfristigen Folgen von Steroiden und Azathioprin zu begrenzen, wird versucht, bereits innerhalb des ersten Jahres eine Reduktion der Immunsuppression hin zu einer Monotherapie mit CsA zu erreichen. Alternative Therapieschemata gibt es durchaus. So wird anstelle von Azathioprin in letzter Zeit häufiger Mycophenolat Mofetil (MMF) verwendet, wohingegen Tacrolimus (FK506) als Alternative zu CsA eingesetzt wird, da beide über die Inhibition des Immunophilins Calcineurin wirken (s.u.). Auch Rapamycin findet als Immunsuppressivum zunehmend Anwendung. Die Behandlung der akuten Abstoßungsreaktion wird in der Regel mittels hochdosierter Glukokortikoid-Gabe eingeleitet.

1.5.1.1 Glukokortikoide

Glukokortikoide, wie beispielsweise Methylprednisolon, stellen einen Stützpfiler der Immunsuppression dar. In unphysiologisch hohen Konzentrationen unterdrücken sie alle Phasen der Entzündungsreaktion (Exsudation, Migration von Monozyten/Makrophagen zum Entzündungsort, Proliferation, Vernarbung). Die Wirkung wird über Proteinsyntheseregulierende Rezeptoren vermittelt, die zur Modifikation von Transkriptionsvorgängen führt. So wird die Bildung des Entzündungshemmenden Proteins Lipocortin gefördert, dass die Freisetzung von

Arachidonsäure, und damit die Prostaglandin- und Leukotriensynthese durch Inhibition der Phospholipase A₂ reduziert. Des Weiteren hemmen Glukokortikoide die Antigenpräsentation, Transkription von Zytokinen und supprimieren somit die T-Zell-Proliferation. Bei kurzfristiger Anwendung ist mit Nebenwirkungen auch in hohen Dosierungen nicht zu rechnen. Aufgrund der zahlreichen bekannten Nebenwirkungen bei Langzeittherapie (z.B. M. Cushing) sind längerfristige Glukokortikoid-Gaben nach Möglichkeit zu vermeiden.

1.5.1.2. Azathioprin

Azathioprin wirkt unselektiv antiproliferativ und stellt eine zweite Säule der Basisimmunsuppression dar ⁽⁶²⁾. Als unwirksame Vorstufe wird es im Körper in 6-Mercaptopurin umgewandelt und hemmt durch falsche Basen die RNA- und DNA-Synthese. In höherer Dosierung wird es auch als Zytostatikum angewendet. Toxische Effekte und erhöhte Malignominzidenz sind mögliche Spätfolgen.

1.5.1.3. Mycophenolat Mofetil (MMF)

Mycophenolat Mofetil ist ein Morpholinoäthylester und wirkt spezifischer antiproliferativ auf Lymphozyten als auf andere Zellen. Über die Suppression der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase wird die De-novo-Synthese von Purinen in aktivierten Lymphozyten gehemmt ⁽¹⁰⁰⁾. Dieses Medikament wird vor allem bei akuten Abstoßungsreaktionen, aber in letzter Zeit auch als Alternative zu Azathioprin angewandt.

1.5.1.4. Cyclosporin A (CsA)

Die Erfolge der modernen Transplantationsmedizin beruhen maßgeblich auf der Einführung von Cyclosporin A, worunter eine deutliche Abnahme der

Abstoßungsreaktionen und Reduktion der Glukokortikoiddosierungen erreicht werden konnte ⁽⁵⁹⁾. CsA ist ein aus 11 Aminosäuren bestehendes cyclisches Peptid, das von einem Bodenpilz (*Tolylocadium inflatum* Gams) produziert wird. Sowohl toxischer als auch immunsuppressiver Effekt von CsA wird in erster Linie verursacht durch seine Bindung an Cyclophilin A (CypA) und der damit ausbleibenden Aktivierung der Phosphatase Calcineurin, wodurch es zu einer Hemmung der Transkriptionsfaktoren NF-AT (nuclear factor of activation in T-cells) und NFκB und konsekutiv zur IL-2-Synthesehemmung kommt ^(53,70).

Ein großer, insbesondere in der Nierentransplantation therapielimitierender Nachteil ist die nephrotoxische Wirkung von CsA, aber auch neurotoxische Effekte wurden beobachtet. Die Infektanfälligkeit und das Risiko, Tumoren zu entwickeln, sind bei CsA weniger stark ausgeprägt als bei anderen Immunsuppressiva. Bei Kombination mit anderen Stoffen wurde eine gehäufte Inzidenz von malignen Lymphomen beobachtet, die häufig Hirnmetastasen hervorrufen ⁽⁸¹⁾.

1.5.1.5. Tacrolimus (FK506)

Der Effekt von FK506 wird über die Bildung des FK506/FKBP (FK506 binding protein) - Komplexes vermittelt und bewirkt ebenso wie CsA eine selektive Inhibition der IL-2-Transkription durch Blockade des Immunophilins Calcineurin (s.o.) ^(44,97). Gegenüber CsA hat Tacrolimus eine 10-100-fach stärkere Wirkung ^(3,107). Aktuelle Literaturanalysen beschreiben für Tacrolimus eine effektivere Wirkung im Vergleich zu Cyclosporin A, die sich in einer geringeren Anzahl an Transplantatabstoßungen und –verlusten widerspiegelt. Allerdings scheint dieser positive Effekt mit einem höheren Risiko einherzugehen, einen Diabetes mellitus zu entwickeln ⁽¹⁰⁶⁾.

1.5.1.6. Rapamycin

Rapamycin bindet wie FK506 an das Immunophilin FKBP, bewirkt aber im Gegensatz zu FK506 eine Blockade der Protein-Kinase m-TOR (mammalian target of rapamycin, auch FRAP=FKBP-rapamycin-associated protein) mit der Folge einer Inhibition der Wachstumsfaktor-vermittelten T-Zell-Proliferation am Übergang der G₁-Phase des Zellzyklus in die S-Phase (11,17,50,85,86).

1.5.2. Sanglifehrin A

Das Makrolid Sanglifehrin A wurde als Abkömmling des Aktinomyceten *Streptomyces flaveolus* erstmals im Jahre 1999 durch Sanglier und Fehr als Substanz mit immunsuppressiver Kompetenz entdeckt. Hintergrund der Untersuchungen war die Tatsache, dass es mit Rapamycin und FK506 Substanzen gibt, die zwar beide am gleichen Immunophilin (FKBP) binden, aber unterschiedliche Wirkerfolge erzielen (s.o.). So stellten sich die Autoren die Frage, ob es auch andere Cyclophilin-bindende Liganden als CsA mit differenter biologischer Aktivität geben möge. Die Beobachtungen der Arbeitsgruppe schlossen ein, dass SFA die Fähigkeit besitzt, wie CsA an Cyclophilin A zu binden ^(32,88). Dies wurde durch Darstellung der Kristallstruktur von Cyp A durch Kallen und Mitarbeiter bestätigt ⁽⁶⁰⁾. Interessanterweise blockiert SFA aber trotz Bindung an Cyclophilin A nicht Calcineurin ⁽¹¹⁰⁾ und verstärkt sogar die Aktivität von NF-AT und NFκB ^(112,111), so dass es sich bei SFA um eine neue Substanz mit bisher ungeklärtem Wirkmechanismus handelt.

1.6. Fragestellung

Noch immer stellen trotz moderner Immunsuppression die akuten und chronischen Transplantatabstoßungen den limitierenden Faktor des Organüberlebens nach allogenen Organtransplantationen dar. Auch die Nebenwirkungen der verfügbaren Immunsuppressiva können dabei durchaus therapiebegrenzend sein. Mit Sanglifehrin A steht ein neues Immunsuppressivum zur Verfügung, dessen funktionelle Wirksamkeit nur unzureichend geklärt ist. In der vorliegenden Arbeit wurde diese neue Substanz mit Hilfe eines Vollblutstimulationstests mit folgenden Fragestellungen untersucht:

(1) T-Lymphozyten Funktion

Welchen Einfluss hat SFA auf die Zytokin-mRNA-Expression, Zytokin-Proteinsekretion und Proliferation adulter T-Lymphozyten nach Anti-CD3-/Anti-CD28-mAb-Costimulation?

(2) Monozytenfunktion

Welchen Einfluss hat SFA auf die Zytokin-mRNA-Expression und Zytokin-Proteinsekretion adulter Monozyten nach LPS-Stimulation?

(3) Einfluss auf neonatale Immunzellen

Gibt es funktionelle Unterschiede in der Wirksamkeit von SFA auf T-Zellebene im Vergleich zwischen adultem Vollblut und Nabelschnurblut gesunder Neugeborener?

(4) Pharmakogenetik

Welchen Einfluss hat der IL-6⁻¹⁷⁴-Genpolymorphismus auf die immunmodulierende Wirkung von SFA?

2. MATERIAL

2.1. Reagenzien

- Aqua dest.
- Iscover's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), (BioWhittaker Europe), BE 12-726 F
- L-Glutamin (Bio-Whittaker Europe), 200 mM in 0,85% NaCl-Lsg., BE 17-605
- Lipopolysaccharid-Stocklösung (LPS-stock),(Sigma), L-4130
- Pen-Strep (BioWhittaker Europe), 10000 U Penicillin/ml+10000µg Streptomycin/ml, DE 17-602 E
- Trypsin (Bio Whittaker)
- RBC-Lysis solution
- Coulter-Clenz cleaning agent (Beckmann/Coulter, Cat. 8404067)
- Hämolysepuffer pH 8,0 (NH₄Cl 16,52 g ; KHCO₃ 2,0 g ; EDTA 0,08 g : ad 2000 ml Aqua dest.)
- RNA Isolation kit (Purescript, Gentra Systems, R-5000)
- BRDU-kit for Flow Cytometry, (Sparta-Labs/ Biocarta), 26-01-22741
- DMS- (Dimethylsuberimidate-) Stock: 500 mg DMS in 500 µl Methylformamid (MFA)
- DMS-Puffer: 600 mg TRIS + 1000 mg NaSO₄ (Natrium-Sulfat) in 100 ml Aqua dest.
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (BioWhittaker Europe)
- Biocoll (Biochrom, Berlin) L 6155
- Quantikine-kit for human IL-6 (R&D Systems, Minneapolis,USA) D 6050
- Human cytokine LINCOpex kit (LINCO Research, St. Charles, Missouri, USA)
- Sangliferin A (Novartis)
- Dimethyl-Sulphoxide (DMSO), (Sigma), D 2650
- 7-Amino-actinomycin D: 1 mg/ 2 ml DPBS (Sigma)
- Trypan Blue (Sigma)

2.2. Antikörper und Stimulantien für Zellkulturen

- Monoklonaler Maus-Anti-Human-CD3 Antikörper, Klon CLB-T3/4.E, (CLB-Vertrieb M1654)
- Monoklonaler Maus-Anti-Human-CD4 Antikörper, Klon RPA-T4 (BD Biosciences, 555347)
- Monoklonaler Maus-Anti-Human-CD28 Antikörper, Klon CLB-CD28/1, 15E8 (CLB, M1650)
- Monoklonaler Maus-Anti-Human-CD45 Antikörper Fitc (Beckmann/Coulter, Cat 31254x)
- Monoklonaler Maus-Anti-Human-CD 4 Antikörper PE (Beckmann/Coulter, Cat 555347)
- Lipopolysaccharid (LPS) (Sigma, L-4130)

2.3. Geräte/Hilfsmittel

- Kulturschalen für Zell- oder Vollblutkulturen (Tissue Culture Plates, 6 Well, Ø 35 mm, Costar, Cambridge, MA, USA)
- Tissue Culture Flask 25 cm², sterile, (Sarstedt)
- Neubauer-Zählkammer mit Deckglas
- 1 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf)
- Falcon Tubes
- PS-Röhrchen 5 ml (12x75 mm), (Greiner, 115101)
- Hood (Nuair Biological Safety Cabinet Class II Type A/B3 (Nuair, Plymouth, USA)
- Vollblut-Zellzähler Coulter T660 (Coulter Electronics GmbH, Krefeld)
- UV-B-Lampe
- Lithium-heparinisiertes Blutentnahmeröhrchen
- Durchflußzytometer EPICS XL MCL (Coulter-Immunotech, Krefeld)
- Q-Prep (Coulter Q-Prep/Immunoprep, 7546999)
- Mikroskop (Hund)
- Pipetten (Eppendorf/Hamburg)
- Tischzentrifuge Biofuge A (Heraeus, Hamburg)
- Brutschrank (Labotect, Göttingen)
- Zentrifuge Omnifuge 2.0 RS (Heraeus, Hamburg)
- Biofuge A (Heraeus, Hamburg)
- PH-Meter pHM 83 Autocal (Radiometer, Kopenhagen, Dänemark)
- Laborwaage 12116 MP (Sartorius, Göttingen)

2.4. Enzyme

- AmpliTaq Gold-Polymerase (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA)
- Rekombinante Thermus thermophilus-Polymerase (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA)
- Reverse Transcriptase MULV (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA)
- Trypsine Versene (BioWhittaker, Verviers, Belgien)

2.5. Untersuchungsmaterial von Probanden

Für die Untersuchungen zur mRNA Expression, Proliferation und Proteinsekretion von Zytokinen bei erwachsenen Normalpersonen rekrutierte sich die Gruppe der gesunden Probanden aus freiwilligen Blutspendern des Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin am UKSH, Campus

Lübeck (Direktor Prof. Dr. Kirchner), denen im Rahmen einer Blutspende Blut abgenommen wurde. Die Untersuchungen speziell zum Gen-Polymorphismus IL-6⁻¹⁷⁴ wurden durch die Ethikkommission genehmigt (Müller-Steinhardt, Bescheid vom 30.06.2004, AZ: 04-051) und ebenfalls an freiwilligen Blutspendern nach ausführlicher Aufklärung durchgeführt. Die Untersuchungen des Neugeborenen-Immunsystems erfolgten an Nabelschnurblut, das von Kindern gewonnen wurde, die in der Klinik für Gynäkologie des UKSH, Campus Lübeck (Direktor: Prof. Dr. Dietrich) geboren wurden. Die Abnahme des Blutes erfolgte nach Abnabelung des Kindes aus dem plazentaren Anteil der Nabelschnur, der sonst verworfen worden wäre. Die Eltern wurden ausführlich aufgeklärt und erklärten ihr Einverständnis. Die Untersuchungen wurden durch die Ethik-Kommission genehmigt (Härtel, Bescheid vom 26.07.05, AZ:05-119).

3. METHODEN

3.1. Vollblutstimulationstest mit Sanglifehrin A

Die Grundlage zur Entwicklung des Vollblutstimulationstests für die Quantifizierung von Zytokin-mRNA bilden die Protokolle von Kirchner et al. ⁽⁶⁴⁾ und Bloemena et al. ⁽⁹⁾. Diese Methoden beschrieben die Analyse von T-Zellfunktionen durch Messung von T-Zellproliferation bzw. Zytokin-Produktion im Vollblut. Für den hier beschriebenen Vollblutstimulationstest wurde peripher-venöses Erwachsenenblut beziehungsweise frisches Nabelschnurblut von Neugeborenen verwendet, das mit Lithium-Heparin versetzt worden war.

Der Vollblutansatz sollte unter möglichst sterilen Bedingungen erfolgen (sterile Werkbank, sterile Pipettenspitzen).

In einer 6-Loch-Gewebekulturplatte werden 9 ml IMDM⁺-Lösung (IMDM⁺= IMDM 500 ml + Penicillin 100U/ml + Streptomycin 100 µg/ml + L-Glutamin 2 mmol/l) vorgelegt, in das mit einer Pipette 1 ml Vollblut eingemischt wird. Zusätzlich wird in die Probenbehältnisse entsprechend des Versuchsaufbaus eine entsprechende Menge von in DMSO gelöstem SFA (1 ,2 ,2.5 ,3 ,4 ,5 , bzw. 10µl), und als Kontrolle 3, bzw. 10 µl DMSO zugegeben. Dieser Ansatz wird für 1 Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Für den UVID-Ansatz werden die Proben in ein Gewebekulturgefäß (Volumen: 25 cm²) überführt, jeweils 5 µl monoklonaler Maus-Anti-Human-CD3-/anti-CD28 Antikörper zugegeben und für weitere 4, 24, 48, oder 72 Stunden (zeitliche Kinetik) bei 37°C entsprechend der Experimentieranordnung im Brutschrank inkubiert. Für den IL-6-Ansatz wurden jeweils 5 µl monoklonaler Maus-Anti-Human-CD3-/anti-CD28 Antikörper, bzw. 50 µl LPS-Standardverdünnung (100 ng/ml) zugegeben und für 4, beziehungsweise 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

3.2. UVID (Ultra-Violet Induced Detection)

UVID stellt ein durch Hammers und Mitarbeiter ^(42,43) am hiesigen Institut (Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin am UKSH, Campus

Lübeck) entwickeltes Verfahren dar, mit dessen Hilfe das Thymidin-Analogon 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) in proliferierenden Zellen erkannt und eine schonende, nicht-enzymatische Evaluation von Zellmarkern und DNA-Synthese ermöglicht wird.

Nach entsprechender Inkubationszeit der stimulierten Vollblutansätze entnimmt man 1000 μl der Ansätze als Probe, um die Anzahl der Leukozyten zu bestimmen. Der Rest dieser Proben ($\sim 800 \mu\text{l}$) wird zentrifugiert (2 min. bei 7000/min.) und der Überstand zur Durchführung von ELISA asserviert und tiefgefroren.

Entsprechend der Zellzahl, die an einem automatischen Zellzähler bestimmt wird, werden die Vollblutkulturansätze mit IMDM⁺ verdünnt, um eine Zellzahl von nicht mehr als 700 Leukozyten/ μl zu erhalten. Vollblutkulturansätzen mit weniger Zellen als 700 Leukozyten/ μl werden 30 μl BRDU zugesetzt (bei Verdünnung entsprechend mehr) und diese für 1 Stunde im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Weiteres Vorgehen nach Protokoll.

Protokoll

- 5 ml Ficoll in Falcon-Gefäßen vorlegen.
- Ficoll vorsichtig mit 9000 μl Blut-Kulturmedium überschichten.
- Isolierung von mononukleären Zellen über Ficoll-Gradienten (Zentrifugation 20 min. bei 1700/min.)
- Ring mit mononukleären Zellen mittels Pipette entnehmen und mit DPBS waschen (Zentrifugation 10 min. bei 1100/min.).
- Überstand verwerfen, Zellpellet in 1000 μl DPBS resuspendieren und in Eppendorfgefäß überführen.
- UV-Bestrahlung für 5 min. und anschließende Zentrifugation der Eppendorfgefäße (3 min. bei 4000/min.).
- Überstand verwerfen, Zellpellets in 100 μl DPBS resuspendieren
- Zugabe von 20 μl monoklonalem Maus-Anti-Human-CD4 Antikörper und kurz mischen
- 20 min. in Dunkelheit inkubieren
- nach Inkubation Zugabe von 1000 μl DPBS und Zentrifugation (3 min. bei 3000/min.)
- Überstand verwerfen und Zellpellet in 100 μl DPBS resuspendieren.

- Zugabe von 1000 µl DMS-Puffer und 100 µl DMS, für 5 min. inkubieren und anschließend Zentrifugation (3 min. bei 4000/min.)
- Überstand verwerfen, Zellpellets mit 1000 µl DPBS waschen und erneut zentrifugieren (3 min. bei 4000/min.)
- Überstand verwerfen, Zellpellets in 100 µl DPBS resuspendieren
- Proben in vorbereitete FACS-Röhrchen (siehe Tabelle 1) überführen und in Dunkelheit für mindestens 60 min. inkubieren.
- Durchführung der FACS-Messung.

Reagenz	Zusammensetzung
1000 µl Aqua dest.	
50 µl 0,1 M Borax 8,0	0,1 M Na ₂ B ₄ O ₇ x 10 H ₂ O (BORAX;MW 381.4), pH 8,0: 1,9 g/ 50 ml Aqua dest., (Sigma)
10 µl anti-BrdUrd FITC	Clone Bu20a, (DAKO)
20 µl 7-AAD	7-Amino-actinomycin D: 1 mg/ 2 ml DPBS (Sigma)

Tabelle 1: Reagenzien für FACS®-Röhrchen

3.3. Vitalitätsprüfung

Zur Vitalitätsprüfung der Zellen verwendeten wir drei verschiedene Verfahren:

3.3.1. 7-AAD (7-Amino-actinomycin D)

7-AAD ist ein DNA-Farbstoff, der die Eigenschaft hat, bei Störung der Zellmembran-Integrität, die bei Apoptose oder Nekrose eintritt, in den Zellkern einzudringen und die DNA angefärbt einer Analyse mittels FACS zugänglich zu machen. Die Messung der Apoptose mittels 7-AAD wurde von Schmid und Mitarbeitern in ihrer Arbeit beschrieben ⁽⁹⁰⁾. Wir untersuchten die Prozentzahl an apoptotischen/avitalen Leukozyten unter 0 nM, 200, 300, 400, 500 und 1000 nM SFA.

Protokoll:

- 100 µl aus 1 ml Vollblut werden nach 48 Stunden Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28 unter Zusatz der jeweiligen SFA-Konzentration zu 5. µl 7-AAD 0,05% hinzupipettiert.
- 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
- Lysieren der Probe im Q-Prep
- Messung im FACS

3.3.2. CD4 PE/CD45 Fitc 7-AAD

CD4/CD45 sind Oberflächenantigene, die für T-Lymphozyten spezifisch sind. Wir führten diese Messung zur Bestimmung der Anzahl von apoptotischen/avitalen T-Lymphozyten unter 0 nM, 1000 nM und 5000 nM SFA nach o.g. Protokoll unter Zusatz der markierten Oberflächenantigene am FACS durch.

3.3.3. Trypan blue

Trypan blue ist ein Farbstoff, der bei Störung der Zellmembran-Integrität in die Zelle eindringt und diese deutlich blau färbt, so dass die Zellen in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop prozentual ausgezählt werden können. Wir führten die Messungen gemäß dem Stammzellhandbuch des Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin am UKSH, Campus Lübeck, zur Vitalitätsbestimmung von Stammzellen durch ⁽¹⁾.

3.4. Simultane quantitative Messung von Zytokinen (Luminex)

Mit Hilfe des „Human cytokine LINCOplex kit“ ist es möglich, simultan mehrere Zytokine quantitativ zu bestimmen (z.B. IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IFN- γ , GM-CSF und TNF- α). Es basiert auf der konventionellen enzymgebundenen sandwich-assay- Technologie. Das Verfahren wurde von Hildesheim und Mitarbeitern als effizientes

Verfahren, das die Vorteile eines geringen Probenbedarfs bei gleichzeitiger Bestimmung mehrerer Zytokine beinhaltet, evaluiert ⁽⁵²⁾. Die spezifischen Antikörper gegen die zu untersuchenden Zytokine sind kovalent mit einzelnen Luminex- Mikrosphären verbunden und mit einem Fluoreszenz-Farbstoff individuell für jedes Zytokin markiert. Die Mikrosphären werden für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Standards, Kontrollen und Proben (25 µl) in einer 96-Loch-Mikrotiter-Filterplatte inkubiert. Das weitere Vorgehen wurde gemäß der Anleitung des Luminex-Kit durchgeführt. Für die Messungen standen uns die Gerätschaften am Institut für Transfusionsmedizin, UKE Hamburg (Direktor: Prof. Dr. P. Kühnl) zur Verfügung.

3.5. RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA aus Vollblut und PBMC wurde mit Hilfe eines kommerziellen Kits (Purescript RNA Isolation Kits, Genra Systems, Minneapolis, USA) durchgeführt. Um die Trennung der Leukozyten aus den Vollblutansätzen zu ermöglichen, wurden zunächst die Erythrozyten hämolysiert. Darauf folgte die Lyse der Leukozyten mit anionischen Detergenzien, welche die zellulären Bestandteile in Lösung brachten. Kontaminierende DNA und Proteine wurden dann durch Salzpräzipitation ausgefällt. Die RNA verblieb in der wässrigen Phase des Ansatzes und konnte mit Isopropylalkohol präzipitiert werden. Nach einem Waschvorgang mit 70 % Ethanol wurde die gesamte RNA in RNase-freiem Wasser aufgelöst und bis zum Gebrauch bei -80 °C tiefgefroren.

Der unerwünschte Abbau der RNA wird durch Ribonukleasen (RNAsen) katalysiert, die in der Lage sind, aus RNA Mono- oder Oligonukleotide abzuspalten. Da RNAsen ubiquitär vorhanden sind, müssen bei der Isolierung und beim Umgang mit RNA einige allgemeine Grundregeln beachtet werden: (a) bei allen Arbeitsschritten Handschuhe tragen, (b) an einer sterilen Werkbank arbeiten, (c) alle Gebrauchsgegenstände sterilisieren und (d) nur RNase-freies Wasser benutzen.

Protokoll

- Vollblutansatz aus 6-Loch-Platte in Falcon-Röhrchen überführen. Falls in den 6-Loch-Platten ein Zellrasen anhaftet, 1000 µl Trypsin in diese hineingeben und nach 5 Minuten restliche Zellen aufnehmen und in Falcon-Röhrchen überführen.
- Falcon-Röhrchen bis 40 ml mit Hämolyse-Puffer auffüllen und für 15 Minuten inkubieren.
- Proben für 1 Minute bei 8100 x g zentrifugieren und anschließend Hämolysepuffer dekantieren.
- Mit 500 µl Zell-Pellet in kleines Reaktionsgefäß überführen und bei 8100 x g für 1 Minute zentrifugieren.
- Überstand vorsichtig abnehmen und Zell-Pellet mit 1000 µl „RBC-Lysis solution“ mischen.
- Erneut zentrifugieren bei 8100 x g für 1 Minute und Überstand vorsichtig abnehmen.
- Zell-Pellet mit 100 µl IMDM⁺ mischen und entweder weiterverarbeiten oder tiefrieren (-80°C)
- Resuspendierte Leukozyten in sterilem 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit 450 µl "Cell Lysis Solution" versetzen.
- Fünfmal auf- und abpipettieren.
- Lysierte Zellen mit 150 µl "Protein-DNA Precipitation Solution" versetzen.
- Vorsichtig mischen (20x Reaktionsgefäß hin- und herbewegen) und anschließend für 5 min in Eisbad stellen.
- Bei einer Geschwindigkeit von 13000 x g für 5 min zentrifugieren.
- Überstand in neues, steriles 1,5-ml-Gefäß, das 600 µl 100 % Isopropanol enthält, geben.
- Vorsichtig 50 mal Reaktionsgefäß hin- und herbewegen und mischen.
- Bei 13000 x g 2 min zentrifugieren und Überstand verwerfen.
- Kleines weißes RNA-Pellet mit 300 µl 70 % Ethanol waschen.
- Bei 13000 x g für 1 min zentrifugieren, Überstand vorsichtig entfernen und Pellet 10 min lufttrocknen lassen, bis sich kein Ethanol mehr im Gefäß befindet.

- RNA Pellet in 300 µl RNase-freiem Wasser ("RNA Hydration Solution") aufnehmen und 30 min in ein Eisbad stellen.
- Resuspendierte RNA bei -80 °C bis zum Gebrauch (nicht länger als 1 Monat) tiefrieren.

3.6. RT PCR

Reverse Transkription

Dem Nachweis von mRNA mittels Polymerasekettenreaktion geht zunächst die Bildung von komplementärer DNA (cDNA) voraus. Dies erfolgt mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, welche auch als reverse Transkriptase bezeichnet wird. Durch die Zugabe von unspezifischen (*random*) Primern (Hexanukleotidmischung) entstehen kurze doppelsträngige Nukleinsäurebereiche, die der DNA-Synthese als Startpunkte dienen. Anschließend wird der RNA-cDNA-Heteroduplex durch Hitze denaturiert, und der cDNA-Strang kann als Ausgangspunkt für die Polymerasekettenreaktion (PCR) dienen. Die herkömmliche reverse Transkription wird mit Hilfe eines im Handel erhältlichen Kits durchgeführt („Ready To Go“-RT-Kit, Pharmacia, Uppsala, Schweden), welche die Moloney-Murine-Leukemia-Virus (MMLV)-Reverse-Transkriptase verwendet. Die Methode der RT PCR wurde durch Härtel und Mitarbeiter für Vollbluttestungen optimiert und publiziert ⁽⁴⁶⁾.

Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde 1985 als schnelle, hochsensitive Methode in die DNA-Analytik eingeführt ⁽⁸⁷⁾. Dabei wird mit Hilfe einer DNA-Polymerase eine spezifische primer-definierte In-vitro-Replikation ausgeführt, welche durch sich wiederholende Zyklen eine annähernd exponentielle Vervielfältigung der Zielsequenz zur Folge hat. Grundsätzlich besteht eine PCR-Reaktionsfolge oder ein PCR-Zyklus aus drei verschiedenen Schritten:

1. Denaturierung der Doppelstrang-DNA

Bei 95 °C erfolgt eine reversible Auftrennung der DNA in Einzelstränge.

2. Anlagerung von Primern ("Annealing")

Sequenzspezifische einzelsträngige Moleküle (*upstream* und *downstream Primer*) lagern sich an den jeweils komplementären DNS-Strang an und sind somit Startmoleküle für die DNS-Synthese.

3. Primer Extension

Eine vom hitzestabilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq) stammende DNA-Polymerase fügt ausgehend von den Primern die komplementären Nukleotide in 5'-3' Richtung entlang des Einzelstrangs hinzu. Die DNA-Polymerase weist ein Temperaturoptimum von 72 °C auf und kann auch bis zu 95 °C über kurze Zeit stabil bleiben. Nach einem PCR-Zyklus wird die von den Primern flankierte Sequenz selektiv verdoppelt, und der nächste Zyklus beginnt wieder mit einer Denaturierung der Doppelstränge. In der Praxis kann nach 30-35 Zyklen eine 10^6 - 10^7 fache Vervielfältigung erzielt werden. Wie zuvor für die gewöhnliche RT PCR beschrieben, wurde cDNA aus RNA umgeschrieben, um anschließend in der PCR-Reaktion *in vitro* vervielfältigt zu werden.

Protokoll

- PCR-Ansatz auf Eis (100 µl; Kawasaki, 1990):

Reagenz	Ansatzmenge
cDNA	33 µl
Aqua dest.	62,5 µl
spezifischer sense Primer (10 µmol / l)	2 µl
spezifischer antisense Primer (10 µmol / l)	2 µl
Ampli-Taq Gold-Polymerase (2,5 Units)	0,5 µl

- Ansatz in den Thermozykler überführen und 10 min bei 95 °C inkubieren.
- Durchführung von 35 PCR-Zyklen bestehend aus:
 - Segment 1: 94 °C, 1 min.
 - Segment 2: 60 °C, 30 sec.
 - Segment 3: 72 °C, 1 min.
- Nach dem letzten Zyklus mindestens 10 min bei 72 °C inkubieren, anschließend bis zur Herausnahme der Reaktionsgefäße Temperatur auf 4 °C halten.
- Fortsetzung mit der Analyse der PCR-Reaktionsprodukte mittels Gelelektrophorese

3.7. IL-6 ELISA

Überstände der stimulierten Vollblut-Kulturen wurden zur Bestimmung der IL-6 Sekretion gemäß den Anweisungen des Herstellers von „Quantikine-kit for human IL-6“ prozessiert und gemessen.

3.8. Durchflußzytometer FACS® (fluorescence-activated cell sorter)

Alle Analysen am Durchflußzytometer wurden mit einem luftgekühlten Einzel-Zell-3-Farben-FACS mit einer Extinktionslinie bei 488 nm durchgeführt. Grüne Fluoreszenz (FITC) wurde durch einen Filter mit 525-nm Wellenlänge, orange Emissionen (PE) durch einen Filter bei 575-nm Wellenlänge, und tiefrote Fluoreszenz (7-AAD) durch einen Filter bei 675-nm Wellenlänge gemessen. Alle Messungen wurden für mindestens 10.000 Zellen bei niedrigem Sammeldruck durchgeführt.

3.9. Statistik

Statistische Unterschiede zwischen Gruppen wurden nichtparametrisch für zwei unabhängige Stichproben mit dem Mann-Whitney-U-Test, für zwei abhängige Stichproben mit dem Wilcoxon-Test, und für k-abhängige Stichproben mit dem Friedman-Test berechnet (SPSS for Windows, 10.0, SPSS, München). Als Anschlussstest für die Rangvarianzanalyse nach Friedman führten wir multiple Vergleiche verbundener Stichproben mittels Wilcoxon-Wilcox-Test durch. P-Werte $<0,05$ werden als signifikant bewertet.

4. ERGEBNISSE

4.1. Funktionelle Charakterisierung des Effektes von SFA im Stimulationstest mit adultem Vollblut

4.1.1. Vitalitätsmessung bei Leukozyten unter SFA

Um eine toxische Wirkung von SFA auf Lymphozyten ausschließen zu können, untersuchten wir nach 48-stündiger Inkubation mit entsprechenden Konzentrationen von SFA die Anzahl der avitalen Zellen bei a) Gesamtleukozyten und b) T-Lymphozyten. Hier zeigten sich unter Betrachtung der unterschiedlichen SFA-Konzentrationen sowohl bei Anzahl der avitalen Gesamtleukozyten (Trypan-blue-kontrolliert), als auch bei Anzahl der avitalen T-Lymphozyten (Trypan-blue-kontrolliert) keine Unterschiede zwischen Kontrolle und SFA, beziehungsweise zwischen den verschiedenen SFA-Konzentrationen (Tabelle 2 und 3).

SFA-Konzentration	% avitale Zellen bei Gesamtleukozyten
0 nM	15,1
200 nM	9,74
300 nM	17,3
400 nM	15,2
500 nM	14,7
1000 nM	14,8

Tabelle 2: Vitalitätsmessung im FACS® bei unterschiedlichen Konzentrationen von SFA mit 7 AAD nach 48h Inkubation (Trypan-blue-kontrolliert: 15-20% avitale Zellen bei allen Konzentrationen, ein repräsentatives Experiment ist aufgezeigt).

SFA-Konzentration	% avitale Gesamtleukozyten	% avitale Lymphozyten	% avitale CD4 ⁺ -Lymphozyten
0 nM	23,8	0,75	0
1000 nM	23,1	1,86	0,68
5000 nM	20,2	1,19	0,19

Tabelle 3: Vitalitätsmessung im FACS® bei unterschiedlichen Konzentrationen von SFA mit 7-AAD und CD4 PE/CD 45 Fitc (Trypan-blue-kontrolliert: 15-20% avitale Zellen bei allen Konzentrationen)

4.1.2. Quantitative Analyse der T-Zell-Proliferation

Die Wirkung des immunsuppressiven Effekts von SFA wird in vorangegangenen Arbeiten insbesondere auf die Inhibition der Proliferation von aufgereinigten T-Zellen zurückgeführt. Unter SFA-Zugabe wurde eine Zellzyklus-Blockade am Übergang der G₁-Phase (postmitotische Ruhephase) zur S-Phase (DNA-Synthesephase) beobachtet ⁽¹¹²⁾. Während diese Untersuchungen die Wirkung an Zelllinien zeigen konnten, stellte sich für uns die Frage, ob die Wirkung im Vollblut-Ansatz (s. 3.1.) zu reproduzieren ist. Mit Hilfe der UVID-Technologie (s. 3.2.) ist es möglich, durch DNA-Färbung und Nachweis der Zell-Syntheseleistung einzelne Zellzyklus-Phasen (G₀-/G₁-Phase; S-Phase; G₂-Phase; M-Phase) in der FACS[®]-Analyse voneinander zu unterscheiden. Dabei spiegelt die Abnahme der Zellzahl in der S-Phase unter Zugabe von SFA im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle die Inhibition der Proliferationsleistung der Zellen wieder. Die T-Zellen wurden über den T-Zell-Rezeptor mit Anti-CD3 mAb, sowie mit Anti-CD28 mAb als zweites, co-stimulatorisches Signal stimuliert.

4.1.2.1. 72h-Stimulation mit Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation und Einfluss von SFA

Zunächst untersuchten wir, ob im Vollblut-Ansatz unter 72-stündiger Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation ein Einfluss von SFA in verschiedenen Konzentrationen (0 nM, 100 nM, 500 nM, 1000 nM SFA) auf die T-Zellproliferation nachzuweisen ist (n=8). Durch Zugabe von monoklonalem Maus-Anti-Human-CD4 Antikörper konnten wir die Zellen nach den Zelleigenschaften CD4-positiv (CD4⁺) und CD4-negativ (CD4⁻) unterscheiden und isoliert betrachten. Die Anzahl der proliferierenden CD4⁺-Zellen (%) wurde durch Zugabe von 1000 nM SFA von 56,0% auf 23,8% (p=0,012) reduziert, wogegen die Anzahl von proliferierenden CD4⁻-Zellen von 23,8% auf 4,4% (p=0,012) reduziert wurde. Damit zeigt sich, dass SFA sowohl auf CD4⁺-Zellen, als auch auf CD4⁻-Zellen einen inhibitorischen Effekt ausübt.

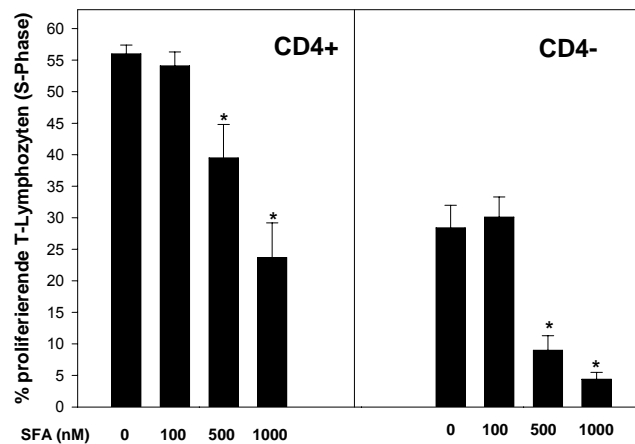


Abbildung 1: Vollblutproben (n=8) nach Präinkubation mit SFA (0, 100, 500, 1000 nM) für 30 Minuten und anschließender Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation für 72h, links: CD4⁺-Zellen, rechts: CD4⁻Zellen (*=p<0,05 zwischen Kontrolle und SFA-Zusatz).

4.1.2.2. Zeitliche Kinetik der Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation und Einfluss von SFA

Nachdem eine signifikante Abnahme der T-Zell-Proliferation unter Zugabe von 500 nM und 1000 nM SFA bei 72-stündiger Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, welcher Effekt sich im Rahmen einer zeitlichen Stimulationskinetik beobachten ließe. Es wurden hierfür Proben (n=8) über die Zeiträume von 24h, 48h und 72h stimuliert. Für 2 Proben konnte kein 24h-Wert erhoben werden. Dabei zeigte sich zu allen Zeitpunkten ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle (0 nM SFA) und 1000 nM SFA (24h: p=0,046, 48h: p=0,012, 72h: 0,036) (Abbildung 2).

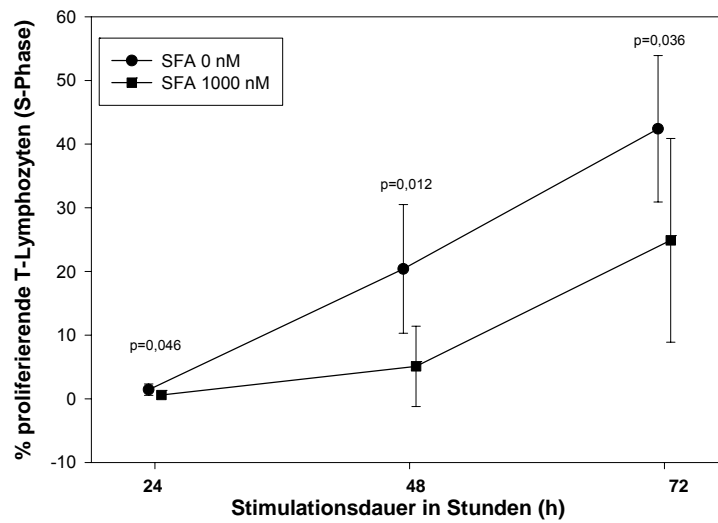


Abbildung 2: Zeitliche Kinetik der T-Zell-Proliferation (%) unter Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation über 24, 48 und 72 Stunden ohne und mit Zusatz von 1000 nM SFA (n=8).

4.1.2.3. Dosis-Wirkungsbeziehung

Im Folgenden stand die Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehung von SFA im Vordergrund. Dabei konnte ein hochsignifikanter Unterschied in der Proliferationshemmung bei Zusatz von 1000 nM SFA beobachtet werden (n=29, Abb. 3).

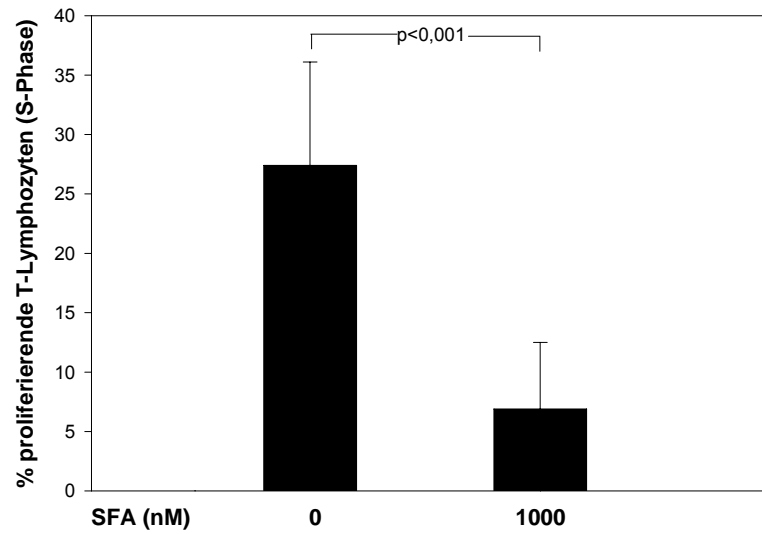


Abbildung 3: T-Zell-Proliferation (%) nach Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation ohne und mit Zusatz von 1000 nM SFA (n=29).

In einer zweiten Titrationsreihe wurden die Konzentrationen 0 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM und 1000 nM SFA (n=10) untersucht. Hier zeigte sich eine signifikante Hemmung der Proliferation bei Zusatz von 500 nM und 1000 nM SFA (Abb. 4).

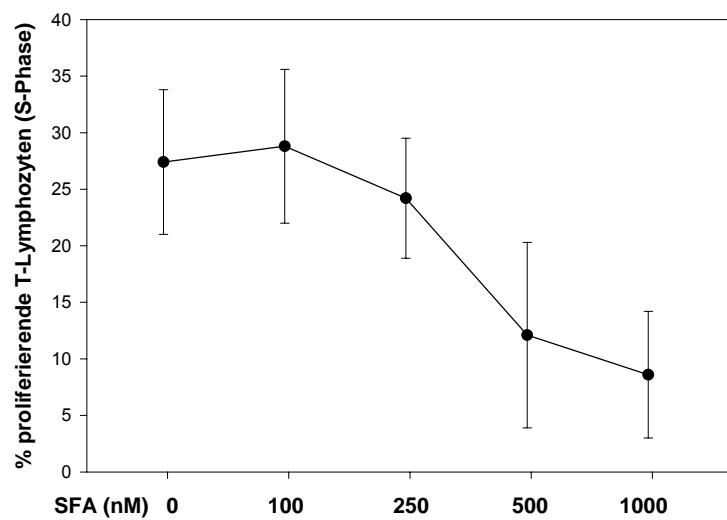


Abbildung 4: T-Zell-Proliferation (%) nach Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation bei Zusatz von 0, 100, 250, 500 und 1000 nM SFA (n=10).

In einer dritten Titrationsreihe (0 nM, 200 nM, 300 nM, 400 nM, 500 nM, 1000 nM SFA) bestimmten wir die Konzentration, bei der eine 50-prozentige Inhibition der T-Zell-Proliferation erreicht wird (IC 50). Diese lag bei 400 nM SFA (Abb. 5).

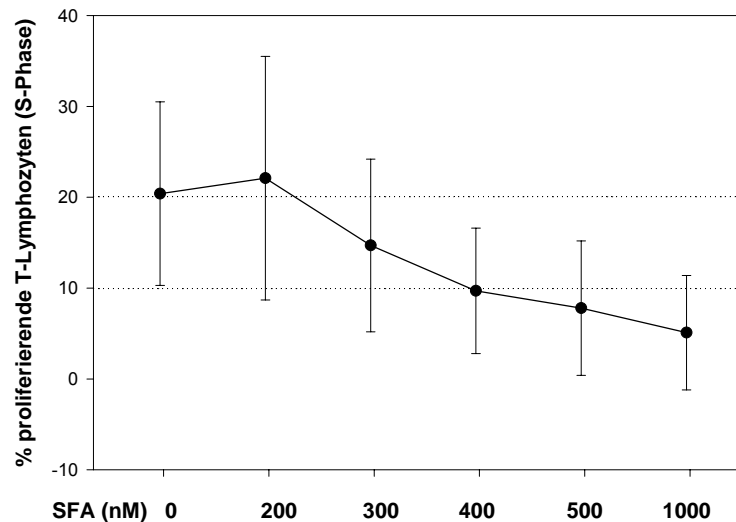


Abbildung 5: Bestimmung der Konzentration, bei der eine 50-prozentige Inhibition der T-Zell-Proliferation erreicht wird (IC 50) (0 nM SFA = 100%, 400 nM SFA = 47,5 %) (n=7).

4.1.3. Der Einfluss von SFA auf die Zytokin-mRNA-Expression in costimulierten T-Lymphozyten und Monozyten

Um die Wirkung von SFA auf Transkriptionsebene beurteilen zu können, ist es notwendig, die mRNA-Synthese nach Stimulation unter SFA-Inhibition zu untersuchen. Es wurde Vollblut mit verschiedenen SFA-Konzentrationen (0 nM, 100 nM, 500 nM, 1000 nM SFA) für eine Stunde präinkubiert und anschließend für 4, bzw. 24 Stunden durch die Zugabe von LPS, bzw. monoklonalen Maus-Anti-Human-CD3/CD28 Antikörper stimuliert. Nach Inkubation wurde mRNA isoliert und mithilfe der „Taqman Reverse Transcriptase PCR“ (s. 3.6.) quantitativ untersucht (mRNA von IL-2, IL-4, IL-6 und TNF- α (Anti-CD3/Anti-CD28-Stimulation), bzw. IL-6 und TNF- α (LPS-Stimulation)).

4.1.3.1. Stimulation mit Anti-CD3/Anti-CD28 mAb (T-Zellen)

Während IL-2 mRNA unter Zusatz von 1000 nM SFA nur nach 4-stündiger Inkubation eine signifikante Abnahme der mRNA-Expression zeigte, war diese bei IL-4 mRNA und IL-6 mRNA sowohl nach 4-stündiger als auch nach 24-stündiger Inkubation signifikant inhibiert. Bei TNF- α zeigte sich zu allen Zeiten kein signifikanter Effekt (Tabelle 4+5, Abbildung 6+7 A-D).

	IL-2 mRNA	IL-4 mRNA	IL-6 mRNA
% der Kontrollgruppe	34,2	35,4	35,8
95% CI (%)	9,3-59	15,1-55,6	9,3-62,5
p-Wert	0,012	0,012	0,012

Tabelle 4: 4-stündige Inkubation unter Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation mit Zusatz von 1000 nM SFA (n=8).

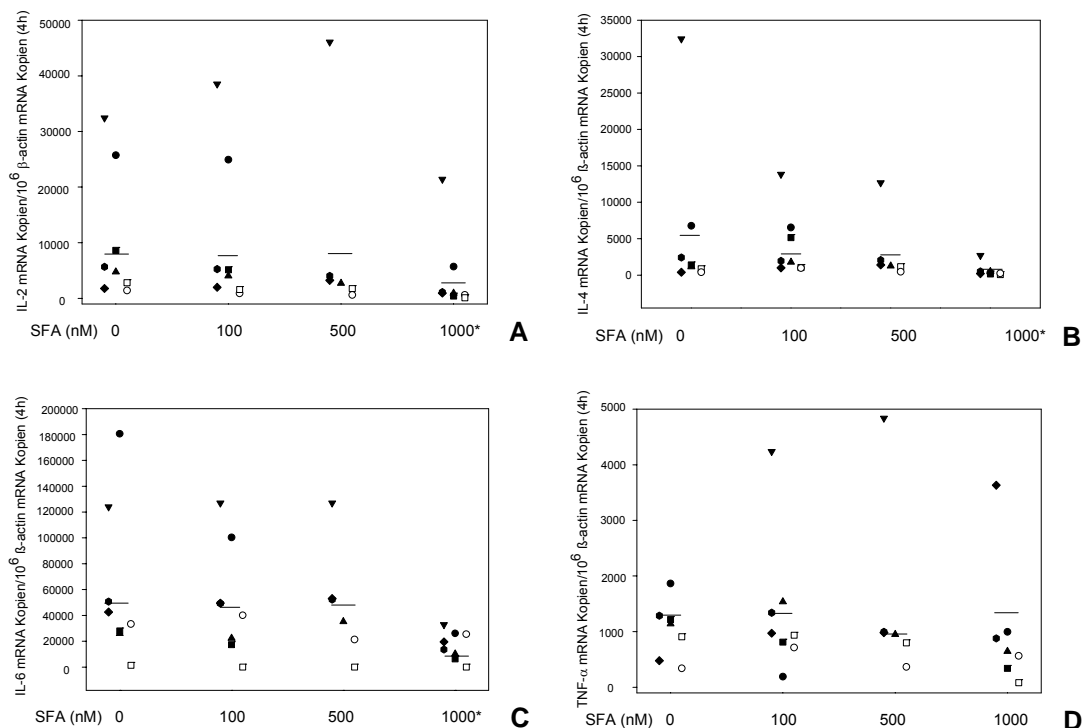


Abbildung 6 (A-D): Zytokin-mRNA-Expression unter Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation nach 4-stündiger Inkubation mit Zusatz von 0, 100, 500 und 1000 nM SFA, (A): IL-2 mRNA, (B): IL-4 mRNA, (C): IL-6 mRNA, (D): TNF- α mRNA (*= $p < 0,05$ zwischen Kontrolle und SFA-Zusatz). Jeder Punkt entspricht einem individuellen Blutspender. Die Querstriche zeigen den jeweiligen Mittelwert an.

	IL-4 mRNA	IL-6 mRNA
% der Kontrollgruppe	26,1	55,8
95% CI (%)	15,0-37,3	32,3-79,5
p-Wert	0,012	0,012

Tabelle 5: 24-stündige Inkubation unter Anti-CD-3/Anti-CD28-mAb-Costimulation mit Zusatz von 1000 nM SFA (n=8).

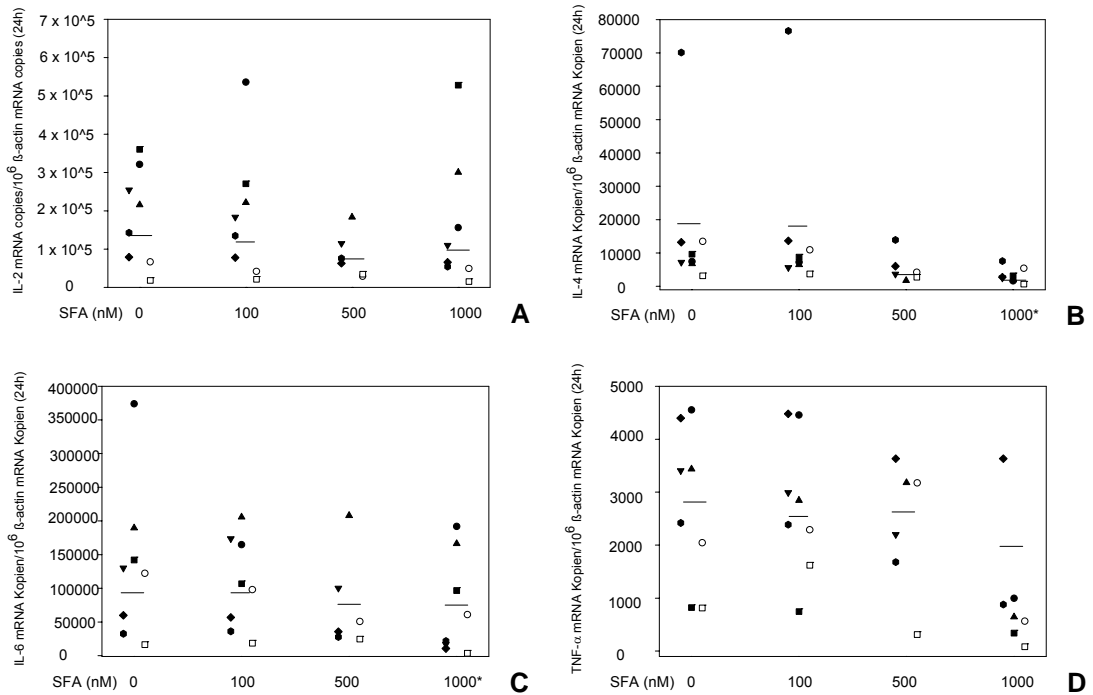


Abbildung 7 (A-D): Zytokin-mRNA-Expression unter Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation nach 24-stündiger Inkubation mit Zusatz von 0, 100, 500 und 1000 nM SFA, (A): IL-2 mRNA, (B): IL-4 mRNA, (C): IL-6 mRNA, (D): TNF- α mRNA (*= $p < 0,05$ zwischen Kontrolle und SFA-Zusatz). Jeder Punkt entspricht einem individuellen Blutspender. Die Querstriche zeigen den jeweiligen Mittelwert an.

4.1.3.2. Stimulation mit LPS (Monozyten)

Sowohl IL-6 mRNA- als auch TNF- α mRNA-Expression wurden unter Zusatz von 1000 nM SFA nach 4- und 24-stündiger Inkubation signifikant inhibiert (Tabelle 6+7, Abbildung 8+9).

	IL-6 mRNA	TNF- α mRNA
% der Kontrollgruppe	31,6	60,8
95% CI (%)	6,5-56,6	37,7-84,0
p-Wert	0,018	0,027

Tabelle 6: 4-stündige Inkubation unter LPS-Stimulation mit Zusatz von 1000 nM SFA, CI: Konfidenzintervall, (n=8).

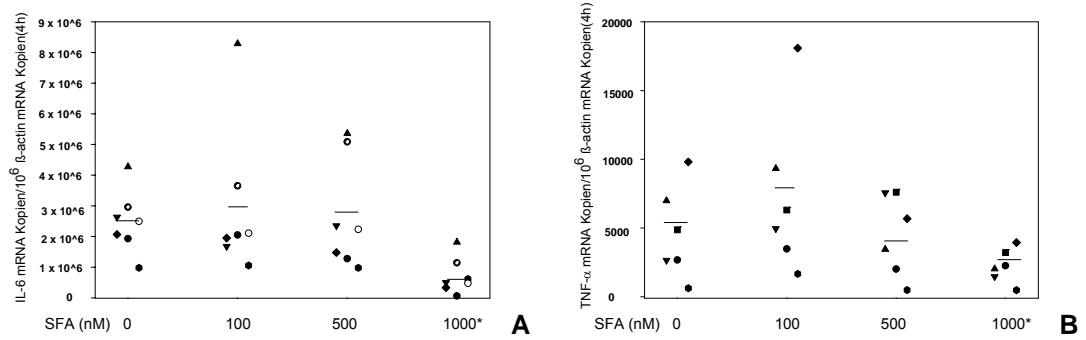


Abbildung 8: Zytokin-mRNA-Expression unter LPS-Stimulation nach 4-stündiger Inkubation mit Zusatz von 0, 100, 500 und 1000 nM SFA, (A): IL-6 mRNA, (B): TNF- α mRNA (*= $p < 0,05$ zwischen Kontrolle und SFA-Zusatz). Jeder Punkt entspricht einem individuellen Blutspender. Die Querstriche zeigen den jeweiligen Mittelwert an.

	IL-6 mRNA	TNF- α mRNA
% der Kontrollgruppe	26,7	32,1
95% CI (%)	2,4-51,1	5,6-58,6
p-Wert	0,018	0,018

Tabelle 7: 24-stündige Inkubation unter LPS-Stimulation mit Zusatz von 1000 nM SFA, CI: Konfidenzintervall, (n=8).

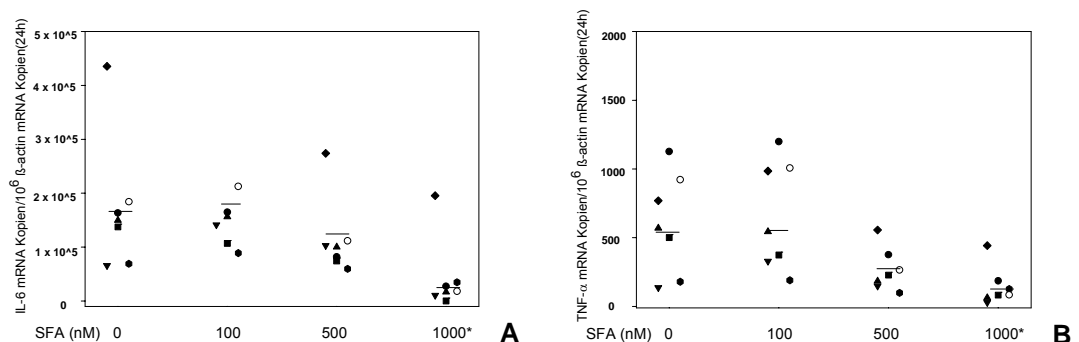


Abbildung 9: Zytokin-mRNA-Expression unter LPS-Stimulation nach 24-stündiger Inkubation mit Zusatz von 0, 100, 500 und 1000 nM SFA, (A): IL-6 mRNA, (B): TNF- α mRNA (*= $p < 0,05$ zwischen Kontrolle und SFA-Zusatz). Jeder Punkt entspricht einem individuellen Blutspender. Die Querstriche zeigen den jeweiligen Mittelwert an.

4.1.4. Quantitative Bestimmung der Zytokin-Sekretion

Zur Untersuchung der Zytokin-Sekretion unter Zusatz von SFA wurden die Überstände von Vollblut mit verschiedenen SFA-Konzentrationen (0 nM, 100 nM, 500 nM, 1000 nM SFA) für eine Stunde präinkubiert und anschließend für 24 Stunden mit monoklonalem Maus-Anti-Human-CD3/CD28 Antikörper, bzw. LPS stimuliert. Nach Inkubation untersuchten wir mithilfe der ELISA-Technik quantitativ die Zytokin-Sekretion von IL-2, IL-6 und TNF- α (Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation), bzw. IL-6 und TNF- α (LPS-Stimulation).

4.1.4.1. Costimulation mit Anti-CD3/Anti-CD28 mAb (T-Zellen)

Bezüglich des Einflusses von SFA auf die Zytokin-Sekretion zeigte sich sowohl bei IL-2 als auch bei IL-6 eine signifikante Inhibition unter Zusatz von 1000 nM SFA, wohingegen bei TNF- α kein signifikanter Unterschied zu beobachten war (Tabelle 8, Abbildung 10).

	IL-2 Protein	IL-6 Protein
mit 1000 nM SFA (% der Kontrollgruppe)	49,1	17,6
Mittelwert bei 0 nM SFA (pg/ml)	706,0	643,3
95% CI bei 0 nM SFA (pg/ml)	477,3-934,6	305,5-981,2
Mittelwert bei 1000 nM SFA (pg/ml)	346,8	113,5
95% CI bei 1000 nM SFA (pg/ml)	195,7-497,9	39,0-188,0
p-Wert	0,012	0,012

Tabelle 8. 24-stündige Inkubation unter Anti-CD-3/Anti-CD28-mAb-Costimulation mit Zusatz von 1000 nM SFA (n=8).

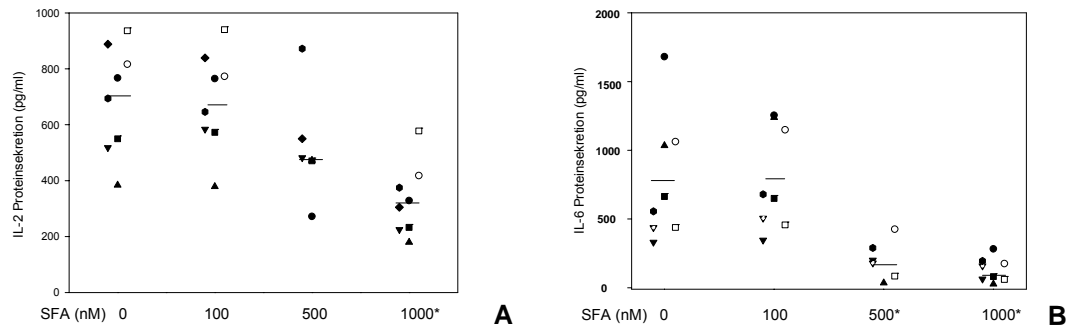


Abbildung 10: Zytokin-Sekretion unter Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation nach 24-stündiger Inkubation mit Zusatz von 0, 100, 500 und 1000 nM SFA, (A): IL-2, (B): IL-6 (*= $p < 0,05$ zwischen Kontrolle und SFA-Zusatz). Jeder Punkt entspricht einem individuellen Blutspender. Die Querstriche zeigen den jeweiligen Mittelwert an.

4.1.4.2. Stimulation mit LPS (Monozyten)

Unter Stimulation mit LPS fand sich bei IL-6 und TNF- α eine signifikante Inhibition der Zytokinprotein-Sekretion unter Zusatz von 1000 nM SFA (Tabelle 9, Abbildung 11).

	IL-6 Protein	TNF- α Protein
mit 1000 nM SFA (% der Kontrollgruppe)	31,1	22,8
Mittelwert bei 0 nM SFA (pg/ml)	3708,4	440,4
95% CI bei 0 nM SFA (pg/ml)	3233,8-4183,1	222,2-658,6
Mittelwert bei 1000 nM SFA (pg/ml)	1154,9	100,4
95% CI bei 1000 nM SFA (pg/ml)	486,9-1822,7	58,5-142,4
p-Wert	0,018	0,018

Tabelle 9. 24-stündige Inkubation unter LPS-Stimulation mit Zusatz von 1000 nM SFA (n=8).

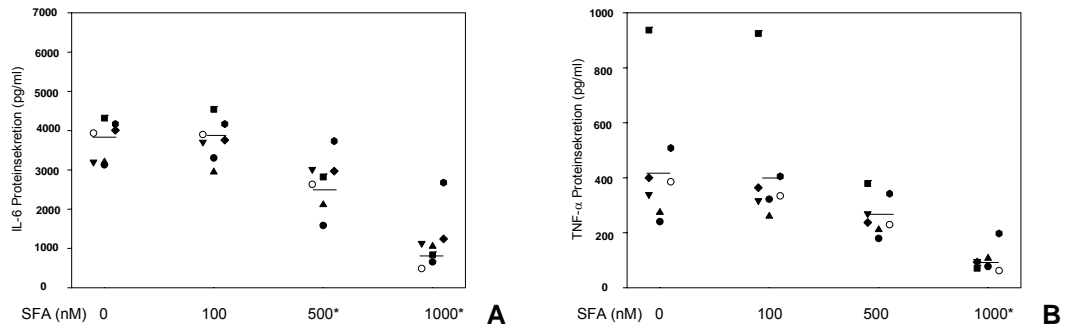


Abbildung 11: Zytokin-Sekretion unter LPS-Stimulation nach 24-stündiger Inkubation mit Zusatz von 0, 100, 500 und 1000 nM SFA, (A): IL-6, (B): TNF- α (*= $p < 0,05$ zwischen Kontrolle und SFA-Zusatz). Jeder Punkt entspricht einem individuellen Blutspender. Die Querstriche zeigen den jeweiligen Mittelwert an.

4.2. Der funktionelle Einfluss von SFA in Nabelschnurblutproben im Vergleich zu adultem Vollblut

Ziel der folgenden Untersuchung war die Charakterisierung der Unterschiede zwischen adultem Vollblut ($n=12$) und Nabelschnurblut ($n=17$) im Hinblick auf T-Zell-Proliferation, T-Zell-Effektorfunktion und den immunmodulatorischen Einfluss von SFA.

4.2.1. Untersuchung der T-Zell-Proliferation

Nach 48-stündiger Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation wurde eine vergleichbare T-Zell-Proliferation zwischen Erwachsenen und Neugeborenen beobachtet (Erwachsene: $27,02 \% \pm 8,43$; Neugeborene: $27,62 \% \pm 9,14$, $p=0,8$).

Bezüglich des Einflusses von SFA auf die T-Zell-Proliferation zeigte sich bei Nabelschnurblutproben eine signifikante Inhibition der T-Zell-Proliferation unter Zusatz von 500 nM SFA (43,6% der Kontrollgruppe, $p=0,005$) und 1000 nM SFA (30,4% der Kontrollgruppe, $p < 0,001$), die im Ausmaß des inhibitorischen Effektes keinen Unterschied zu adulten Vollblutproben zeigte (Abbildung 12).

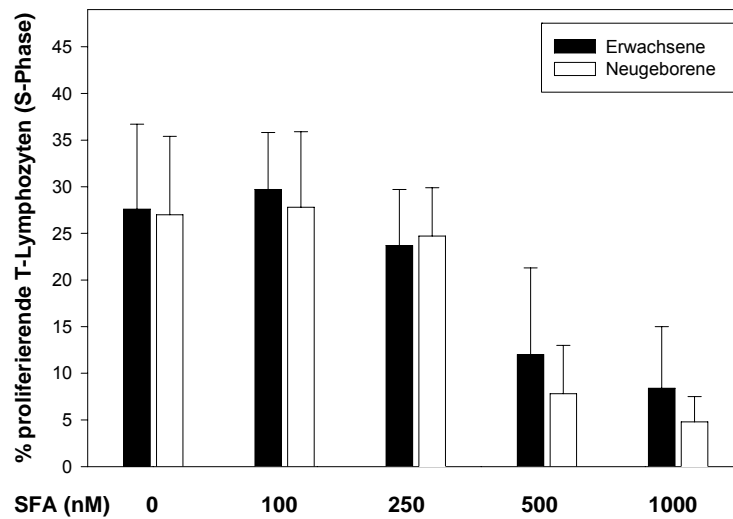


Abbildung 12: Vergleich der T-Zell-Proliferation nach Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation bei Erwachsenen und Neugeborenen unter Zusatz von 0, 100, 250, 500 und 1000 nM SFA. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert mit Standardabweichung.

4.2.2. Quantitative Analyse der Zytokin-Sekretion

Um die Wirkung verschiedener SFA-Konzentrationen auf Sekretionsebene zu untersuchen, asservierten wir von allen Proben vor UVID-Prozessierung Überstände, um die Zytokine IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α und IFN- γ nach 48-stündiger Costimulation mit Anti-CD3/Anti-CD28 mAb zu bestimmen. Hierzu verwendeten wir eine moderne Technologie zur simultanen Bestimmung der Zytokine aus einer Probe (Luminex, s. 3.4.).

4.2.2.1 IL-2

Nach 48-stündiger Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation waren hinsichtlich der IL-2-Sekretion keine signifikanten Unterschiede zwischen Erwachsenen und Neugeborenen zu beobachten (Erwachsene: 1296,9 pg/ml \pm 1361,2, Neugeborene: 1083,4 \pm 1990,2, p=0,121).

Bezüglich des Einflusses von SFA auf die IL-2-Sekretion zeigte sich bei Nabelschnurblutproben eine signifikante Inhibition unter Zusatz von 500 nM (MW: 396,1 pg/ml \pm 457,4, p=0,025) und 1000 nM SFA (MW: 425,9 pg/ml \pm 860,7, p=0,001), die im Ausmaß der inhibitorischen Wirkung keinen signifikanten Unterschied zu adulten Vollblutproben zeigte. Lediglich bei Gegenüberstellung der Ergebnisse von Erwachsenen und Neugeborenen unter 48 stündiger Inkubation mit 100 nM SFA (Erw.: n=6, MW: 1388,3 pg/ml; Ngb.: n=5, MW: 518,4 pg/ml, p=0,028) und 250 nM SFA (Erw.: n=6, MW 1743 pg/ml; Ngb.: n=5, MW 381,4 pg/ml, p=0,045) zeigte sich eine signifikante Inhibition bei Nabelschnurblutproben, die bei Erwachsenen nicht nachweisbar war (Abbildung 13). Unter Betrachtung der Einzelkinetiken über 24h, 48h, und 72h ist sowohl bei Neugeborenen, als auch Erwachsenen deskriptiv eine inhibitorische Wirkung bei Zusatz von 1000 nM SFA zu beobachten (Abbildung 14 A-D)

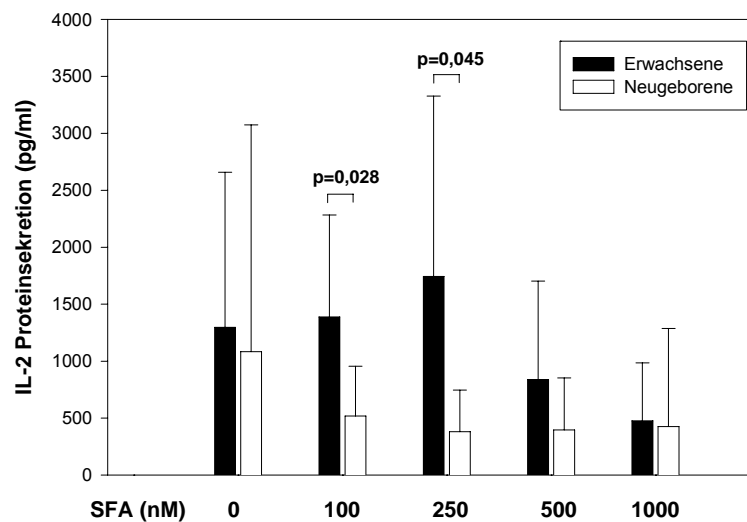


Abbildung 13: Vergleich der IL-2 Proteinsekretion nach Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation bei Erwachsenen und Neugeborenen unter Zusatz von 0, 100, 250, 500 und 1000 nM SFA. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert mit Standardabweichung.

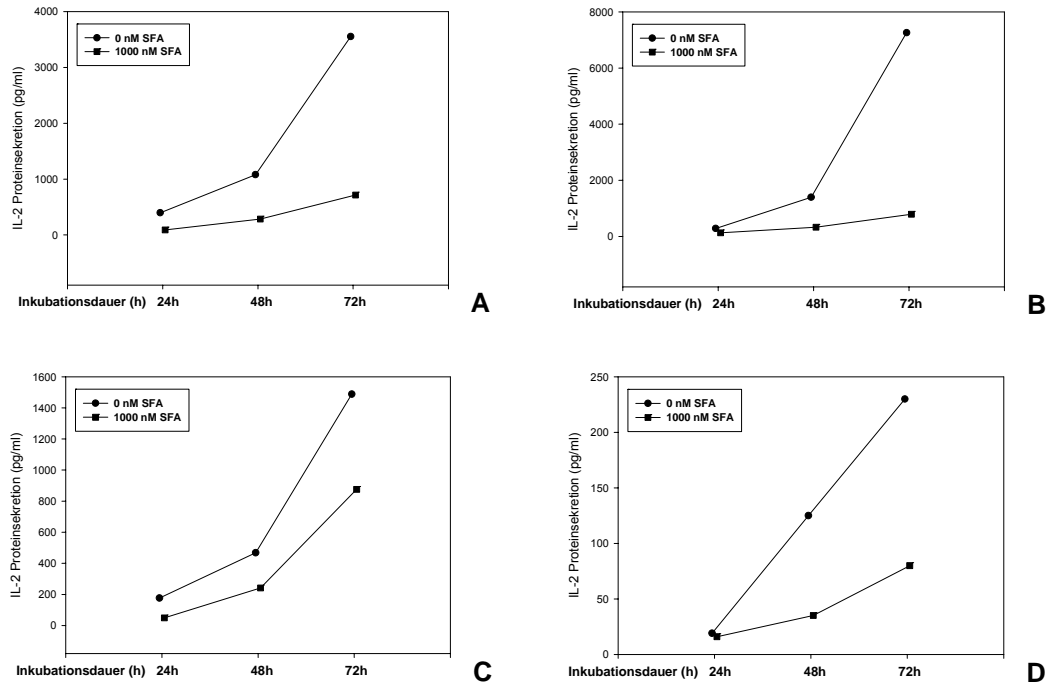


Abbildung 14: Einzelkinetiken der IL-2 Proteinsekretion nach Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation über die Zeit (24h, 48h, 72h), A+B: Erwachsene, C+D: Neugeborene.

4.2.2.2. IL-4

Nach 48-stündiger Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation war hinsichtlich der IL-4-Sekretion ein signifikanter Unterschied zwischen Erwachsenen und Neugeborenen zu beobachten (Erwachsene: $1208,1 \text{ pg/ml} \pm 739,5$, Neugeborene: $115,9 \pm 76,5$, $p < 0,001$).

Bezüglich des Einflusses von SFA auf die IL-4-Sekretion zeigte sich bei Nabelschnurblutproben eine signifikante Inhibition unter Zusatz von 1000 nM SFA (MW: $55,7 \text{ pg/ml} \pm 52,7$, $p = 0,001$), sowie zwischen 500 nM ($125,5 \text{ pg/ml} \pm 87$) und 1000 nM SFA ($p = 0,028$). Lediglich unter 48 stündiger Inkubation mit 100 nM SFA (Erw.: $n = 6$, MW 1343 pg/ml ; Ngb.: $n = 5$, MW: 99 pg/ml , $p = 0,018$) und 1000 nM SFA (Erw.: $n = 12$, MW $137,2 \text{ pg/ml}$; Ngb.: $n = 14$, MW $55,7 \text{ pg/ml}$, $p = 0,005$) fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen Erwachsenen und Neugeborenen (Abbildung 15).

Unter Betrachtung der Einzelkinetiken über 24h, 48h, und 72h ist sowohl bei Neugeborenen als auch Erwachsenen eine inhibitorische Wirkung bei Zusatz von 1000 nM SFA nachzuweisen (Abbildung 16 A-C).

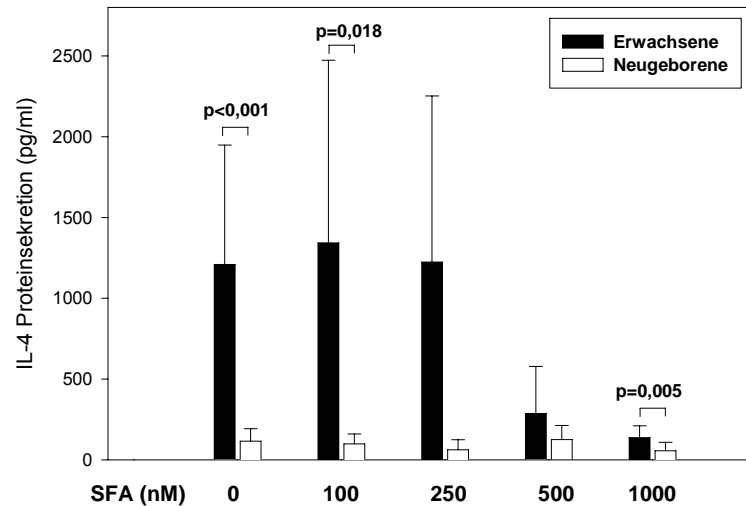


Abbildung 15: Vergleich der IL-4 Proteinsekretion nach Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation bei Erwachsenen und Neugeborenen unter Zusatz von 0, 100, 250, 500 und 1000 nM SFA. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert mit Standardabweichung.

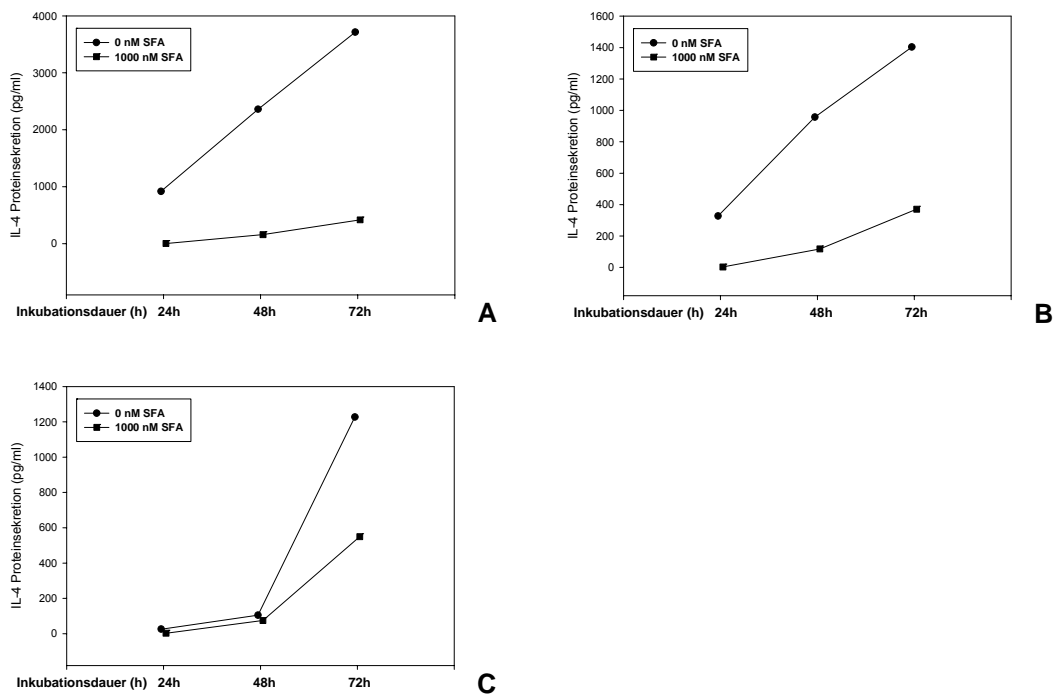


Abbildung 16: Einzelkinetiken der IL-4 Proteinsekretion nach Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation über die Zeit (24h, 48h, 72h), A+B: Erwachsene, C: Neugeborene.

4.2.2.3. IL-6

Nach 48-stündiger Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation war hinsichtlich der IL-6-Sekretion ein signifikanter Unterschied zwischen Erwachsenen und Neugeborenen zu beobachten (Erwachsene: $1382,5 \text{ pg/ml} \pm 717,2$, Neugeborene: $553,6 \pm 512,6$, $p=0,003$).

Bezüglich des Einflusses von SFA auf die IL-6-Sekretion zeigte sich bei Nabelschnurblutproben eine signifikante Inhibition unter Zusatz von 500 nM SFA (MW: $361,5 \text{ pg/ml} \pm 555,7$, $p=0,037$) und 1000 nM SFA ($229 \text{ pg/ml} \pm 381,4$, $p=0,001$). Bei Gegenüberstellung der Ergebnisse von Erwachsenen und Neugeborenen war unter Zusatz von 250 nM SFA (Erw.: $n=6$, MW $1446,7$; Ngb.: $n=5$, MW: $216,2$, $p=0,017$) und 1000 nM SFA (Erw.: $n=12$, MW $500,4$; Ngb.: $n=16$, MW 229 , $p=0,002$) ein signifikanter Unterschied zu beobachten (Abbildung 17). Unter Betrachtung der Einzelkinetiken über 24h, 48h, und 72h ist sowohl bei Neugeborenen als auch Erwachsenen eine inhibitorische Wirkung bei Zusatz von 1000 nM SFA zu beobachten (Abbildung 18).

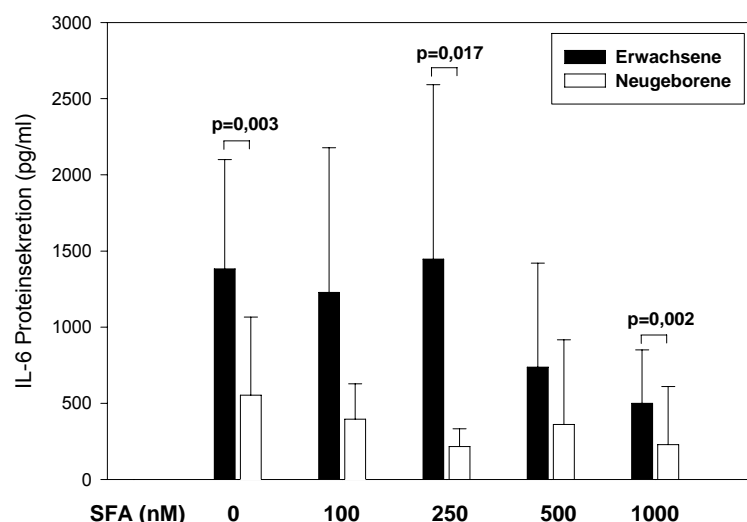


Abbildung 17: Vergleich der IL-6 Proteinsekretion nach Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation bei Erwachsenen und Neugeborenen unter Zusatz von 0, 100, 250, 500 und 1000 nM SFA. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert mit Standardabweichung.

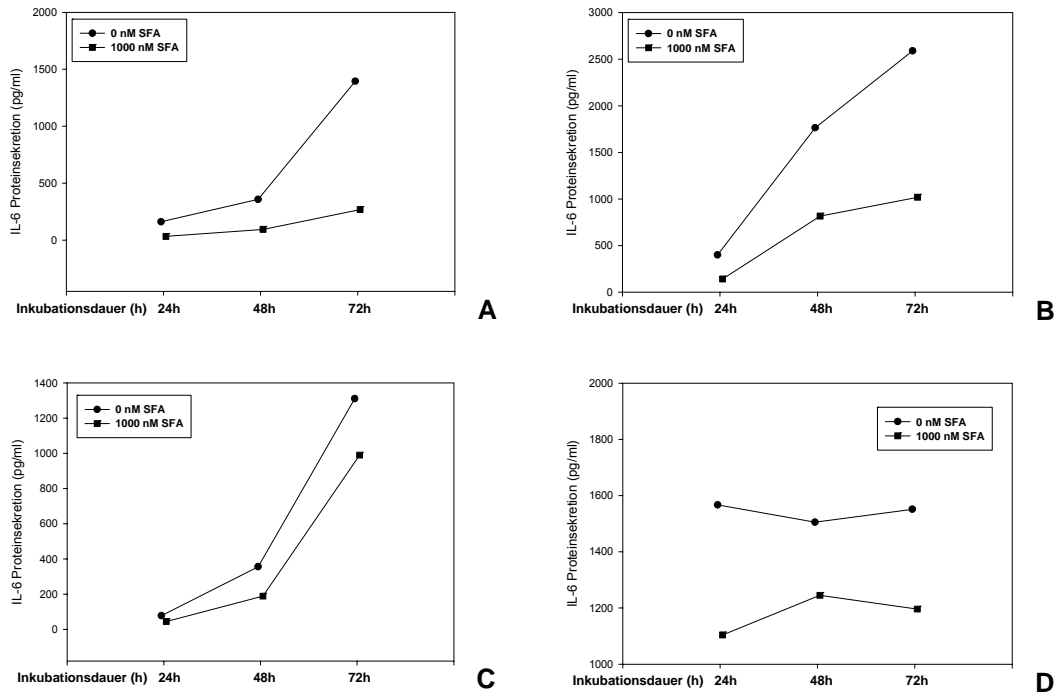


Abbildung 18: Einzelkinetiken der IL-6 Proteinsekretion nach Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation über die Zeit (24h, 48h, 72h), A+B: Erwachsene, C+D: Neugeborene.

4.2.2.4. IL-10

Die Fähigkeit zur Sekretion von IL-10 nach 48-stündiger T-Zell-Costimulation ist bei Neugeborenen deutlich geringer ausgeprägt als bei Erwachsenen (Erw.: $1335,3 \text{ pg/ml} \pm 1070$, Ngb.: $304,3 \text{ pg/ml} \pm 245$, $p < 0,001$).

Unter Betrachtung des Einflusses von SFA auf die IL-10-Sekretion zeigte sich bei Nabelschnurblutproben eine signifikante Inhibition unter Zusatz von 1000 nM SFA (MW: $196,3 \text{ pg/ml} \pm 205,9$, $p = 0,001$), sowie zwischen 500 nM ($173 \text{ pg/ml} \pm 275,4$) und 1000 nM SFA ($p = 0,005$). Bei Gegenüberstellung der Ergebnisse von Erwachsenen und Neugeborenen zeigte sich bei 48-stündiger Inkubation unter 100 nM SFA (Erw.: $n = 6$, MW 979 ; Ngb.: $n = 5$, MW: $280,4$, $p = 0,017$) und 250 nM SFA (Erw.: $n = 6$, MW $880,5$; Ngb.: $n = 5$, MW $269,8$, $p = 0,045$) ein signifikanter Unterschied (Abbildung 19). Unter Betrachtung der Einzelkinetiken über 24h, 48h, und 72h ist deskriptiv sowohl bei Neugeborenen, als auch Erwachsenen eine inhibitorische Wirkung bei Zusatz von 1000 nM SFA zu finden (Abbildung 20).

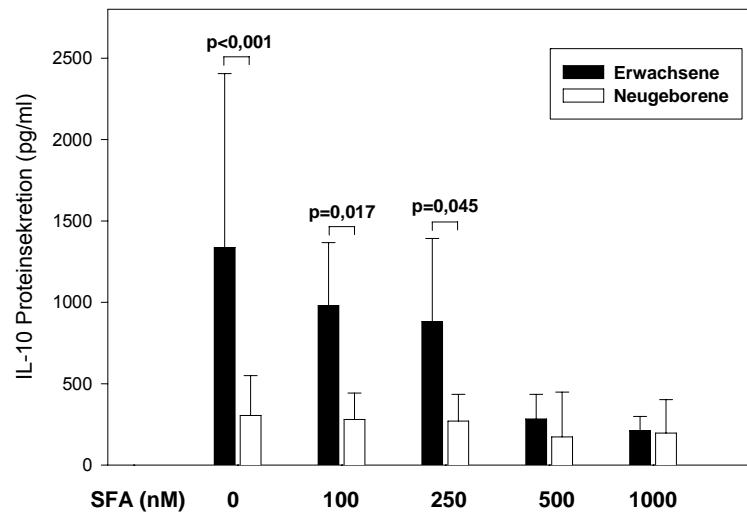


Abbildung 19: Vergleich der IL-10 Proteinsekretion nach Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation bei Erwachsenen und Neugeborenen unter Zusatz von 0, 100, 250, 500 und 1000 nM SFA. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert mit Standardabweichung.

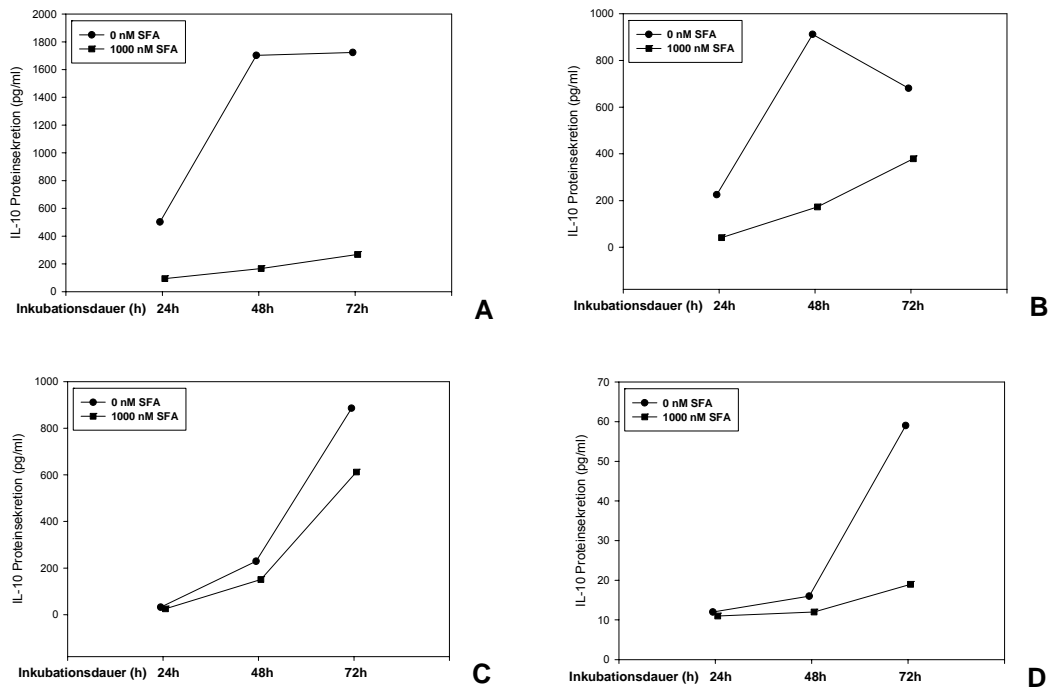


Abbildung 20: Einzelkinetiken der IL-10 Proteinsekretion nach Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation über die Zeit (24h, 48h, 72h), A+B: Erwachsene, C+D: Neugeborene.

4.2.2.5. TNF- α

Nach 48-stündiger Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation war die TNF- α -Sekretion bei Erwachsenen signifikant größer als bei Neugeborenen (Erwachsene: MW 902,1 pg/ml \pm 717,2/ Median: 707,5 pg/ml, Neugeborene: MW: 1003,9 pg/ml \pm 2345,4/ Median: 442,5 pg/ml, p=0,033).

Die TNF- α -Sekretion im Nabelschnurblut zeigte sich bei Zusatz von 500 nM SFA (MW: 251,7 pg/ml \pm 290,6, p=0,013) und 1000 nM SFA (MW: 205,1 pg/ml \pm 289,1, p=0,001) signifikant inhibiert. Bei Gegenüberstellung der Ergebnisse von Erwachsenen und Neugeborenen zeigte sich mit 100 nM SFA (Erw.: n=6, MW 771,5 pg/ml; Ngb.: n=5, MW 454,6 pg/ml, p=0,045), 250 nM SFA (Erw.: n=6, MW 831,5 pg/ml; Ngb.: n=5, MW 300 pg/ml, p=0,011) und 1000 nM SFA (Erw.: n=12, MW 364,1 pg/ml; Ngb.: n=15, MW 205,1 pg/ml, p=0,008) ein signifikanter Unterschied.

Unter Betrachtung der Einzelkinetiken über 24h, 48h, und 72h ist sowohl bei Neugeborenen als auch Erwachsenen eine inhibitorische Wirkung bei Zusatz von 1000 nM SFA nachzuweisen.

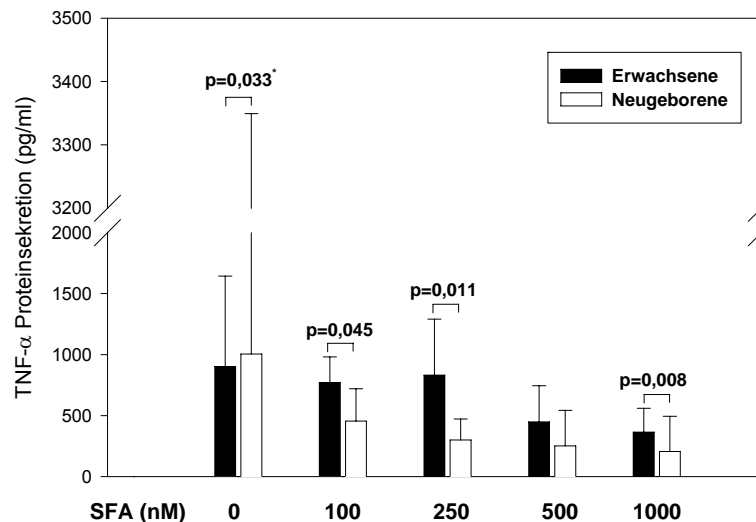


Abbildung 21: Vergleich der TNF- α Proteinsekretion nach Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation bei Erwachsenen und Neugeborenen unter Zusatz von 0, 100, 250, 500 und 1000 nM SFA. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert mit Standardabweichung. * = Darstellung der Mittelwerte, nach Median Erwachsene > Neugeborene (siehe Text S. 51).

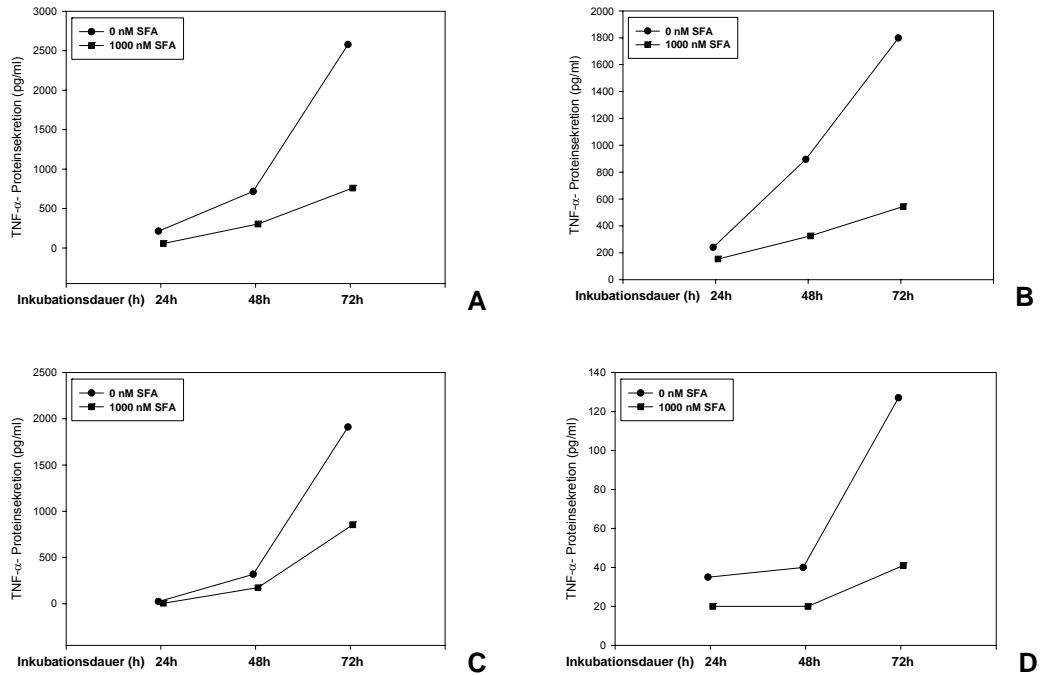


Abbildung 22: Einzelkinetiken der TNF- α Proteinsekretion nach Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation über die Zeit (24h, 48h, 72h), A+B: Erwachsene, C+D: Neugeborene.

4.2.2.6. IFN- γ

Die Fähigkeit zur Produktion von IFN- γ nach T-Zell-Costimulation ist bei Neugeborenen deutlich geringer ausgeprägt als bei Erwachsenen (Erw.: 3682,4 pg/ml \pm 2816,3, Ngb.: 1301,4 pg/ml \pm 3725, $p < 0,001$).

Die IFN- γ -Sekretion im Nabelschnurblut zeigte sich bei Zusatz von 500 nM SFA (MW: 192,9 pg/ml \pm 335,6, $p = 0,008$) und 1000 nM SFA (MW: 173,1 pg/ml \pm 501,8, $p = 0,001$) signifikant inhibiert. Bei Gegenüberstellung der Ergebnisse von Erwachsenen und Neugeborenen unter SFA-Zusatz zeigte sich mit 100 nM SFA (Erw.: $n = 6$, MW 2985,3 pg/ml; Ngb.: $n = 5$, MW 537,4 pg/ml, $p = 0,028$), 250 nM SFA (Erw.: $n = 6$, MW 2729,2 pg/ml; Ngb.: $n = 5$, MW 277,8 pg/ml, $p = 0,006$), 500 nM SFA (Erw.: $n = 8$, MW 1088,8 pg/ml; Ngb.: $n = 10$, MW 192,9 pg/ml, $p = 0,008$) und 1000 nM SFA (Erw.: $n = 12$, MW 561,8 pg/ml; Ngb.: $n = 16$, MW 173,1 pg/ml, $p < 0,001$) ein signifikanter Unterschied (Abbildung 23). Unter Betrachtung der Einzelkinetiken über 24h, 48h, und 72h zeigt sich sowohl bei Neugeborenen als auch Erwachsenen über den

gesamten Stimulationszeitraum eine deutliche inhibitorische Wirkung von 1000 nM SFA auf die IFN- γ -Sekretion (Abbildung 24).

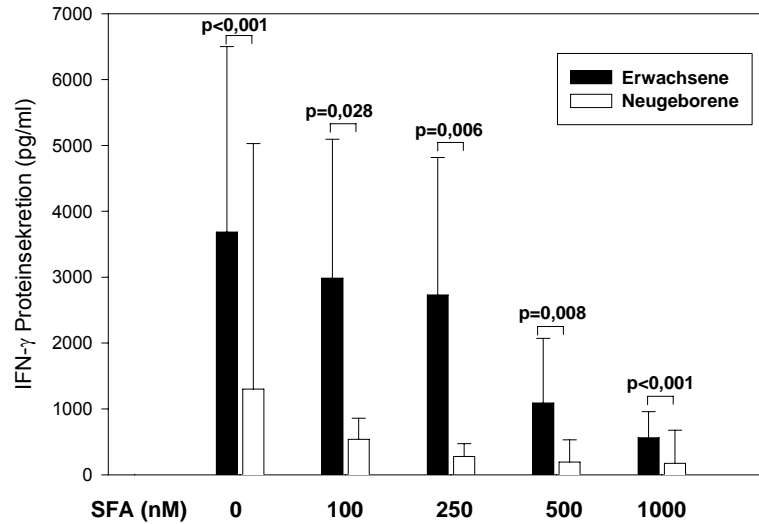


Abbildung 23: Vergleich der IFN- γ Proteinsekretion nach Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation bei Erwachsenen und Neugeborenen unter Zusatz von 0, 100, 250, 500 und 1000 nM SFA. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert mit Standardabweichung.

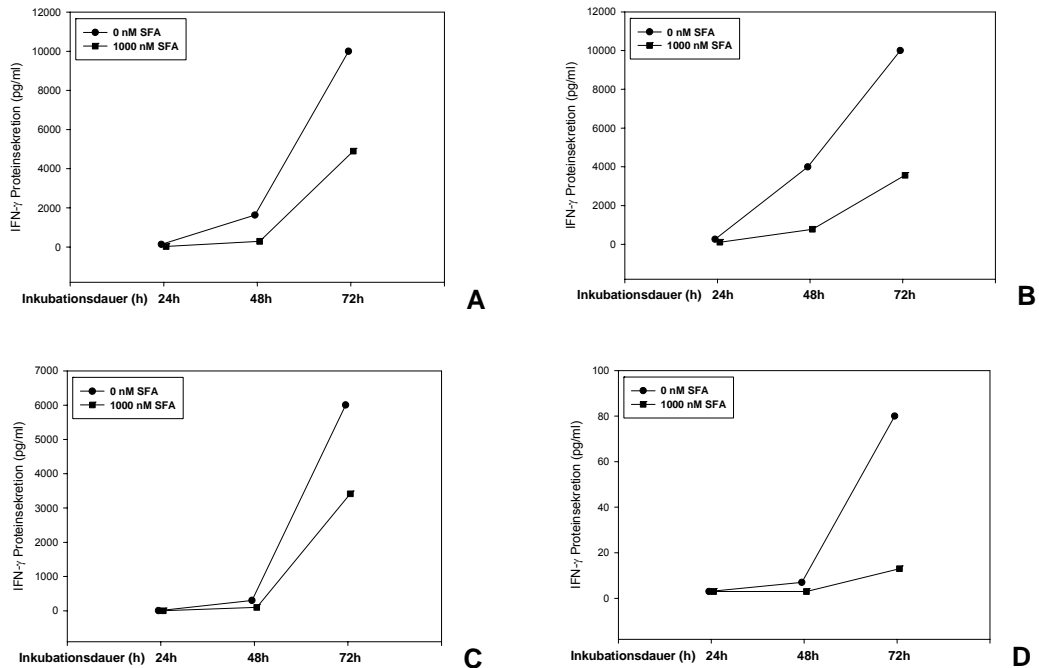


Abbildung 24: Einzelkinetiken der IFN- γ Proteinsekretion nach Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation über die Zeit (24h, 48h, 72h), A+B: Erwachsene, C+D: Neugeborene.

4.3. Untersuchung der Genotyp-assoziierten Effekte von SFA

In den vorherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass SFA einen deutlichen inhibitorischen Effekt auf die Bildung von IL-6 in aktivierten T-Lymphozyten und Monozyten aufweist. Um herauszufinden, ob der immunmodulatorische Effekt von SFA IL-6-Genotyp-assoziierte Unterschiede aufweist, untersuchten wir die IL-6 Proteinsekretion und IL-6 m-RNA-Expression nach 4-stündiger LPS-, bzw. 24-stündiger Anti-CD3/Anti-CD28-Stimulation unter SFA-Inkubation von Vollblut bei homozygoten Trägern des IL-6⁻¹⁷⁴Genotyp –C, bzw. –G- Allels (CC/n=10 bzw. GG/n=10).

4.3.1. Quantitative Analyse der IL-6-Proteinsekretion

4.3.1.1. IL-6-Protein-Sekretion in Vollblut-Monozyten

Nach 4-stündiger LPS-Stimulation zeigte sich eine über 1000-fach gesteigerte IL-6-Sekretion bei stimuliertem Vollblut im Vergleich zu unstimuliertem (unstimuliert: n=20, MW: 3,5 pg/ml, stimuliert: n=20, MW: 4975,9 pg/ml, p<0,001).

Die IL-6-Sekretion zeigte sich bei Zusatz von 1000 nM SFA deutlich inhibiert (p<0,001). Weder mit noch ohne SFA-Zusatz wurden signifikante Differenzen bei Genotyp-spezifischer Betrachtung offensichtlich (Tabelle 10). Tendenziell zeigt sich jedoch in diesem kleinen Kollektiv beim Genotyp IL-6⁻¹⁷⁴GG sowohl stimuliert, als auch unstimuliert, eine höhere IL-6-Sekretion als bei IL-6⁻¹⁷⁴CC. Die Gegenüberstellung der genotyp-spezifischen Inhibitions-Rationes (0/1000 nM SFA), die einen Anhalt dafür bietet, ob es bei einem Genotyp im Vergleich zum anderen zu einer stärkeren oder schwächeren Inhibition durch Zusatz von SFA kommt, zeigte keinen signifikanten Unterschied.

	Gesamt	IL-6 ⁻¹⁷⁴ CC	IL-6 ⁻¹⁷⁴ GG
0 nM SFA (pg/ml)	4975,9 ± 1970,6	4768,6 ± 1945,9	5183,1 ± 2077,4
1000 nM SFA (pg/ml)	2274,8 ± 1335,1	1889,8 ± 952,9	2659,8 ± 1589,2
Inhibition in %	44,3	60,4	48,7
p-Wert	<0,001	0,005	0,005

Tabelle 10: IL-6-Proteinsekretion mit Standardabweichung und prozentuale Inhibition nach LPS-Stimulation und 4-stündiger Inkubation ohne und mit Zusatz von 1000 nM SFA, Darstellung nach Gesamtkollektiv (n=20) und Genotyp (jeweils n=10).

4.3.1.2. IL-6-Protein-Sekretion in Vollblut-T-Lymphozyten

Nach 24-stündiger Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation wurde eine 200-fach gesteigerte IL-6-Sekretion im Vergleich zu unstimuliertem Vollblut nachgewiesen (unstimuliert: n=20, MW: 3,5 pg/ml, stimuliert: n=20, MW: 694,6 pg/ml, p<0,001).

Die IL-6-Sekretion zeigte sich bei Zusatz von 1000 nM SFA deutlich inhibiert (p<0,001) ohne signifikante Differenzen bei genotyp-spezifischer Betrachtung aufzuweisen (Tabelle 11). Auch hier wurde bei Betrachtung der Genotyp-spezifischen Inhibitions-Rationes (0/1000 nM SFA) kein Anhalt für Unterschiede in der Wirksamkeit von SFA gefunden.

	Gesamt	IL-6 ⁻¹⁷⁴ CC	IL-6 ⁻¹⁷⁴ GG
0 nM SFA (pg/ml)	694,6 ± 340	706,3 ± 334,8	682,8 ± 363
1000 nM SFA (pg/ml)	231,7 ± 159,5	218,8 ± 179,1	244,6 ± 145,9
Inhibition in %	66,6	60	64,2
p-Wert	<0,001	0,005	0,005

Tabelle 11. IL-6-Proteinsekretion mit Standardabweichung und prozentuale Inhibition nach Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation und 24-stündiger Inkubation ohne und mit Zusatz von 1000 nM SFA, Darstellung nach Gesamtkollektiv (n=20) und Genotyp (jeweils n=10).

4.3.1.3. Genotyp-spezifische Analyse der IL-6-Protein-Sekretion zwischen Monozyten und T-Lymphozyten

Die Untersuchung der genotyp-spezifischen Unterschiede in der IL-6-Sekretion zwischen Monozyten und T-Lymphozyten geht der Frage nach, ob die IL-6-Synthese durch SFA in Lymphozyten stärker gehemmt wird als in Monozyten oder umgekehrt.

Bei Genotyp-spezifischer Betrachtung der Inhibitions-Ratio (0/1000 nM SFA) unter LPS-Stimulation gegen die Inhibitions-Ratio (0/1000 nM SFA) unter Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Stimulation zeigte sich im Vergleich beim Genotyp ⁻¹⁷⁴GG ein signifikanter Unterschied ($p=0,022$), der bei ⁻¹⁷⁴CC nicht zu beobachten war.

4.3.2. Quantitative Analyse der IL-6-mRNA-Expression

4.3.2.1. IL-6-mRNA-Expression in Vollblut-Monozyten

Nach 4-stündiger LPS-Stimulation zeigte sich die IL-6-mRNA-Expression bei Zusatz von 1000 nM SFA deutlich inhibiert ($p<0,001$), wobei keine signifikanten Differenzen bei Genotyp-spezifischer Betrachtung aufgezeigt wurden (Tabelle 12). Auch die Gegenüberstellung der Genotyp-spezifischen Inhibitions-Rationen (0/1000 nM SFA), die einen Anhalt dafür bietet, ob es bei einem Genotyp im Vergleich zum anderen zu einer stärkeren oder schwächeren Inhibition durch Zusatz von SFA kommt, zeigte keinen signifikanten Unterschied.

	Gesamt	IL-6 ⁻¹⁷⁴ CC	IL-6 ⁻¹⁷⁴ GG
0 nM SFA	58279,5 ± 55135,4	62035,4 ± 46622,4	54523,5 ± 64904,5
1000 nM SFA	21081,2 ± 21620,3	22360,1 ± 21517,6	19930,2 ± 22808,1
Inhibition in %	63,8	64	63,4
p-Wert	<0,001	0,008	0,005

Tabelle 12. IL-6-mRNA-Expression (mRNA-Kopien/10⁶Kopien β -actin-mRNA) mit Standardabweichung und prozentuale Inhibition nach LPS-Stimulation und 4-stündiger Inkubation ohne und mit Zusatz von 1000 nM SFA, Darstellung nach Gesamtkollektiv (n=20) und Genotyp (jeweils n=10).

4.3.2.2. IL-6-mRNA-Expression in Vollblut-T-Lymphozyten

Nach 24-stündiger Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation zeigte sich die IL-6-mRNA-Expression bei Zusatz von 1000 nM SFA tendenziell inhibiert (Tabelle 13). Auch hier zeigten sich keine Unterschiede bei Betrachtung der Genotyp-spezifischen Inhibitions-Rationes (0/1000 nM SFA).

	Gesamt	IL-6 ⁻¹⁷⁴ CC	IL-6 ⁻¹⁷⁴ GG
0 nM SFA (Kopien)	15551,2 ± 26306,8	10317,4 ± 12082,1	20785 ± 35413,8
1000 nM SFA (Kopien)	10672,4 ± 15016,3	5475,4 ± 5698,5	15869,4 ± 19644,9
Inhibition in %	31,4	46,9	23,6
p-Wert	ns	ns	ns

Tabelle 13. IL-6-mRNA-Expression (Kopien/10⁶Kopien β -actin) mit Standardabweichung und prozentuale Inhibition nach Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation und 24-stündiger Inkubation ohne und mit Zusatz von 1000 nM SFA, Darstellung nach Gesamtkollektiv (n=20) und Genotyp (jeweils n=10). ns=nicht signifikant.

4.3.2.3. Genotyp-spezifische Analyse der IL-6-mRNA-Expression zwischen Monozyten und T-Lymphozyten

Die Untersuchung der Genotyp-spezifischen Unterschiede in der IL-6-mRNA-Expression zwischen Monozyten und T-Lymphozyten geht der Frage nach, ob die IL-6-mRNA-Synthese durch SFA in Lymphozyten stärker gehemmt wird als in Monozyten oder umgekehrt.

Bei genotyp-spezifischer Betrachtung der Inhibitions-Ratio (0/1000 nM SFA) unter LPS-Stimulation gegen die Inhibitions-Ratio (0/1000 nM SFA) unter Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation zeigte sich im Vergleich beim Genotyp ⁻¹⁷⁴GG ein signifikanter Unterschied ($p=0,038$), der bei ⁻¹⁷⁴CC nicht zu beobachten war.

5. DISKUSSION

Vollblutstimulationstest

Rapamycin, FK 506 und Cyclosporin A stellen effiziente Immunsuppressiva zur Therapie einer Vielzahl klinischer Krankheitsbilder (z.B. Autoimmunerkrankungen, Verhinderung der Transplantatabstoßung) dar. Allerdings ist zum einen die breite Anwendung dieser Medikamente durch toxische Nebenwirkungen limitiert⁽¹⁰⁾, zum anderen reduziert der erwünschte Effekt der Immunsuppression die körpereigene Immunabwehr und macht den Patienten empfänglich für Krankheitserreger. Daher wäre es wünschenswert, ein effektives Immunsuppressivum mit großer therapeutischer Breite zur Verfügung zu haben, das eine Immunsuppression ohne toxische Nebenwirkungen und mit minimalem Risiko für opportunistische Infektionen ermöglicht. SFA stellt eine neue Substanzklasse der Immunsuppressiva dar, dessen Wirkmechanismus sich von den gängigen Substanzen unterscheidet. Nahezu alle Untersuchungen, die sich mit SFA beschäftigen, wurden an isolierten Zell-Linien (Jurkat-Zellen, Tumor-Zelllinien) durchgeführt^(2,98,108,110,112,111). In der hier vorliegenden Arbeit wurde ein Vollblutstimulationstest verwendet, der ein in-vivo nahes Modell zur Evaluation von pharmakodynamischen Effekten von SFA ermöglicht. Vorteile des Vollblutstimulationstests gegenüber Experimenten an isolierten Immunzellen umfassen a) die Präsenz von allen Faktoren, die für die Aktivierung von Immunzellen verantwortlich sind, in physiologischen Konzentrationen und b) die Vermeidung einer möglichen Voraktivierung der Immunzellen durch Zellisoliationsprozesse. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Voraktivierung von PBMC (peripheral blood mononuclear cells) durch deren Separation aus Vollblut mit Steigerung der IL-2, IL-4 und TNF- α -mRNA-Expression erfolgt^(22,46,47). Ziel unserer Untersuchungen war es, den funktionellen Effekt von SFA auf verschiedenen Ebenen der T-Lymphozyten-Funktion (Proliferation, Zytokin-mRNA-Expression, Zytokin-Sekretion) und Monozyten-Funktion (Zytokin-mRNA-Expression und Zytokin-Sekretion) im Vollblutansatz darzustellen.

Der Einfluss von SFA auf Funktion und Proliferation adulter T-Lymphozyten

Nach T-Zell-Costimulation mittels Anti-CD3/Anti-CD28-mAb zeigte sich im Vollblutstimulationstest (1) eine zeit- und dosisabhängige Abnahme der Proliferationsaktivität von adulten T-Zellen, (2) eine signifikante Inhibition der IL-2 mRNA Expression nach 4-stündiger Inkubation und der IL-4 und IL-6 mRNA Expression nach 4h und 24h, aber nicht von TNF- α , und (3) eine dosisabhängige, signifikante Hemmung der IL-2 und IL-6-Proteinsekretion unter SFA, aber nicht von TNF- α . Allerdings wurde im Rahmen der Untersuchungen zur Zytokin-Proteinsekretion nach 48h und 72h bei Erwachsenen und Neugeborenen eine signifikante Inhibition aller untersuchten Zytokine (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ) bei Zusatz von 1000 nM SFA offensichtlich (s.u.).

Die S-Phase des Zellzyklus (auch tetraploide Phase) stellt den entscheidenden Zeitpunkt der Proliferationsaktivität der Zellen dar. Vorangegangene Arbeiten postulieren, dass die immunsuppressive Wirkung von SFA auf eine G₁-Zellzyklusblockade zurückzuführen ist ^(2,112,111). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen den antiproliferativen Effekt von SFA auf dieser Ebene. Theoretisch ist es jedoch auch möglich, dass SFA eine toxische Wirkung auf die T-Zellen ausübt und damit durch Apoptose oder Nekrose einen Übergang in die S-Phase verhindert. Verschiedene Verfahren zur Analyse von Apoptose/Nekrose sind in der Literatur beschrieben ^(1,29,39). Wir konnten zeigen, dass der Effekt der G₁-Zellzyklusblockade bis zu einer Konzentration von 5 μ M SFA nicht T-Zell-toxisch bedingt ist und unterstreichen damit vorangegangene Untersuchungen ^(98,112).

Bezüglich der Wirkung von SFA auf Transkription und Proteinsekretion von Zytokinen herrscht in der Literatur Uneinigkeit. Während Zenke und Mitarbeiter keinen Effekt auf die IL-2 Transkription und Proteinsekretion fanden ⁽¹¹⁰⁾, beschrieben Zhang und Mitarbeiter eine Stimulation der IL-2 Transkription ohne Effekt auf die IL-2 Sekretion ⁽¹¹¹⁾. Allerdings basierten diese Untersuchungen auf Experimenten mit immortalen Jurkat T-Zellen

unter Verwendung von PMA/Ionomycin als Stimulanz, welches T-Zellen ohne Vermittlung des T-Zell-Rezeptors (TCR) aktivieren kann, so dass die Diskrepanz zu unseren Ergebnissen und denen von Allen und Mitarbeitern ⁽²⁾, die ebenfalls eine Inhibition der IL-2 Sekretion unter SFA beschreiben, erklärbar ist.

Die inhibitorische Wirkung von SFA auf die Zytokin-mRNA-Expression in T-Zellen ähnelt in dem hier verwendeten Vollblutssystem dem Effekt von CsA und FK506 ^(48,49). Allerdings wird die Immunsuppression durch CsA und FK506 in erster Linie durch die Inhibition der Phosphatase-Aktivität von Calcineurin und damit des Transkriptionsfaktors NFAT hervorgerufen, wodurch es zu einer Hemmung des IL-2-Promotors kommt ^(21,63). SFA hat im Gegensatz dazu keinen Effekt auf Calcineurin ⁽¹¹⁰⁾. Zusätzlich konnten Zhang und Mitarbeiter in ihrer Arbeit zeigen, dass SFA stattdessen sogar eine Aktivierung von NFAT und NF κ B (Transkriptionsfaktor für proinflammatorische Zytokine) bewirkt ^(111,112), so dass postuliert werden muss, dass für die Inhibition der Zytokinsekretion alternative Signalwege eine Rolle spielen. Weiterhin beschreiben die Autoren, dass es NF κ B-vermittelt zur Aktivierung der Transkription von p53 kommt und damit eine Expressionssteigerung von Protein p21 hervorgerufen wird. Dieses bewirkt eine Inhibition der G₁-Kinase CyclinE-Cdk2 und damit eine G₁-Zellzyklusblockade. NF κ B wird üblicherweise als Antwort auf eine DNA-Schädigung aktiviert und vermittelt daraufhin die Aktivierung der p53-Transkription ^(51,99). Zhang und Mitarbeiter konnten allerdings zeigen, dass SFA keinen Effekt auf die Integrität der genomischen DNA hat, so dass die Aktivierung von NF κ B auf anderem Wege erfolgen muss. Zusammenfassend postulieren die Autoren, dass der Effekt von SFA p53-abhängig vermittelt wird ⁽¹¹²⁾.

Ein weiterer Aspekt der Wirksamkeit von SFA wurde durch die Untersuchungen der Arbeitsgruppen von Steinschulte und Woltmann dargestellt ^(98,108). Diese beschreiben den inhibitorischen Effekt von SFA auf LPS-stimulierte humane dendritische Zellen (DC). So zeigte sich eine Hemmung der Antigen-Aufnahme in DC, sowie der IL-12-p70- und TNF- α -Sekretion, ohne die DC-Vitalität zu beeinflussen. Weiterhin inhibiert SFA die Expression des Adhäsionsrezeptors von DC (DC-SIGN), der eine Rolle in der

Virusreplikation spielt, so dass die Autoren folgern, dass SFA auch in der antiviralen Therapie wirksam sein könnte. Antigen-präsentierende Zellen (APC), wie DC, Monozyten und B-Zellen, prozessieren Antigene und stellen diese an ihrer Oberfläche dar (MHC I, MHC II). Diese Antigene werden von T-Zellen erkannt und bewirken deren zytokinvermittelte Aktivierung und Differenzierung in spezifische T-Zellen wie zytotoxische T-Zellen (CD8⁺/MHC I) und T-Helfer-Zellen (CD4⁺/MHC II, T_H1, T_H2). Eine Hemmung der Antigenpräsentation in DC oder auch Monozyten beeinträchtigt die Stimulation und Proliferation von T-Zellen und kann somit eine immunologische Antwort des erworbenen, spezifischen Immunsystems modulieren. Aufgrund dieser Beobachtungen untersuchten wir die Wirkung von SFA auf Monozyten.

Der Einfluss von SFA auf die Funktion von Monozyten im Vollblutstimulationstest

Unter Betrachtung der LPS-stimulierten Monozyten konnten wir im Vollblutstimulationstest (1) eine signifikante, zeit- und dosisabhängige Inhibition der IL-6- und TNF- α -mRNA Expression nach 4h und 24h, sowie (2) eine signifikante, dosisabhängige Abnahme der IL-6- und TNF- α -Proteinsekretion zeigen. Diese Ergebnisse sind neu und unterstreichen den bisher einzigartigen antiinflammatorischen Wirkmechanismus von SFA, da alle etablierten Immunsuppressiva überwiegend auf T-Zell-Ebene wirken. Die Wirksamkeit von SFA an Tumorzelllinien und dendritischen Zellen wurde durch andere Arbeitsgruppen dargestellt ^(98,108,112). Während die Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation eine TCR-vermittelte, spezifische Aktivierung des erworbenen, zellulären Immunsystems bewirkt, stimuliert LPS unspezifisch die angeborene Immunabwehr. Unter Berücksichtigung unserer Ergebnisse können wir postulieren, dass es auf Monozyten-Ebene einen anderen, nicht NF κ B-vermittelten Mechanismus zur Aktivierung geben muss, der durch SFA gehemmt wird. Die Wirksamkeit von SFA sowohl auf T-Zell-Ebene (immunsuppressiv), als auch auf Monozyten-Ebene (antiinflammatorisch) würde neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen.

Untersuchung der Effekte von SFA in Nabelschnurblut gesunder Neugeborener

Die Ontogenese des Immunsystems beginnt bereits früh während der Embryonalzeit und ist erst einige Jahre nach Geburt abgeschlossen. Die keimfreie Umgebung während der intrauterinen Entwicklungsperiode bedingt eine fehlende Auseinandersetzung der Immunabwehr mit Krankheitserregern, so dass insbesondere das spezifische, zelluläre Immunsystem (T-Zellen, B-Zellen) aufgrund fehlender Antigenexposition noch untrainiert und „physiologisch unreif“ ist. In zunehmendem Maße wird allogenes Nabelschnurblut statt Knochenmark zur haematopoetischen Rekonstitution für eine Vielzahl maligner hämatologischer Erkrankungen verwendet, da klinische Daten eine geringere Inzidenz von „Graft-versus-host“-Reaktionen (GVHD) nach Transplantation aufgrund der Immuninkompetenz von Nabelschnurblut beschreiben ^(66,72,84). Der pathophysiologische Prozess des GVHD wird dabei insbesondere durch zytotoxische T-Zellen (CD8⁺) und proinflammatorische Zytokine vermittelt, die die Organe des Empfängers schädigen ⁽⁷⁾.

Um den Effekt von SFA auf das erworbene Immunsystem weiter zu beleuchten, untersuchten wir Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-costimuliertes Erwachsenenblut gesunder Probanden im Vergleich zu Nabelschnurblut gesunder Neugeborener (Proliferation, Zytokinsekretion) und stellten diese Ergebnisse gegenüber. Unsere Arbeit ist die erste, die die Wirkung von SFA auf natives Vollblut (Nabelschnurblut) unter der Vorstellung untersucht, dass der Einfluss von SFA auf ein „immun-naives“ System dargestellt werden kann.

Wir konnten zeigen, dass eine physiologische Unreife im Sinne einer verminderten Zytokin-Protein-Sekretion bei IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α und IFN- γ , aber nicht bei IL-2 nach Anti-CD3/Anti-CD28 Costimulation bei Neugeborenen im Vergleich zu Erwachsenen evident ist, die Proliferationsaktivität von T-Lymphozyten jedoch keinen Unterschied aufweist.

Um die wirksame Konzentration von SFA auf T-Lymphozyten im Vollblutansatz zu evaluieren, setzten wir unterschiedliche SFA-

Konzentrationen ein und untersuchten die Proben nach Inkubation von 24h, 48h und 72h. Wir konnten zeigen, dass es (1) sowohl bei Erwachsenen als auch bei Neugeborenen zu einer signifikanten Hemmung der Proliferation von T-Lymphozyten bereits bei SFA-Konzentrationen von 500 nM SFA kommt, die zwischen 500 nM und 1000 nM SFA bei Erwachsenen nicht-signifikant und bei Neugeborenen signifikant weiter zunimmt. (2) Bei allen gemessenen Zytokinen zwischen 0 nM und 1000 nM SFA zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zytokin-Proteinsekretion, wobei (3) bei Neugeborenen zwischen 500 nM und 1000 nM SFA eine dosisabhängige Abnahme der gemessenen Zytokine zu beobachten ist, während (4) bei Erwachsenen eine signifikante Abnahme von IL-2, IL-4 und IFN- γ und eine tendenzielle Inhibition der übrigen gemessenen Zytokine deutlich wird.

Diese Ergebnisse unterstützen die Daten zur Proliferationshemmung von T-Zellen bei Erwachsenen unter SFA und zeigen, dass SFA auch im Neugeborenenblut wirksam ist. McDouall und Mitarbeiter untersuchten in ihrer Arbeit die Wirksamkeit von CsA auf PHA-stimulierte Lymphozyten im Nabelschnurblut und verglichen diese mit Erwachsenenblut ⁽⁷⁵⁾. Hier zeigte sich beim Nabelschnurblut nach Stimulation eine deutliche IL-2-Produktion, die aber bereits bei niedrigeren CsA-Konzentrationen als bei Erwachsenen inhibiert wurde. Die Autoren schlussfolgerten, dass CsA bei Neugeborenen in niedrigeren Dosierungen als den herkömmlichen Richtwerten bei Erwachsenen effektiv immunsuppressiv wirksam ist. Bei Betrachtung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lässt sich tendenziell eine Reduktion der IL-2-, IL-4-, IL-6-, IL-10-, TNF- α - und IFN- γ -Sekretion in Nabelschnurblutproben bereits bei Zusatz von 100 nM SFA beobachten, während diese Konzentration bei Erwachsenen sogar zu einem Anstieg der IL-2- und IL-4-Sekretion zu führen scheint (Erwachsene: n=6; Neugeborene: n=5). Die vorangegangenen Untersuchungen zur Zytokin-mRNA und Proteinsekretion bei Erwachsenen nach Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation zeigten für TNF- α nach 24h keine signifikante Inhibition, die nun allerdings nach 48h und 72h offensichtlich wird. Diese im Vergleich zu IL-2, IL-4 und IL-6 längere Inhibitionskinetik könnte möglicherweise ein Hinweis darauf sein, dass die Inhibition von TNF- α durch SFA über einen anderen Wirkmechanismus vermittelt wird als bei den übrigen untersuchten Zytokinen.

Die Evaluation der Normwerte von Zytokinen bei Neugeborenen stellt sowohl aus diagnostischen als auch therapeutischen und wissenschaftlichen Überlegungen heraus ein wichtiges Ziel der Grundlagenforschung dar. Unter Betrachtung unserer Kontrollgruppen nach Anti-CD3/Anti-CD28-Costimulation ohne SFA-Zusatz zeigten sich bei allen untersuchten Zytokinen außer IL-2 eine signifikant niedrigere Sekretion im Nabelschnurblut im Vergleich zu Erwachsenen. Obwohl wir die Wirksamkeit von SFA sowohl bei Erwachsenen als auch bei Neugeborenen durch die signifikante Inhibition der T-Zell-Proliferation belegen konnten, stellt sich insbesondere die Frage, inwiefern sich unter Betrachtung eines postulierten SFA-Wirkmechanismus das Immunsystem des Neugeborenen vom adulten System unterscheidet und ob SFA aufgrund seiner Wirksamkeit sowohl in der zellulär-erworbenen (T-Zellen, B-Zellen) als auch in der angeborenen (Monozyten, proinflammatorische Zytokine) Immunabwehr bei anderen Erkrankungen, wie zum Beispiel der neonatalen Sepsis, zur Anwendung kommen könnte. Bei Fokussierung auf die T-Zell-Rezeptor-vermittelte Aktivierung von Lymphozyten im Vergleich zwischen Neugeborenen und Erwachsenen lässt sich allerdings keine Aussage treffen, ob SFA auch im „immun-naiven“ Blut eine inhibitorische Wirkung auf Zellen der angeborenen Immunabwehr hat. Die Untersuchungen am Erwachsenen-Kollektiv zeigen diesen Effekt, der am Nabelschnurblut durch weitere Untersuchungen beispielsweise an Monozyten zu charakterisieren sein wird.

Obwohl es zahlreiche Studien zu Zytokinen bei Neugeborenen gibt, ist die Interpretation der vorliegenden Daten schwierig. Grund hierfür sind die zahlreichen unterschiedlichen Methoden zur Bestimmung von Zytokin-mRNA-Expression, -Proteinsekretion, beziehungsweise zur Untersuchung von proliferativen Eigenschaften unter verschiedenen Stimulanzen. So variieren Zielmedium (gereinigte Blutzellen, Zelllinien, Vollblutansatz), Nachweismethoden (FACS[®], ELISA, Bioassays, PCR) und die eingesetzten Stimulanzen sowohl in Konzentration als auch in Substanz (dendritische Zellen, Phorbol12-myristate 13-acetate (PMA)/Ionomycin, Monensin, Concanavalin A (Con A), Anti-CD3- und andere AK-Costimulation, LPS, Zytokine, gemischte Lymphozytenreaktion (mixed lymphocyte culture/ MLC), Staphylococcus Enterotoxin B (SEB), verschiedene Bakterienstämme)

(4,8,13,16,15,18,19,24,30,31,37,45,57,58,61,65,74,83,89,91,92,94,113). Auch aufgrund der niedrigen Fallzahlen, die in den einzelnen Studien untersucht wurden, ist eine definitive Aussage schwierig.

Selbst bei grundsätzlich ähnlichen Versuchsansätzen können sich die Ergebnisse unterscheiden, wenn die Autoren beispielsweise unterschiedliche Konzentrationen zur Stimulation einsetzen ⁽⁵⁷⁾. So untersuchten sowohl Chalmers und Mitarbeiter als auch Chipeta und Mitarbeiter intrazelluläre Zytokin-Profile bei Nabelschnurblut und Erwachsenen mittels Ein-Zell-3-Farben-FACS-Analyse nach PMA/Ionomycin-Stimulation ^(13,16). Während Chalmers und Mitarbeiter unter PMA-Zusatz von 5 ng/ml IL-2, IL-4, IFN- γ und TNF- α bei Nabelschnurblut in niedrigeren Konzentrationen fanden als bei Erwachsenen, und dieses unter anderem auf die hohe Anzahl naiver T-Zellen zurückführten (CD4⁺CD45RA⁺-Zellen), beschrieben Chipeta und Mitarbeiter bei Stimulation mit 30,8 ng/ml PMA eine normale bis vergleichbar hohe IL-2 Sekretion bei ebenfalls niedriger, vor allem NK-Zell-abhängiger IFN- γ Sekretion. Interessanterweise publizierten Anderson und Mitarbeiter in ihrer Arbeit unter Stimulation mit 0,5 μ M Ionomycin und 1 ng/ml PMA bei Nabelschnurblut eine deutlich verminderte Anzahl von IL-4- und IFN- γ -produzierenden Zellen bei gleicher IL-2-Sekretion im Vergleich zu Erwachsenen ⁽⁴⁾. Schultz und Mitarbeiter hingegen zeigten in ihren Untersuchungen eine im Vergleich zu Chalmers Ergebnissen noch deutlich niedrigere IL-2 und IFN- γ Sekretion im Vollblutansatz und kommentierten die Arbeit von Chalmers und Mitarbeiter dahingehend, dass im Rahmen der intrazellulären Markierung adäquate Negativkontrollen verwendet werden müssen, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden ⁽⁹¹⁾.

Durchaus problematisch stellen sich in der Literatur einige Versuchsansätze dar. So stellt beispielsweise die alleinige Stimulation mit monoklonalem Anti-CD3-Antikörper ⁽¹⁶⁾ eine unzureichende Stimulation dar, da es ohne Costimulation mittels monoklonalem Anti-CD28-Antikörper zur Induktion einer T-Zell-Anergie kommt. Dieser Versuchsaufbau ist adäquat, wenn man beispielsweise der Frage nachgehen möchte, welche transkriptionalen und sekretorischen Erfolge durch Anergie-Induktion eintreten. Zur Betrachtung einer kinetischen T-Zell-Aktivierung ist er nur bedingt geeignet.

Zur Untersuchung von immunologischen Vorgängen werden häufig isolierte Zellen, beispielsweise PBMC oder Zelllinien, verwendet. Zur elementaren Klärung von Fragen nach Signaltransduktion und isolierten Immunabwehrvorgängen sind solche Studien notwendig. Allerdings darf man nicht außer acht lassen, dass das Immunsystem ein komplex verknüpftes, interagierendes Netz von zahlreichen Zellen und Botenstoffen darstellt, das sich möglicherweise in seiner additiven Wirkung erheblich von isolierten Betrachtungen unterscheidet und in vitro am ehesten durch den Vollblutansatz abzubilden ist. Limitierend gilt allerdings beim Vollblutansatz die Tatsache, dass es trotz TCR-vermittelter Stimulation durchaus zu einer sekundären Aktivierung von Monozyten nach T-Zell-Aktivierung kommen kann. Monozyten ihrerseits sind in der Lage, durch Zell-Zell-Interaktion T-Zellen zu aktivieren.

Durch Isolationsvorgänge kann es zum einen zu einer ungewollten Aktivierung von T-Zellen kommen ^(22,46,47), zum anderen fehlen in diesen isolierten Versuchsansätzen antigenpräsentierende Zellen (APC) als wichtige Induktoren einer Immunantwort. Die Wirkung von SFA auf APC wurde oben bereits dargestellt. Insofern sind die Ergebnisse von Matthews und Mitarbeitern interessant, die in ihrer Arbeit postulierten, dass nur durch dendritische Zellen (DC) eine optimale Aktivierung von naiven T-Zellen möglich ist. Die Autoren schlussfolgern, dass die geringere Inzidenz der GVHD nach Transplantation von neonatalen Stammzellen aus Nabelschnurblut die Folge einer APC-Insuffizienz ist ⁽⁷⁴⁾. Woltmann und Mitarbeiter zeigten in ihrer Arbeit, dass Makropinozytose, Lectin-vermittelte Endozytose und Expression der zur Antigen-Aufnahme notwendigen Rezeptoren bei DC unter SFA inhibiert werden ⁽¹⁰⁸⁾. Somit könnte Sanglifohrin also durchaus insbesondere auch im Rahmen der Nabelschnurblut-Transplantation effektiv wirksam sein.

-Ausblick-

Genotyp-bedingter Einfluss von Immunsuppressiva (IL-6⁻¹⁷⁴ G→C)

Neben phenotypischen (klinischen) Faktoren spielen zunehmend genetische Risikoprofile eine Rolle bei Prädiktion von Krankheiten, Diagnostik und Monitoring der Therapie. So wurden im Rahmen der kürzlich abgeschlossenen Sequenzierung des humanen Genoms 32000 Gene und 7 Millionen Genvariationen (Polymorphismen) identifiziert, von denen aber wohl nur wenige funktionell relevant sind. Unter Betrachtung des IL-6 Gens entdeckten Fishman und Mitarbeiter in der Promotorregion an Position -174 einen klinisch relevanten Polymorphismus (G→C), der mit einer niedrigeren in-vitro und in-vivo IL-6-Produktion bei Vorliegen des ⁻¹⁷⁴C-Allel vergesellschaftet war ⁽³⁵⁾. Marshall und Mitarbeiter beschrieben weiterhin, dass der ⁻¹⁷⁴CC-Genotyp des Organspenders mit einem signifikant höherem Risiko für akute Abstoßungsreaktionen nach allogener Nierentransplantation in der Frühphase nach Transplantation assoziiert ist, wogegen die Autoren keinen Einfluss des ⁻¹⁷⁴-Genotyps beim Empfänger fanden ⁽⁷³⁾. Müller-Steinhardt und Mitarbeiter untersuchten in ihren Arbeiten die Bedeutung des IL-6⁻¹⁷⁴-Promotorpolymorphismus für das Langzeit-Nierentransplantatüberleben und konnten zeigen, dass die ⁻¹⁷⁴-Allele bei gesunder Bevölkerung und Nierentransplantierten in einem ausgewogenen Verhältnis zu finden sind und dass im Kollektiv von Nierentransplantierten homozygote Träger des ⁻¹⁷⁴G-Allels ein signifikant niedrigeres Risiko hatten, ihr Transplantat innerhalb von drei Jahren zu verlieren ^(79,80).

Unter der Fragestellung, ob sich unterschiedliche Genotypen verschieden auf die Wirksamkeit von Stimulation und Immunsuppression auswirken, untersuchten wir in einer Pilotstudie die IL-6-mRNA-Expression und IL-6-Proteinsekretion im Vollblut gesunder Erwachsener, deren IL-6 ⁻¹⁷⁴-Genotypen bereits in Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe typisiert worden waren ^(79,80).

Die ersten Ergebnisse zur Interaktion von SFA mit zwei unterschiedlichen Genotypen (⁻¹⁷⁴-CC/⁻¹⁷⁴-GG) konnten zeigen, dass es sowohl unter LPS (Monozyten), als auch unter Anti-CD3/Anti-CD28-Stimulation (T-Zellen) (1) bei beiden Genotypen zu einer gleichwertigen signifikanten IL -6 Sekretion

kommt, die (2) jeweils unter Zugabe von 1000 nM SFA ohne Genotyp-assoziierte Differenzen signifikant inhibiert wurde. (3) Während beim Genotyp IL-6⁻¹⁷⁴GG die IL-6-Protein-Sekretion in Lymphozyten stärker gehemmt wurde als in Monozyten, zeigte sich im Gegensatz dazu die IL-6-mRNA-Expression in Monozyten stärker inhibiert als in Lymphozyten. Unter Betrachtung des Genotyps ⁻¹⁷⁴CC zeigten sich keine Unterschiede.

Da unter Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation trotz signifikanter Inhibition der IL-6-Sekretion nur tendenziell eine Inhibition der IL-6-mRNA-Expression zu beobachten war, lässt sich postulieren, dass post-transkriptionale Prozesse, beispielsweise in der mRNA-Stabilisierung, durch SFA im Rahmen einer T-Zell-Rezeptor-vermittelten Stimulation beeinflusst werden. Dieses Ergebnis unterstreicht Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls Differenzen zwischen Zytokin-mRNA-Expression und Zytokin-Sekretion fanden ⁽⁴⁵⁾. Es muss aber festgestellt werden, dass es sich hier lediglich um präliminäre Daten handelt, die im größeren Kollektiv weiter evaluiert werden sollten.

Wir konnten mit unseren Untersuchungen zeigen, dass es sich bei SFA um eine Substanz mit immunsuppressiven Effekten im Vollblutansatz handelt, die bei Erwachsenen sowohl im erworbenen (T-Zellen) als auch im angeborenen (Monozyten) Immunsystem wirksam ist. Dies stellt im Vergleich zu etablierten Immunsuppressiva ein Novum dar, da diese Substanzen ihren Effekt vor allem im erworbenen Immunsystem an T-Zellen zeigen. Unsere Beobachtungen hinsichtlich einer effektiven Immunsuppression auch im Nabelschnurblut bei T-Zell-Rezeptor-Stimulation unterstreichen die Wirksamkeit von SFA auch im „immun-naiven“ Blut, die durch Studien an der angeborenen Immunabwehr weiter charakterisiert werden sollte. Insbesondere die Inhibition von proinflammatorischen Vorgängen durch SFA könnte in der Zukunft beispielsweise auch im Rahmen der Therapie der neonatalen Sepsis, Vermeidung von Transplantatabstoßungen oder auch der Immunsuppression nach Nabelschnurblut-Transplantationen eine wichtige Option sein, da die übermäßige inflammatorische Reaktion auf Infektionen eine Gefährdung für transplantierte und immunsupprimierte Patienten darstellt. Auch diese ersten Beobachtungen einer Korrelation zwischen spezifischen Genotypen und entsprechender Wirkmodulation sollten weiter

verfolgt werden, da diese Aussagen durchaus prognostisch, aber auch therapeutisch bedeutsam sein könnten. Hierfür sind weitere Untersuchungen notwendig, die zum einen Signaltransduktionsstudien beinhalten, um den inhibitorischen Wirkmechanismus von hohen Konzentrationen SFA weiter zu erschließen. Zum anderen sollten die physiologischen „Summeneffekte“ durch ex vivo/in vivo-Modelle, wie beispielsweise Tiermodelle, evaluiert werden, um neben therapeutischen Effekten auch positive und negative systemische Auswirkungen zu erfassen. Beispielsweise könnte man bei Betrachtung der Abbildungen zur T-Zell-Proliferation und zur quantitativen Analyse der Zytokinprotein-Sekretion unter Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation den Eindruck gewinnen, dass es bei Stimulation mit niedrigen SFA-Konzentrationen zu einer geringen Zunahme von Proliferation und Zytokin-Sekretion kommt. Trotz diesbezüglich nicht-signifikanter Datenlage sollte in Folgestudien die Möglichkeit eines immunstimulierenden Effektes bei geringen SFA-Konzentrationen überprüft werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das neue Immunsuppressivum Sanglifehrin A (SFA) ist ein immunophilinbindender Metabolit, dessen funktionelle Wirksamkeit noch unzureichend geklärt ist. Die hier vorliegende Arbeit untersuchte den funktionellen Effekt von SFA auf (1) Proliferation bei adulten CD4⁺-T-Zellen, sowie (2) Zytokin-mRNA-Expression und (3) Zytokin-Proteinsekretion bei Monozyten und T-Lymphozyten unter 4-, 24-, 48- und 72-stündiger Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation (T-Zellen), beziehungsweise 4- und 24-stündiger LPS-Stimulation (Monozyten). Es konnte gezeigt werden, dass SFA zeit- und dosisabhängig Proliferation und Zytokin-Proteinsekretion (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ) von T-Lymphozyten inhibiert. Während die IL-2-mRNA-Expression nach 4-stündiger Anti-CD3/Anti-CD28-Costimulation signifikant gehemmt wurde, zeigte sich die mRNA-Expression von IL-4 und IL-6 sowohl nach 4- als auch nach 24-stündiger Stimulation signifikant supprimiert, jedoch nicht die TNF- α -mRNA-Expression. Im Gegensatz zu anderen immunophilinbindenden Immunsuppressiva ist SFA in der Lage, auch unter LPS-Stimulation sowohl Zytokin-Proteinsekretion als auch Zytokin-mRNA-Expression von IL-6 und TNF- α zeit- und dosisabhängig zu unterdrücken. Um den immunmodulatorischen Einfluss von SFA auf ein physiologisch naives System zu evaluieren untersuchte diese Arbeit den Unterschied zwischen Nabelschnurblut gesunder Neugeborener und Erwachsenenblut im Hinblick auf T-Zell-Proliferation und -Effektorfunktion. Nach 48-stündiger Anti-CD3/Anti-CD28-mAb-Costimulation zeigt sich im Nabelschnurblut gesunder Neugeborener bei dosisabhängiger Wirksamkeit von SFA eine physiologische Unreife im Sinne einer verminderten Zytokin-Proteinsekretion bei IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α und IFN- γ , aber nicht bei IL-2. Die Proliferationsaktivität von T-Lymphozyten unter SFA wies keinen Unterschied zwischen Neugeborenen und Erwachsenen auf. Unter Betrachtung der Pharmakogenetik zeigte diese Arbeit erste Daten zur Bedeutung des IL-6⁻¹⁷⁴-Genpolymorphismus unter SFA, die jedoch im größeren Kollektiv weiter charakterisiert werden müssen. Diese Arbeit konnte erstmals den immunsupprimierenden und antiinflammatorischen Effekt von SFA aufzeigen, in zukünftigen Untersuchungen ist es von Bedeutung, die Einflüsse auf inflammatorische Signaltransduktionswege näher zu charakterisieren.

Literaturverzeichnis

1. Vitalitätsbestimmung von Stammzellen. In: Arbeitsrichtlinien Inst. für Immunol. und Transf.med., UKSH,CL (SV-Nr.: 08.07.13-SV GMP). (2005)
2. Allen A, Zheng Y, Gardner L, Safford M, Horton MR, Powell JD: The novel cyclophilin binding compound, sanglifehrin A, disassociates G1 cell cycle arrest from tolerance induction. *J.Immunol.* 172, 4797-4803 (2004)
3. Andersson J, Nagy S, Groth CG, Andersson U: Effects of FK506 and cyclosporin A on cytokine production studied in vitro at a single-cell level. *Immunology* 75, 136-142 (1992)
4. Andersson U, Andersson J, Lindfors A, Wagner K, Moller G, Heusser CH: Simultaneous production of interleukin 2, interleukin 4 and interferon-gamma by activated human blood lymphocytes. *Eur.J.Immunol.* 20, 1591-1596 (1990)
5. Arenzana-Seisdedos F, Virelizier JL, Fiers W: Interferons as macrophage-activating factors. III. Preferential effects of interferon-gamma on the interleukin 1 secretory potential of fresh or aged human monocytes. *J.Immunol.* 134, 2444-2448 (1985)
6. Balkwill FR, Burke F: The cytokine network. *Immunol.Today* 10, 299-304 (1989)
7. Barrett AJ: Graft versus host disease--clinical features and biology. *Bone Marrow Transplant.* 4 Suppl 4, 18-21 (1989)
8. Berner R, Welter P, Brandis M: Cytokine expression of cord and adult blood mononuclear cells in response to *Streptococcus agalactiae*. *Pediatr.Res.* 51, 304-309 (2002)
9. Bloemena E, Roos MT, Van Heijst JL, Vossen JM, Schellekens PT: Whole-blood lymphocyte cultures. *J.Immunol.Methods* 122, 161-167 (1989)
10. Bouma GJ, Hollander DA, van der Meer-Prins EM, van Bree SP, van Rood JJ, van der Woude FJ, Claas FH: In vitro sensitivity to prednisolone may predict kidney rejection after steroid withdrawal. *Transplantation* 62, 1422-1429 (1996)
11. Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS, Schreiber SL: A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 369, 756-758 (1994)
12. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 72, 3666-3670 (1975)

13. Chalmers IM, Janossy G, Contreras M, Navarrete C: Intracellular cytokine profile of cord and adult blood lymphocytes. *Blood* 92, 11-18 (1998)
14. Chen WF, Zlotnik A: IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J.Immunol.* 147, 528-534 (1991)
15. Chipeta J, Komada Y, Zhang XL, Azuma E, Yamamoto H, Sakurai M: Neonatal (cord blood) T cells can competently raise type 1 and 2 immune responses upon polyclonal activation. *Cell Immunol.* 205, 110-119 (2000)
16. Chipeta J, Komada Y, Zhang XL, Sakurai M, Azuma E: Intracellular cytokine profiles of cord and adult blood lymphocytes. *Blood* 93, 1120-1122 (1999)
17. Chiu MI, Katz H, Berlin V: RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 12574-12578 (1994)
18. Cohen SB, Madrigal JA: Immunological and functional differences between cord and peripheral blood. *Bone Marrow Transplant.* 21 Suppl 3, S9-12 (1998)
19. Cohen SB, Perez-Cruz I, Fallen P, Gluckman E, Madrigal JA: Analysis of the cytokine production by cord and adult blood. *Hum.Immunol.* 60, 331-336 (1999)
20. Crabtree GR: Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science* 243, 355-361 (1989)
21. Crabtree GR, Clipstone NA: Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu.Rev.Biochem.* 63, 1045-1083 (1994)
22. De Groote D, Zangerle PF, Gevaert Y, Fassotte MF, Beguin Y, Noizat-Pirenne F, Pirenne J, Gathy R, Lopez M, Dehart I: Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine* 4, 239-248 (1992)
23. de Waal MR, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE: Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J.Exp.Med.* 174, 1209-1220 (1991)
24. Delespesse G, Yang LP, Ohshima Y, Demeure C, Shu U, Byun DG, Sarfati M: Maturation of human neonatal CD4+ and CD8+ T lymphocytes into Th1/Th2 effectors. *Vaccine* 16, 1415-1419 (1998)
25. Denoroy MC, Yodoi J, Banchereau J: Interleukin 4 and interferons alpha and gamma regulate Fc epsilon R2/CD23 mRNA expression on normal human B cells. *Mol.Immunol.* 27, 129-134 (1990)

26. Depper JM, Leonard WJ, Drogula C, Kronke M, Waldmann TA, Greene WC: Interleukin 2 (IL-2) augments transcription of the IL-2 receptor gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82, 4230-4234 (1985)
27. Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, Figari IS, Palladino MA, Jr., O'Connor JV: Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J.Exp.Med.* 163, 1433-1450 (1986)
28. Dustin ML, Springer TA: Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annu.Rev.Immunol.* 9, 27-66 (1991)
29. Economides A, Schmid I, Anisman-Posner DJ, Plaeger S, Bryson YJ, Uittenbogaart CH: Apoptosis in cord blood T lymphocytes from infants of human immunodeficiency virus-infected mothers. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 5, 230-234 (1998)
30. El Marsafy S, Dosquet C, Coudert MC, Bensussan A, Carosella E, Gluckman E: Study of cord blood natural killer cell suppressor activity. *Eur.J.Haematol.* 66, 215-220 (2001)
31. Fairfax CA, Borzy MS: Interleukin 2 production, proliferative response, and receptor expression by cord blood mononuclear cells. *J.Clin.Lab Immunol.* 27, 63-67 (1988)
32. Fehr T, Kallen J, Oberer L, Sanglier JJ, Schilling W: Sanglifehrins A, B, C and D, novel cyclophilin-binding compounds isolated from *Streptomyces* sp. A92-308110. II. Structure elucidation, stereochemistry and physico-chemical properties. *J.Antibiot.(Tokyo)* 52, 474-479 (1999)
33. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR: Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J.Exp.Med.* 170, 2081-2095 (1989)
34. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A: IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J.Immunol.* 147, 3815-3822 (1991)
35. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P: The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J.Clin.Invest* 102, 1369-1376 (1998)
36. Fraser JD, Irving BA, Crabtree GR, Weiss A: Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* 251, 313-316 (1991)
37. Gasparoni A, Ciardelli L, Avanzini A, Castellazzi AM, Carini R, Rondini G, Chirico G: Age-related changes in intracellular TH1/TH2 cytokine production, immunoproliferative T lymphocyte response and natural

killer cell activity in newborns, children and adults. *Biol.Neonate* 84, 297-303 (2003)

38. Go NF, Castle BE, Barrett R, Kastelein R, Dang W, Mosmann TR, Moore KW, Howard M: Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J.Exp.Med.* 172, 1625-1631 (1990)
39. Gogal RM, Jr., Smith BJ, Kalnitsky J, Holladay SD: Analysis of apoptosis of lymphoid cells in fish exposed to immunotoxic compounds. *Cytometry* 39, 310-318 (2000)
40. Guha M, Mackman N: LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* 13, 85-94 (2001)
41. Hackstein H, Kluter H, Fricke L, Hoyer J, Bein G: The IL-4 receptor alpha-chain variant Q576R is strongly associated with decreased kidney allograft survival. *Tissue Antigens* 54, 471-477 (1999)
42. Hammers HJ, Kirchner H, Schlenke P: Ultraviolet-induced detection of halogenated pyrimidines: simultaneous analysis of DNA replication and cellular markers. *Cytometry* 40, 327-335 (2000)
43. Hammers HJ, Saballus M, Sheikzadeh S, Schlenke P: Introduction of a novel proliferation assay for pharmacological studies allowing the combination of BrdU detection and phenotyping. *J.Immunol.Methods* 264, 89-93 (2002)
44. Harding MW, Galat A, Uehling DE, Schreiber SL: A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* 341, 758-760 (1989)
45. Hartel C, Adam N, Strunk T, Temming P, Muller-Steinhardt M, Schultz C: Cytokine responses correlate differentially with age in infancy and early childhood. *Clin.Exp.Immunol.* 142, 446-453 (2005)
46. Hartel C, Bein G, Kirchner H, Kluter H: A human whole-blood assay for analysis of T-cell function by quantification of cytokine mRNA. *Scand.J.Immunol.* 49, 649-654 (1999)
47. Hartel C, Bein G, Muller-Steinhardt M, Kluter H: Ex vivo induction of cytokine mRNA expression in human blood samples. *J.Immunol.Methods* 249, 63-71 (2001)
48. Hartel C, Fricke L, Schumacher N, Kirchner H, Muller-Steinhardt M: Delayed cytokine mRNA expression kinetics after T-lymphocyte costimulation: a quantitative measure of the efficacy of cyclosporin A-based immunosuppression. *Clin.Chem.* 48, 2225-2231 (2002)
49. Hartel C, Schumacher N, Fricke L, Ebel B, Kirchner H, Muller-Steinhardt M: Sensitivity of whole-blood T lymphocytes in individual patients to tacrolimus (FK 506): impact of interleukin-2 mRNA expression as

surrogate measure of immunosuppressive effect. *Clin.Chem.* 50, 141-151 (2004)

50. Heitman J, Movva NR, Hall MN: Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253, 905-909 (1991)
51. Hellin AC, Calmant P, Gielen J, Bours V, Merville MP: Nuclear factor - kappaB-dependent regulation of p53 gene expression induced by daunomycin genotoxic drug. *Oncogene* 16, 1187-1195 (1998)
52. Hildesheim A, Ryan RL, Rinehart E, Nayak S, Wallace D, Castle PE, Niwa S, Kopp W: Simultaneous measurement of several cytokines using small volumes of biospecimens. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 11, 1477-1484 (2002)
53. Ho S, Clipstone N, Timmermann L, Northrop J, Graef I, Fiorentino D, Nourse J, Crabtree GR: The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 80, S40-S45 (1996)
54. Idzerda RL, March CJ, Mosley B, Lyman SD, Vanden Bos T, Gimpel SD, Din WS, Grabstein KH, Widmer MB, Park LS: Human interleukin 4 receptor confers biological responsiveness and defines a novel receptor superfamily. *J.Exp.Med.* 171, 861-873 (1990)
55. Isaacs A, Lindenmann J: Virus interference. I. The interferon. *Proc.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 147, 258-267 (1957)
56. Izuhara K, Shirakawa T: Signal transduction via the interleukin-4 receptor and its correlation with atopy. *Int.J.Mol.Med.* 3, 3-10 (1999)
57. Jason J, Larned J: Single-cell cytokine profiles in normal humans: comparison of flow cytometric reagents and stimulation protocols. *J.Immunol.Methods* 207, 13-22 (1997)
58. Kadereit S, Kozik MM, Junge GR, Miller RE, Slivka LF, Bos LS, Daum-Woods K, Sramkoski RM, Jacobberger JW, Laughlin MJ: Cyclosporin A effects during primary and secondary activation of human umbilical cord blood T lymphocytes. *Exp.Hematol.* 29, 903-909 (2001)
59. Kahan BD: Cyclosporine. *N.Engl.J.Med.* 321, 1725-1738 (1989)
60. Kallen J, Sedrani R, Zenke G, Wagner J: Structure of human cyclophilin A in complex with the novel immunosuppressant sanglifehrin A at 1.6 Å resolution. *J.Biol.Chem.* 280, 21965-21971 (2005)
61. Karlsson H, Hesse C, Rudin A: Innate immune responses of human neonatal cells to bacteria from the normal gastrointestinal flora. *Infect.Immun.* 70, 6688-6696 (2002)
62. Kasiske BL, Ramos EL, Gaston RS, Bia MJ, Danovitch GM, Bowen PA, Lundin PA, Murphy KJ: The evaluation of renal transplant

candidates: clinical practice guidelines. Patient Care and Education Committee of the American Society of Transplant Physicians. *J.Am.Soc.Nephrol.* 6, 1-34 (1995)

63. Kiani A, Rao A, Aramburu J: Manipulating immune responses with immunosuppressive agents that target NFAT. *Immunity.* 12, 359-372 (2000)
64. Kirchner H, Kleinicke C, Digel W: A whole-blood technique for testing production of human interferon by leukocytes. *J.Immunol.Methods* 48, 213-219 (1982)
65. Kruse A, Neustock P, Reuter M, Kirchner H: T-cell surface molecule expression and interferon-gamma production in human cord blood. *J.Interferon Res.* 13, 221-225 (1993)
66. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, Smith C, Olson JF, Halperin EC, Ciocchi G, Carrier C, Stevens CE, Rubinstein P: Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N.Engl.J.Med.* 335, 157-166 (1996)
67. La Flamme AC, Pearce EJ: The absence of IL-6 does not affect Th2 cell development in vivo, but does lead to impaired proliferation, IL-2 receptor expression, and B cell responses. *J.Immunol.* 162, 5829-5837 (1999)
68. Lindstein T, June CH, Ledbetter JA, Stella G, Thompson CB: Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science* 244, 339-343 (1989)
69. Linsley PS, Ledbetter JA: The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu.Rev.Immunol.* 11, 191-212 (1993)
70. Liu J: FK506 and cyclosporin, molecular probes for studying intracellular signal transduction. *Immunol.Today* 14, 290-295 (1993)
71. Liu Y, Janeway CA, Jr.: Cells that present both specific ligand and costimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 3845-3849 (1992)
72. Locatelli F, Rocha V, Chastang C, Arcese W, Michel G, Abecasis M, Messina C, Ortega J, Badell-Serra I, Plouvier E, Souillet G, Jouet JP, Pasquini R, Ferreira E, Garnier F, Gluckman E: Factors associated with outcome after cord blood transplantation in children with acute leukemia. Eurocord-Cord Blood Transplant Group. *Blood* 93, 3662-3671 (1999)
73. Marshall SE, McLaren AJ, McKinney EF, Bird TG, Haldar NA, Bunce M, Morris PJ, Welsh KI: Donor cytokine genotype influences the development of acute rejection after renal transplantation. *Transplantation* 71, 469-476 (2001)

74. Matthews NC, Wadhwa M, Bird C, Borrás FE, Navarrete CV: Sustained expression of CD154 (CD40L) and proinflammatory cytokine production by alloantigen-stimulated umbilical cord blood T cells. *J.Immunol.* 164, 6206-6212 (2000)
75. McDouall RM, Suitters AJ, Smith H, Yacoub MH, Rose ML: Increased cyclosporine sensitivity of T cells from cord blood compared with those from the adult. *Clin.Exp.Immunol.* 95, 519-524 (1994)
76. Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R: Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193, 1007-1008 (1976)
77. Mosmann TR, Moore KW: The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol.Today* 12, A49-A53 (1991)
78. Mosmann TR, Sad S: The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol.Today* 17, 138-146 (1996)
79. Muller-Steinhardt M, Fricke L, Muller B, Ebel B, Kirchner H, Hartel C: Cooperative influence of the interleukin-6 promoter polymorphisms -597, -572 and -174 on long-term kidney allograft survival. *Am.J.Transplant.* 4, 402-406 (2004)
80. Muller-Steinhardt M, Hartel C, Muller B, Kirchner H, Fricke L: The interleukin-6 -174promoter polymorphism is associated with long-term kidney allograft survival. *Kidney Int.* 62, 1824-1827 (2002)
81. Neumann HG: Entstehung und Behandlung von Tumoren, Immunsuppressiva. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie, Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker.* 7. Aufl., 813, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. (1998)
82. Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA: Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J.Exp.Med.* 185, 461-469 (1997)
83. Roncarolo MG, Bigler M, Ciuti E, Martino S, Tovo PA: Immune responses by cord blood cells. *Blood Cells* 20, 573-585 (1994)
84. Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, Kurtzberg J, Adamson J, Migliaccio AR, Berkowitz RL, Cabbad M, Dobrila NL, Taylor PE, Rosenfield RE, Stevens CE: Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N.Engl.J.Med.* 339, 1565-1577 (1998)
85. Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH: RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 78, 35-43 (1994)

86. Sabers CJ, Martin MM, Brunn GJ, Williams JM, Dumont FJ, Wiederrecht G, Abraham RT: Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J.Biol.Chem.* 270, 815-822 (1995)
87. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354 (1985)
88. Sanglier JJ, Quesniaux V, Fehr T, Hofmann H, Mahnke M, Memmert K, Schuler W, Zenke G, Gschwind L, Maurer C, Schilling W: Sanglifehrins A, B, C and D, novel cyclophilin-binding compounds isolated from *Streptomyces* sp. A92-308110. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activity. *J.Antibiot.(Tokyo)* 52, 466-473 (1999)
89. Sautois B, Fillet G, Beguin Y: Comparative cytokine production by in vitro stimulated mononucleated cells from cord blood and adult blood. *Exp.Hematol.* 25, 103-108 (1997)
90. Schmid I, Uittenbogaart CH, Keld B, Giorgi JV: A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry. *J.Immunol.Methods* 170, 145-157 (1994)
91. Schultz C, Rott C, Richter N, Bucsky P: Intracytoplasmic detection of cytokines in neonatal lymphocytes and monocytes by flow cytometry. *Blood* 93, 3566-3567 (1999)
92. Schultz C, Temming P, Bucsky P, Gopel W, Strunk T, Hartel C: Immature anti-inflammatory response in neonates. *Clin.Exp.Immunol.* 135, 130-136 (2004)
93. Schwartz RH: Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 71, 1065-1068 (1992)
94. Seghaye MC, Heyl W, Grabitz RG, Schumacher K, von Bernuth G, Rath W, Duchateau J: The production of pro- and anti-inflammatory cytokines in neonates assessed by stimulated whole cord blood culture and by plasma levels at birth. *Biol.Neonate* 73, 220-227 (1998)
95. Sewell WA, North ME, Webster AD, Farrant J: Determination of intracellular cytokines by flow-cytometry following whole-blood culture. *J.Immunol.Methods* 209, 67-74 (1997)
96. Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR: Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* 241, 202-205 (1988)
97. Siekierka JJ, Hung SH, Poe M, Lin CS, Sigal NH: A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature* 341, 755-757 (1989)

98. Steinschulte C, Taner T, Thomson AW, Bein G, Hackstein H: Cutting edge: sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding immunosuppressant blocks bioactive IL-12 production by human dendritic cells. *J.Immunol.* 171, 542-546 (2003)
99. Sun X, Shimizu H, Yamamoto K: Identification of a novel p53 promoter element involved in genotoxic stress-inducible p53 gene expression. *Mol.Cell Biol.* 15, 4489-4496 (1995)
100. Taylor DO, Ensley RD, Olsen SL, Dunn D, Renlund DG: Mycophenolate mofetil (RS-61443): preclinical, clinical, and three-year experience in heart transplantation. *J.Heart Lung Transplant.* 13, 571-582 (1994)
101. Thompson CB, Lindsten T, Ledbetter JA, Kunkel SL, Young HA, Emerson SG, Leiden JM, June CH: CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86, 1333-1337 (1989)
102. Thompson-Snipes L, Dhar V, Bond MW, Mosmann TR, Moore KW, Rennick DM: Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *J.Exp.Med.* 173, 507-510 (1991)
103. Tilg H, Dinarello CA, Mier JW: IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunol.Today* 18, 428-432 (1997)
104. Van Wauwe JP, De Mey JR, Goossens JG: OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties. *J.Immunol.* 124, 2708-2713 (1980)
105. Webb LM, Feldmann M: Critical role of CD28/B7 costimulation in the development of human Th2 cytokine-producing cells. *Blood* 86, 3479-3486 (1995)
106. Webster AC, Woodroffe RC, Taylor RS, Chapman JR, Craig JC: Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data. *BMJ* 331, 810- (2005)
107. Wiederrecht G, Lam E, Hung S, Martin M, Sigal N: The mechanism of action of FK-506 and cyclosporin A. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 696, 9-19 (1993)
108. Woltman AM, Schlagwein N, van der Kooij SW, van Kooten C: The novel cyclophilin-binding drug sanglifehrin A specifically affects antigen uptake receptor expression and endocytic capacity of human dendritic cells. *J.Immunol.* 172, 6482-6489 (2004)
109. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK: IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J.Clin.Invest* 101, 311-320 (1998)

110. Zenke G, Strittmatter U, Fuchs S, Quesniaux VF, Brinkmann V, Schuler W, Zurini M, Enz A, Billich A, Sanglier JJ, Fehr T: Sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding compound showing immunosuppressive activity with a new mechanism of action. *J.Immunol.* 166, 7165-7171 (2001)
111. Zhang LH, Liu JO: Sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding immunosuppressant, inhibits IL-2-dependent T cell proliferation at the G1 phase of the cell cycle. *J.Immunol.* 166, 5611-5618 (2001)
112. Zhang LH, Youn HD, Liu JO: Inhibition of cell cycle progression by the novel cyclophilin ligand sanglifehrin A is mediated through the NFkappa B-dependent activation of p53. *J.Biol.Chem.* 276, 43534-43540 (2001)
113. Zola H, Fusco M, Macardle PJ, Flego L, Robertson D: Expression of cytokine receptors by human cord blood lymphocytes: comparison with adult blood lymphocytes. *Pediatr.Res.* 38, 397-403 (1995)

Danksagung

Meinem Doktorvater **Herrn Privatdozent Dr. med. habil. Michael Müller-Steinhardt** danke ich für die interessante Aufgabenstellung dieser Dissertation und die gute Zusammenarbeit.

Herrn Professor Dr. med. H. Kirchner danke ich für die freundliche Unterstützung und die Möglichkeit, im Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin arbeiten zu dürfen.

Meinem Chef, **Herrn Professor Dr. med. P. Schmucker**, Direktor der Klinik für Anästhesiologie und meinem Oberarzt, **Herrn Dr. med. M. Prüßmann** danke ich für die Ermöglichung meiner Freistellung für den experimentellen Hauptteil dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. med. T.H. Eiermann, Leiter der Abteilung Transplantationsimmunologie am Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, danke ich für die freundliche Zurverfügungstellung von Gerätschaften und Räumlichkeiten zur Durchführung der Luminex-Messungen.

Herrn Privatdozent Dr. med. habil. P. Schlenke danke ich für die Erläuterung der UVID-Technologie und die Bereitschaft, Fragen intensiv zu diskutieren.

Meinem Betreuer, **Herrn Dr. med. Christoph Härtel**, Assistenzarzt in der Klinik für Pädiatrie, danke ich für die freundschaftliche und engagierte Führung und Anleitung. Die Betreuung bei Erstellung dieser Doktorarbeit und die Bereitschaft, Fragen immer wieder geduldig zu diskutieren, waren außergewöhnlich. Mein Dank gilt auch seiner Frau **Annika** und den Kindern **Laurin** und **Leander**, die verständnisvoll dieses Engagement begleitet haben.

Besonders danke ich auch **Frau Brigitte Ebel**, MTA am Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, die mich engagiert in die verschiedenen analytischen Methoden der Immunologie einführte. Ihre Betreuung und die zahlreichen Diskussionen haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Meiner **Ehefrau Dr. med. Tonia Iblher** danke ich für die liebevolle und verständnisvolle Begleitung während der Erstellung meiner Arbeit. Meinem **Sohn Jacob**, dessen bevorstehende Geburt mich zu Höchstleistungen angetrieben hat, danke ich und bin sehr glücklich, dass er nun bei uns ist.

Meinem **Bruder Hanns**, sowie meinen Eltern und ihren Ehepartnern, **Birthe Gerdson**, **Werner Kühnholz**, **Hans Iblher** und **Hella Iblher**, danke ich für ihre Unterstützung und die vielen Gespräche.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE INFORMATIONEN:

Name:	Peter Iblher
Geburtsdatum:	26.02.1975 in Neumünster
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet

AUSBILDUNG:

1981- 1994	Schulzeit mit Abschluss Abitur (IGS Neumünster)
1995	Abschlussexamen als Rettungsanwärter
Okt. 1994- Sept. 1995	Wehrdienst
Okt. 1995- Jun. 2003:	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
▪ 1998	Physikum
▪ 1999	Erstes Staatsexamen
▪ 2001	Zweites Staatsexamen
▪ 2003	Drittes Staatsexamen

BERUFSERFAHRUNG:

Aug. 2003 -Sep.2004 Okt. 2004 – heute	AiP (UKSH/ CL, Klinik für Anästhesiologie, Prof. Dr. Schmucker) Vollapprobation/ wissenschaftl. Mitarbeiter
<u>Famulaturen:</u> <ul style="list-style-type: none">▪ Feb. 1999▪ März 2000▪ Aug. 2000▪ Sep. 2000	Innere Medizin (KKH Rendsburg) Allgemeinarztpraxis (Dr. Feurer, Reutlingen) Emergency medicine (McMaster University, Hamilton, Canada) General Surgery (McMaster University, Hamilton, Canada)
<u>Praktisches Jahr:</u> <ul style="list-style-type: none">▪ April- Juli 2002▪ Aug.- Sep. 2002 ▪ Sep.- Nov. 2002▪ Dez.2002- März 2003	Innere Medizin (Westküstenklinikum Heide) Pädiatrie: Cardiology/ Infectious diseases (University of Toronto, Hospital for Sick Children, Toronto, Canada) Pädiatrie (University of Sydney, Royal North Shore Hospital, Australia) Chirurgie (Universität Zürich, Kreisspital Männedorf, Schweiz)

PERSÖNLICHE FÄHIGKEITEN UND KOMPETENZEN:

<u>Sprachen:</u> <ul style="list-style-type: none">▪ Englisch	fließend in Wort und Schrift
<u>Engagement:</u> <ul style="list-style-type: none">▪ 1986- 1994▪ 1990- 1995▪ 1990- 1994 ▪ Mai 1994▪ 1990- heute ▪ 1999- 2002▪ 1996- heute ▪ 2001- 2002	Vereinshandball (Blau- Weiß- Wittorf e.V., Neumünster) Musicalarbeit und Engagement in verschiedenen Orchestern (Trompete) Aufbau und Leitung einer Jugendgruppe (Johanniter- Jugend), Mitarbeit als Delegierter im Jugendverband Neumünster Mitglied im Europäischen Jugendparlament (Dresden) Ausbildertätigkeit für Erste - Hilfe/ Vorträge zu medizinischen Fachthemen Mitglied des Studierendenparlaments der Universität zu Lübeck Gründung, Konzeptionalisierung und Hinführung zum e.V. der überregionalen Arbeitsgruppe „Erste Hilfe und Notfallkunde für Medizinstudierende“ (AG EH-MED), Leitung bis 2002, 2004-05 Aufbau und Leitung der Supervision in der AG EH-MED e.V. Journalistische Tätigkeit für Via medici online, Georg Thieme Verlag

PROMOTIONSARBEIT

Okt. 2004 – Okt. 2006	Doktorand am Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin (Direktor: Prof. Dr. H. Kirchner) bei PD Dr. med. habil M. Müller- Steinhardt
-----------------------	---

PUBLIKATIONEN/VORTRÄGE:

- Mohamed SA, Meissner C, Bruse P, Frahm T, Iblher P, Oehmichen M (2000)
Sensitivität und Spezifität mitochondrialer DNA-Sonden. Greifswald, Tagungsband der 10. Frühjahrstagung -Region Nord- der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, S. 30
- Birth M, Iblher P, Hildebrand P, Nolde J, Bruch HP: Ultraschallgesteuerte Interventionen unter virtueller Führung. Erste Erfahrungen mit dem US-Guide 2000 unter operativen Bedingungen. *Ultraschall in der Medizin* (2003); 24: 1-6.
- Iblher P, Rotter N, Grabbe J, Gehring H, Meier T: Unklare intraoperative kardiorespiratorische Dekompensation. Ist es eine Anaphylaxie? *Anaesthesist* (2005); 54: 895-901.
- Iblher P, Härtel C, Wortmeier K, Ebel B, Müller-Steinhardt M: The novel immunosuppressant Sanglifehrin A shows a potent inhibition of Interleukin-6 production in both T-lymphocytes and monocytes. Präsentiert auf der 13. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunogenetik am 17. September 2005 in Hamburg.
- Hartel C, Iblher P, Puzik A, Wortmeier K, Ebel B, Schultz C, Muller-Steinhardt M: Immunosuppressive Activity of the Immunophilin-binding Drug Sanglifehrin A in Human Whole Blood: Potent Inhibition of Interleukin-6 Produced by Lymphocytes and Monocytes. *Scand J Immunol.* (2006); 63: 26-34.

PREISE/AUSZEICHNUNGEN:

- Ehrenmitglied der AG EH-MED e.V.
- Thieme-Teaching-Award 2006 der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (DGAI)
- GMA-Preis für junge Lehrende 2006 der Gesellschaft für Medizinische Ausbildung e.V.
- Studiengang „Master of Medical Education“, Stipendiant der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck und des Stifterverbands für die Deutsche Wissenschaft