

Aus der Klinik für Nephrologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Wirkung von Prostaglandin E₁ auf die Proliferation und
Zytokinexpression peripherer mononukleärer Zellen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Juliane Stoll
aus Kühlungsborn

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. K. Budde

2. Prof. Dr. med. M. Zeier

3. Prof. Dr. med. M. Lein

Datum der Promotion: 27. März 2009

INHALTSVERZEICHNIS	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1. EINLEITUNG	9
1.1. Bedeutung der Nierentransplantation.....	9
1.2. Mechanismen der Transplantatabstoßung.....	10
1.3. T-Lymphozyten.....	10
1.4. Konzept der T-Helfer-Zell-Dichotomie.....	11
1.5. Zytokine.....	11
1.6. Th ₁ -Zytokine.....	12
1.6.1. Interleukin-2.....	12
1.6.2. Interferon-γ.....	13
1.7. Th ₂ -Zytokine.....	13
1.7.1. Interleukin-4.....	14
1.7.2. Interleukin-6.....	14
1.7.3. Interleukin-10.....	14
1.8. Tumornekrosefaktor-α.....	15
1.9. Granulozyten / Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor.....	15
1.10. Prostaglandine.....	16
1.11. Interaktionen zwischen Prostaglandinen und Zytokinen.....	17
1.12. Immunsuppressiva.....	19
1.12.1. Steroide.....	19
1.12.2. Calcineurininhibitoren.....	20
1.12.2.1. Cyclosporin A.....	21
1.12.2.2. Tacrolimus.....	22
1.12.3. Sirolimus.....	22
1.12.4. Antimetabolite.....	23
1.12.4.1. Azathioprin.....	23
1.12.4.2. Mycophenolat-Mofetil.....	23
1.12.5. Antilymphozytäre Antikörper.....	24
1.12.6. Therapeutische Medikamentenspiegel.....	25
1.13. Ziel der vorgelegten Arbeit.....	25

2. MATERIAL UND METHODEN	27
2.1. Materialien.....	27
2.1.1. Probanden für in vivo-Versuche.....	27
2.1.2. Zellen für in vitro-Versuche.....	27
2.1.3. Zellkulturmedium und Puffer.....	27
2.1.4. Chemikalien.....	27
2.1.4.1. Lymphozytenisolierung.....	27
2.1.4.2. Lymphozytenproliferationstest.....	28
2.1.4.3. Zytokin-ELISA.....	28
2.1.5. Antikörper.....	28
2.1.5.1. Capture-Antikörper.....	29
2.1.5.2. Detection-Antikörper.....	29
2.1.6. Zytokin-Standards.....	29
2.1.7. Immunsuppressiva.....	30
2.1.8. Plastikwaren.....	30
2.1.9. Geräte.....	30
2.2. Methoden.....	31
2.2.1. Isolierung der Lymphozyten.....	31
2.2.2. Zellkulturbedingungen.....	31
2.2.3. Stimulation der Lymphozyten.....	31
2.2.4. Lymphozytenproliferationstest	32
2.2.5. Zytokinproduktion und -nachweis.....	32
2.2.5.1. Zytokin-ELISA.....	33
2.3. Probandenversuche.....	33
2.3.1. Individuelle Variabilität der Lymphozytenproliferation.....	33
2.3.2. Einfluss der Tageszeit auf die Lymphozytenproliferation.....	34
2.4. Misoprostol-Probandenstudie.....	34
2.4.1. Kinetik der Lymphozytenproliferation und Zytokinproduktion.....	34
2.4.2. Einfluss der Misoprostol-Dosis auf Lymphozytenproliferation und Zytokinproduktion.....	35

2.5.	Zellkulturversuche.....	36
2.5.1.	Einfluss verschiedener Immunsuppressiva auf Lymphozytenproliferation und Zytokinproduktion in vitro.....	36
2.6.	Statistik.....	36
3.	ERGEBNISSE	37
3.1.	Lymphozytenproliferation unbehandelter Probanden.....	37
3.1.1.	Individuelle Variabilität der Lymphozytenproliferation.....	37
3.1.2.	Einfluss der Tageszeit auf die Lymphozytenproliferation.....	37
3.2.	Misoprostol-Probandenstudie.....	38
3.2.1.	Kinetik der Lymphozytenproliferation.....	38
3.2.2.	Kinetik der Zytokinproduktion.....	40
3.2.2.1.	Kinetik der IL-2-Produktion.....	40
3.2.2.2.	Kinetik der IFN- γ -Produktion.....	40
3.2.2.3.	Kinetik der IL-4-Produktion.....	41
3.2.2.4.	Kinetik der IL-6-Produktion.....	42
3.2.2.5.	Kinetik der IL-10-Produktion.....	43
3.2.2.6.	Kinetik der TNF- α -Produktion.....	43
3.2.2.7.	Kinetik der GM-CSF-Produktion.....	44
3.2.3.	Dosisabhängigkeit der Lymphozytenproliferation.....	46
3.2.4.	Dosisabhängigkeit der Zytokinproduktion.....	47
3.2.4.1.	Dosisabhängigkeit der IL-2-Produktion.....	47
3.2.4.2.	Dosisabhängigkeit der IFN- γ -Produktion.....	48
3.2.4.3.	Dosisabhängigkeit der IL-4-Produktion.....	49
3.2.4.4.	Dosisabhängigkeit der IL-10-Produktion.....	49
3.3.	Zellkulturversuche.....	51
3.3.1.	Einfluss verschiedener Immunsuppressiva auf die Lymphozytenproliferation in vitro.....	51

3.3.1.1.	Prostaglandin E ₁	51
3.3.1.2.	Cyclosporin A.....	52
3.3.1.3.	Methylprednisolon.....	52
3.3.1.4.	Mycophenolat.....	53
3.3.2.	Einfluss verschiedener Immunsuppressiva auf die Zytokinproduktion in vitro.....	54
3.3.2.1.	Prostaglandin E ₁	54
3.3.2.2.	Cyclosporin A.....	55
3.3.2.3.	Methylprednisolon.	57
3.3.2.4.	Mycophenolat.....	58
4.	DISKUSSION	60
5.	ZUSAMMENFASSUNG	71
6.	LITERATURVERZEICHNIS	73
	DANKSAGUNG	85
	LEBENS LAUF	86
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	88

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

Abkürzung	Bedeutung
a-	anti, in Verbindung mit Antikörpern
Abb.	Abbildung/en
ABTS	2,2-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic-acid)
aCD3mab	monoklonale/r Antikörper gegen den CD3-Komplex
ADH	antidiuretisches Hormon
Ag	Antigen/e
AMP	Adenosinmonophosphat
AR	akute Rejektion, akute Abstoßungsreaktion
CD	cluster of differentiation, engl. Nomenklatur für Oberflächenantigene
CD1	Reifungsmarker für T-Zellen
CD3	spezifischer Stammzellmarker für T-Zellen
CD4	Reifungsmarker für T-Helferzellen
CD8	Reifungsmarker für zytotoxische T-Zellen
CD25	Aktivierungsmarker nach Antigenstimulation, IL-2-Rezeptor
CNI	Calcineurininhibitor/en
COX-1/2	Cyclooxygenase 1/2
CRS	cytokine release syndrome, engl. für lebensbedrohliche Sofortreaktion nach Erstgabe von OKT3
CsA	Cyclosporin A
Diag.	Diagramm/e
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation, gegründet 1984
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GMP	Guanosinmonophosphat
hu-	human/er, in Verbindung mit Antikörpern
IFN- γ	Interferon- γ
IgG/E	Immunglobulin/e der Klasse G/E
IL	Interleukin/e

IL-R	Interleukin-Rezeptor/en
IMPDH	Inosinmonophosphat-Dehydrogenase
kD	Kilodalton, Gewichtseinheit für Proteine
mab	monoclonal antibody, engl. für monoklonale/r Antikörper
MHC	major histocompatibility complex, engl. für Haupthistokompatibilitätskomplex
MHC-I/II	Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse I/II
MMF	Mycophenolat-Mofetil
MP	Methylprednisolon
MPA	Mycophenolate Acid, engl. für Mucophenolsäure
MPAG	Mucophenolsäure-Glucuronid
mRNA	messenger-RNA, engl. für Boten-RNA
mTOR	mammalian Target of Rapamycin, Zielprotein für Sirolimus
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid
NFAT	nuclear factor of activated t-cells, Zielprotein für Cyclosporin
NK-Zellen	natural killer cells, engl. für natürliche Killerzellen
NSAID	non steroidal antiinflammatory drugs, engl. für nichtsteroidale Antiphlogistika, periphere Analgetika
NTX	Nierentransplantation
OD	optical density, engl. für optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline, Phosphatpuffer
PG	Prostaglandin/e
r-hu	rekombinant human/er, in Verbindung mit Zytokinen
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	n-Dodecylsulfat Natriumsalz
Tab.	Tabelle/n
TCR 1/2	T-Zell-Rezeptor/en 1/2
Th	T-Helferzelle/n
Th _{0/1/2}	Subpopulation/en von T-Helferzellen
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
T _R	Raumtemperatur

1. EINLEITUNG

1.1. BEDEUTUNG DER NIERENTRANSPLANTATION

Die Nierentransplantation ist heutzutage die Therapie der Wahl bei terminaler Niereninsuffizienz. Seit 1963 wurden in Deutschland 59.801 Nierentransplantationen durchgeführt. Im Jahre 2007 wurden 2.907 Nierentransplantationen an 40 Nierentransplantationszentren durchgeführt. Davon wurden 2.340 Nieren (80,5%) nach postmortaler Organspende und 567 Nieren (19,5%) nach Lebendspende übertragen (DSO, 2007). Das zunehmende Wissen über die Funktionen des menschlichen Immunsystems, das zunehmende Manual der zur Verfügung stehenden Immunsuppressiva sowie die klinische Erfahrung im Umgang mit immunologischen und nicht-immunologischen Problemen nach Nierentransplantation erlauben eine zunehmend großzügigere Indikationsstellung in Bezug auf die Auswahl von Organ Spendern und -empfängern. Etwa 9.000 der ca. 63.000 Dialysepatienten in Deutschland befinden sich derzeit auf der aktiven Warteliste für eine Nierentransplantation bei Eurotransplant. Die Zahl der Neuanmeldungen liegt bei ca. 2.700 bis 3.000 Patienten pro Jahr. Die Wartezeit auf ein passendes Spenderorgan beträgt dementsprechend ca. vier bis fünf Jahre. Bis zur Transplantation sind die Patienten auf extrakorporale Nierenersatzverfahren wie die Hämodialyse und die Peritonealdialyse angewiesen. Dieser Umstand ist mit erheblichen Einschränkungen in der Lebensgestaltung verbunden. Eine erfolgreiche Nierentransplantation führt zu einer erheblichen Verbesserung der Lebensqualität (Waiser *et al.*, 1998) und der Lebenserwartung (Wolfe *et al.*, 1999). Die suffiziente und möglichst nebenwirkungsarme immunsuppressive Therapie ist für das Transplantatüberleben besonders wichtig. Das Transplantatüberleben in dem ersten Jahr nach Nierentransplantation hat sich in den letzten Jahren deutlich verbessert und liegt gegenwärtig bei 88% bis 94% (Hariharan *et al.*, 2000). Trotz dieser Erfolge bleibt das Langzeit-Transplantatüberleben nach fünf Jahren mit 65% bis 75% nach postmortaler Nierentransplantation und 75% bis 85% nach Lebendnierenspende (Meier-Kriesche *et al.*, 2004; Ferris *et al.*, 2006) unbefriedigend. Hauptursachen für den Funktionsverlust transplanteder Organe sind akute Abstoßungsreaktionen, die chronische Transplantatnephropathie und der Tod des Transplantierten mit einem funktionierendem Transplantat.

1.2. MECHANISMEN DER TRANSPLANTATABSTOßUNG

Die Identifizierung körperfremder Proteine ist eine wesentliche Schutzfunktion des Immunsystems. Daher kann eine erfolgreiche Gewebe- oder Organübertragung nur gelingen, wenn diese physiologische Abwehrfunktion abgeschwächt bzw. unterdrückt wird. Die Abstoßungsreaktion oder Rejektion ist ein Prozess, bei dem ein allogenes Transplantat durch das Immunsystem des Empfängers als fremd erkannt und zerstört wird. Selbst moderne immunsuppressive Therapieregime können Abstoßungsreaktionen nicht vollständig verhindern. Abstoßungsreaktionen werden u.a. nach dem Zeitpunkt des Auftretens unterschieden. Bei der hyperakuten Rejektion wird das Transplantat innerhalb der ersten 24 Stunden nach Transplantation, häufig schon intraoperativ, durch präformierte Antikörper zerstört. Vor jeder Transplantation durchgeführte Crossmatch-Tests helfen, das Vorhandensein präformierter, zytotoxischer Antikörper auszuschließen. Die akute Rejektion bedroht das Transplantat Tage bis Monate postoperativ. Die chronische Transplantatabstoßung ist ein schleichender Prozess, der über viele Monate und Jahre nach Transplantation zu einem progredienten Funktionsverlust des Organs führt. Bei der Abstoßungsreaktion in nicht vorsensibilisierten Empfängern dominieren zelluläre Effektormechanismen. Es kommt zur Immigration von Entzündungszellen in die transplantierte Niere mit typischer Infiltratbildung im Interstitium und im perivaskulärem Raum (Bohman *et al.*, 1991; Hall, 1991). Aktivierte Entzündungszellen sezernieren Mediatoren wie Zytokine, Eicosanoide, proteolytische Enzyme, Sauerstoffradikale und Gerinnungsfaktoren, die zur Stimulation und Regulation der Immunantwort beitragen. Diese Mediatoren bedingen eine Vielzahl biologischer Effekte, die in komplizierten Regelkreisen und Kaskaden miteinander vernetzt sind. Verschiedene Zytokine sind sowohl in der Initialphase als auch an der Aufrechterhaltung der Abstoßungsreaktion beteiligt (Cornaby *et al.*, 1988; Dallman *et al.*, 1989). Über diagnostische Möglichkeiten hinaus ergeben sich durch die zunehmenden Erkenntnisse von der Pathophysiologie der Abstoßungsreaktion auch therapeutisch neue Angriffspunkte.

1.3. T-LYMPHOZYTEN

T-Lymphozyten sind die Träger der spezifischen zellulären Immunantwort. Sie dienen insbesondere der Abwehr intrazellulärer Erreger, wie Mycobakterien und Viren, aber

auch der Elimination von Tumorzellen. Anhand der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle werden die T-Lymphozyten in Gruppen eingeteilt. Der sogenannte CD3-Komplex ist ein wichtiger Oberflächenmarker, der eng mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) assoziiert ist und bei Antigenkontakt das aktivierende Signal in das Zellinnere überträgt. Der T-Zell-Rezeptor besteht aus zwei verschiedenen Polypeptidketten, die über eine Disulfidbrücke zu einem Heterodimer verbunden sind. Dieses Heterodimer ist für die spezifische Antigenerkennung verantwortlich. Jede T-Zelle trägt ca. 30.000 TCR auf ihrer Oberfläche. Reife T-Zellen werden in $CD4^+$ T-Zellen, Helfer-T-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen, zytotoxische T-Zellen unterteilt. Diese beiden Gruppen unterscheiden sich hinsichtlich der Antigenerkennung und ihrer funktionellen Eigenschaften.

1.4. KONZEPT DER T-HELFER-ZELL-DICHOTOMIE

T-Helferzellen werden anhand der von ihnen produzierten Zytokine in Subpopulationen eingeteilt (Mosmann und Coffman, 1989). Th_1 -Zellen sezernieren vor allem Interleukin-2 und Interferon- γ und stimulieren die zelluläre Immunantwort. Th_2 -Zellen sezernieren unter anderem Interleukin-4, Interleukin-5, Interleukin-6 und Interleukin-10 und stimulieren primär die humorale Immunantwort (Street und Mosmann, 1991). In beiden Fällen kann allerdings die Zytokinproduktion auf der Ebene einzelner T-Zellen heterogen sein. Eine dritte Klasse, die sogenannten Th_0 -Zellen sind definiert als Zellen, die ein überlappendes Spektrum von Th_1 - und Th_2 -Zytokinen produzieren. Sie sind Vorläuferzellen ausgereifter Th_1 - und Th_2 -Zellen. Die Entscheidung, ob sich eine naive $CD4^+$ -Zelle zu einer Th_1 - oder Th_2 -Effektorzelle differenziert, fällt beim Kontakt mit dem spezifischen Antigen. Die meisten Pathogene, vor allem intrazelluläre Pathogene, führen zu einer Th_1 -Antwort, die zu einer Aktivierung von Makrophagen führt. Nur aktivierte Makrophagen können bestimmte intrazelluläre Erreger effizient abtöten. Ein weiteres Charakteristikum der Th_1 -Antwort ist die Ausbildung zytotoxischer T-Zellen. Im Unterschied dazu induzieren extrazelluläre Erreger, insbesondere Würmer und Parasiten, eine Th_2 -Antwort.

1.5. ZYTOKINE

Zytokine sind Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 8 bis 40 kD. Sie binden an spezifische Zytokinrezeptoren auf den Oberflächen von Zielzellen, die über

intrazelluläre Domänen Signale ins Zellinnere vermitteln. Die Affinität dieser Rezeptoren für ihr spezifisches Zytokin ist sehr hoch, sodass sehr geringe Konzentrationen ausreichen, um biologische Effekte hervorzurufen. Zytokine sind an der Zellaktivierung, -proliferation und -differenzierung beteiligt (Zola, 1996). Zytokine und ihre Rezeptoren bilden Familien strukturell verwandter Proteine, welche die Kommunikation zwischen den Zellen, die am Ablauf einer Entzündungsreaktion beteiligt sind, vermitteln. Verschiedene Zelltypen können das gleiche Zytokin produzieren, dieses Phänomen wird als Redundanz bezeichnet. Häufig wirkt auch das gleiche Zytokin auf verschiedene Zelltypen, eine Eigenschaft, die als Pleiotropie bezeichnet wird. Das gleiche Zytokin kann außerdem bei der gleichen Zielzelle in Abhängigkeit von deren Zustand unterschiedliche Effekte hervorrufen. Zwei oder mehrere Zytokine können additiv oder antagonistisch wirken. Zytokine führen häufig zur Freisetzung anderer Zytokine bzw. ganzer Zytokinkaskaden, wodurch weitere Effekte vermittelt werden.

1.6. Th₁-ZYTOKINE

Th₁-Lymphozyten sezernieren nach Kontakt mit einem Antigen vor allem Interleukin-2 und Interferon- γ und stimulieren so die zelluläre Immunantwort. Diese Zytokine wirken auch pyrogen, prokoagulatorisch und katabol. Sie werden zu den proinflammatorischen Zytokinen gezählt.

1.6.1. INTERLEUKIN-2

IL-2 ist der wichtigste Wachstumsfaktor für T-Zellen und wird bei jeder Antigen- oder Mitogen-vermittelten Stimulation von CD4⁺ Lymphozyten gebildet (Wang und Smith, 1987; Smith, 1988). IL-2 ist hauptsächlich für die klonale Expansion im Laufe einer Immunantwort verantwortlich. Die Expression von IL-2 und IL-2R sind Grundlage und Kennzeichen der Aktivierung von T-Lymphozyten zugleich. Sie beeinflussen maßgeblich die zellvermittelte Immunantwort und damit den Verlauf einer Abstoßungsreaktion. Über die Stimulation der Proliferation hinaus bewirkt IL-2 bei aktivierten T-Lymphozyten in Kultur die Bildung weiterer Lymphokine (z. B. IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IFN- γ , TNF- α , TGF- β und GM-CSF) und die Zunahme ihrer zytotoxischen Aktivität. Der Expression von IL-2R scheint in der Frühphase einer Abstoßungsreaktion eine besondere Bedeutung zuzukommen. In verschiedenen Studien wurde versucht, mit

Hilfe der Messung von IL-2 und IL-2R in Serum und Urin eine Art Monitoring des Immunstatus nach Transplantation durchzuführen, um Abstoßungsreaktionen frühzeitig und ohne Biopsie diagnostizieren zu können. Die Resultate dieser Untersuchungen zeigten übereinstimmend, dass bioptisch gesicherte Abstoßungen mit einer signifikanten Erhöhung der IL-2- und IL-2R-Konzentrationen in Serum und Urin assoziiert waren (Simpson *et al.*, 1989). Die Spezifität der Methode reichte jedoch nicht aus, um die Diagnose Abstoßungsreaktion unabhängig von anderen Parametern mit hinreichender Sicherheit stellen zu können.

1.6.2. INTERFERON- γ

IFN- γ ist ebenfalls ein wichtiges Th₁-Zytokin. Es wird nach antigenvermittelter Aktivierung von T-Zellen und NK-Zellen gebildet. Interferone wirken über spezifische Rezeptoren auf ihre Zielzellen. IFN- γ induziert die Expression von MHC-II-Molekülen auf myelomonozytären Zellen, T-Lymphozyten, Mastzellen, Fibroblasten, Neuronen, Melanozyten und auf einer Vielzahl von Tumorzellen. Die vermehrte Expression von MHC-II-Antigenen stimuliert wiederum die Aktivität von T-Helfer-Zellen. Es fördert die Differenzierung zur Th₁-Subpopulation bei gleichzeitiger Hemmung der durch IL-4 und IL-10 vermittelten Th₂-Effekte (Farrar und Schreiber, 1993; Male und Coke, 1996). IFN- γ aktiviert zytotoxische T-Lymphozyten und erhöht die Aktivität von NK-Zellen. Es hat potenzierende Effekte auf die Sekretion von Immunglobulinen durch Plasmazellen in der späten Phase der Immunantwort und hemmt das IL-4-abhängige Wachstum der B-Zellen. IFN- γ ist ein potenter Aktivator von Makrophagen.

1.7. Th₂-ZYTOKINE

Th₂-Lymphozyten sezernieren nach Antigenkontakt unter anderem IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 und stimulieren dadurch humorale Immunreaktionen. Vor allem extrazelluläre Pathogene wie Parasiten und Würmer induzieren eine Th₂-Antwort. Diese ist unter anderem durch das Auftreten eosinophiler Lymphozyten und Antikörpern vom Typ IgE und IgG₁ gekennzeichnet. Th₂-Effekte spielen auch bei allergischen Erkrankungen wie dem Asthma bronchiale eine bedeutende Rolle.

1.7.1. INTERLEUKIN-4

IL-4 ist das Leit-Zytokin der Th₂-Subpopulation und wird auch von Mastzellen produziert. Es steigert die Expression von MHC-II-Antigenen auf den Effektorzellen des Immunsystems, wirkt als Co-Stimulus für die B-Zell-Proliferation und stimuliert hämatopoetische Stammzellen. IL-4 antagonisiert durch IFN- γ ausgelöste Th₁-Effekte, hemmt die Aktivierung von Makrophagen und wirkt somit antiinflammatorisch. Untersuchungen in vitro konnten eine Hemmung der Proliferation und Differenzierung von Th₁-Lymphozyten durch IL-4 nachweisen (Paliard *et al.*, 1988).

1.7.2. INTERLEUKIN-6

Prinzipiell sind verschiedene Zellen wie Th₂-Zellen, B-Lymphozyten, Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Keratinozyten und Mesangiumzellen in der Lage, IL-6 zu produzieren (Le und Vilcek, 1989; Van, 1990). Die wichtigsten biologischen Effekte von IL-6 sind die Induktion der B-Zell-Differenzierung, die Induktion von Akut-Phase-Proteinen in den Hepatozyten, die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen sowie die Reifungsinduktion von Megakaryozyten. In vitro-Untersuchungen zeigten darüber hinaus, dass IL-6 ein autokriner Wachstumsfaktor für Mesangiumzellen ist (Ruef *et al.*, 1990). Untersuchungen nach allogener Nierentransplantation deuten darauf hin, dass die Messung von IL-6 in Serum und Urin das postoperative Monitoring erleichtern könnte. Schon einige Tage bevor akute Abstoßungsreaktionen klinisch auffallen, sind erhöhte IL-6-Konzentrationen in Serum und Urin transplantierte Patienten nachweisbar (Waiser *et al.*, 1997). Mittels in situ-Hybridisierung konnte in Transplantatbiopsien die vermehrte Expression von IL-6 in glomerulären Zellen, Tubulusepithelien, glatten Muskelzellen, Gefäßendothelien und interstitiellen mononukleären Infiltraten bei akuten Abstoßungsreaktionen nachgewiesen werden (Vandenbroecke *et al.*, 1991).

1.7.3. INTERLEUKIN-10

IL-10 wird vor allem von aktivierten Th₂-Zellen und Makrophagen gebildet (Bogdan *et al.*, 1992). IL-10 fördert die Differenzierung und stimuliert die Antikörperproduktion von B-Lymphozyten. Gleichzeitig hemmt es die zelluläre Immunität, indem es die

Expression von MHC-II-Antigenen und kostimulatorischen Molekülen auf Makrophagen supprimiert. Darüber hinaus hemmt IL-10 die Bildung von Sauerstoffradikalen in Makrophagen sowie die Synthese und Sekretion der proinflammatorischen Th₁-Zytokine IL-2 und IFN- γ (Girndt *et al.*, 1995).

1.8. TUMORNEKROSEFAKTOR- α

Das proinflammatorisch wirkende Zytokin TNF- α wird von aktivierten Makrophagen, natürlichen Killerzellen, Antigen-stimulierten T-Zellen sowie Mastzellen produziert. Es spielt eine wesentliche Rolle bei der Auslösung von lokalen, IL-1-vermittelten und systemischen, IL-6-vermittelten Entzündungsvorgängen (Produktion von hepatischen Akut-Phase-Proteinen und Fieber). Über die Induktion lokaler COX-2 wird wesentlich die entzündliche Schmerzreaktion ausgelöst (Staines und Brostoff, 1999). Die durch TNF- α ausgelösten Effekte Entzündung, Gewebeabbau, Kachexie und Endotoxinschock werden durch IFN- γ verstärkt. TNF- α erhöht die IL-2R-Expression und die IL-2-abhängige Produktion von IFN- γ . Die exzessive Freisetzung von TNF- α ist zudem mitverantwortlich für die lebensbedrohlichen Reaktionen (CRS) nach Gabe des monoklonalen Antikörpers OKT3.

1.9. GRANULOZYTEN / MAKROPHAGEN-KOLONIE-STIMULIERENDER FAKTOR

GM-CSF wurde zunächst als Glykoprotein beschrieben, das die Ausreifung von pluripotenten Knochenmarksstammzellen zu Granulozyten und Makrophagen fördert. GM-CSF nimmt darüber hinaus Einfluss auf Funktionen reifer Granulozyten und Makrophagen. Es wirkt chemotaktisch auf Granulozyten, fördert deren Überleben *in vitro* und die Expression von Oberflächenmarkern. GM-CSF stimuliert die Phagozytoseaktivität und die Zytotoxizität neutrophiler Granulozyten. Ferner erhöht GM-CSF die Histaminfreisetzung von basophilen und die Zytotoxizität von eosinophilen Granulozyten. Neben IFN- γ ist GM-CSF der wichtigste Aktivator der Funktion reifer Makrophagen. Es stimuliert die Freisetzung von IL-1, TNF- α und PGE₂ und vermindert die Expression des IL-2R (Metcalf, 1986). GM-CSF stimuliert die Proliferation einiger T-Zell-Linien und wirkt als Ko-Mitogen für *in vitro* aktivierte T-Zellen. Die Beobachtung, dass viele organspezifische Zellen GM-CSF synthetisieren, und in ihrer Funktion von GM-CSF beeinflusst werden, zeigt, dass GM-CSF nicht nur für die Hämatopoese von

essentieller Bedeutung ist, sondern auch in der peripheren Immunantwort ein wichtiges regulatorisches Zytokin darstellt (Ruf und Coleman, 1990). Die spezifische Rolle von GM-CSF bei einer Transplantatabstoßung wurde bislang noch nicht ausreichend untersucht (Budde *et al.*, 1994). Es ist jedoch wahrscheinlich, dass GM-CSF bei der Aktivierung und Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in der Frühphase einer Rejektion von Bedeutung ist.

1.10. PROSTAGLANDINE

Prostaglandine sind Metaboliten des Arachidonsäurestoffwechsels. Sie können in den meisten Geweben aus arachidonsäurehaltigen Phospholipiden der Zellmembranen gebildet werden. Hauptquelle von Arachidonsäuremetaboliten sind myelomonocytaire Zellen, aber auch ortsständige Zellen, wie Mesangiumzellen (Pfeilstifter *et al.*, 1989; Coyne und Morrison, 1990; Floege *et al.*, 1990; Nakazato *et al.*, 1991) Endothelzellen (Endo *et al.*, 1988) und glatte Muskelzellen sind in der Lage, Prostaglandine zu synthetisieren. Durch die Bindung an Prostaglandin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche wird die Signaltransduktion eingeleitet. Die Aktivierung des Enzyms Adenylatcyclase bewirkt intrazellulär die Umwandlung von Adenosintriphosphat (ATP) zu cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Der Anstieg von cAMP vermittelt die Prostaglandin-effekte. An den Belegzellen der Magenschleimhaut hemmen Prostaglandine der Gruppe E die Salzsäuresekretion. Dieser physiologische, zytoprotektive Mechanismus wird bei der Behandlung und Prophylaxe von Magengeschwüren ausgenutzt. Prostaglandine wirken außerdem uteruskontrahierend und kommen aus diesem Grunde in der Geburtshilfe zur Geburtseinleitung zur Anwendung. Bei der Therapie von schweren peripheren arteriellen Durchblutungsstörungen (Carlsson und Eriksson, 1973) und angeborenen Herzfehlern (persistierender Ductus arteriosus) bedient man sich der durch Relaxierung glatter Gefäßmuskelzellen ausgelösten Vasodilatation. Über den gleichen Mechanismus wird auch die renale Durchblutung gesteigert (Kirschenbaum, 1977; Chevalier *et al.*, 1987; Eppel *et al.*, 2006). Zusätzlich hemmen Prostaglandine die Plättchenaggregation. Prostaglandine sensibilisieren die Schmerzrezeptoren, wirken als Mediatoren bei der durch IL-1 ausgelösten Fieberentstehung im Hypothalamus und sind am Entzündungsgeschehen durch Gefäßerweiterung und Wirkungsverstärkung von Histamin beteiligt. An der Niere wirken Prostaglandine hemmend auf den Effekt von ADH am distalen Tubulus und stimulierend auf die Freisetzung von Renin. Die

Nephrotoxizität nicht-steroidaler Antiphlogistika resultiert aus der Hemmung der renalen Prostaglandinsynthese (Dunn *et al.*, 1984). Neben den günstigen Effekten auf die renale Hämodynamik, Filtration und Exkretion verfügen vasodilatierende Prostaglandine (PGE₁₊₂, PGI₂) auch über antiproliferative und immunmodulierende Effekte (Goodwin und Ceuppens, 1983; Goodwin, 1991; Phipps *et al.*, 1991). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Prostaglandine der E-Klasse die Inzidenz der Primärfunktionsrate nach allogener Nierentransplantation verbessern und akute Rejektionen verhindern (Strom und Carpenter, 1983; Rowles *et al.*, 1986). Letzteres konnte in einer klinischen Studie belegt werden. Unter Medikation mit Misoprostol (Cytotec®) kam es zu einer signifikanten Verminderung der Inzidenz akuter Rejektionen innerhalb der ersten drei Monate nach allogener Nierentransplantation (Moran *et al.*, 1990). Langzeituntersuchungen wurden jedoch nicht durchgeführt und die zugrunde liegenden biologischen Mechanismen nicht untersucht. In vitro erhobene Befunde zur wechselseitigen Regulation von Prostaglandinen und Zytokinen erlauben die Annahme, dass die in vivo beobachteten protektiven Effekte zumindest partiell durch eine Änderungen der Zytokinfreisetzung immunkompetenter Zellen hervorgerufen werden (Walker *et al.*, 1983; Schad und Phipps, 1988; Roper *et al.*, 1990).

Misoprostol ist ein Prostaglandin E₁-Analogon. Die orale Bioverfügbarkeit des Esters der Misoprostolsäure beträgt altersunabhängig ca. 88%. Die maximale Konzentration im Plasma wird nach 12±3 Minuten erreicht, die biologische Halbwertszeit beträgt ca. 20–35 Minuten. Der biologisch wirksame Metabolit ist die freie Misoprostolsäure. Die rasche Inaktivierung erfolgt durch Dehydrogenasen und Reduktasen während der Passage durch Lungen, Milz, Nieren und Fettgewebe. Die Elimination erfolgt zu 75% renal (Schoenhard *et al.*, 1985).

1.11. INTERAKTIONEN ZWISCHEN PROSTAGLANDINEN UND ZYTOKINEN

Neben den Zytokinen übernehmen die Prostaglandine entscheidende Funktionen bei der Regulation der Immunantwort. In vitro lässt sich die PGE₂-Freisetzung von Makrophagen durch IL-1 (Censini *et al.*, 1989), IL-2 (Remick *et al.*, 1987), TNF-α (Marcinkiewicz, 1991), IFN-γ (Friteau *et al.*, 1988) und GM-CSF (Heidenreich *et al.*, 1989) beeinflussen. IL-1 fördert die mRNA-Expression von Cyclooxygenase und Phospholipase A₂ (Cominelli *et al.*, 1989). Umgekehrt führt die Zugabe von exogenem PGE₂ zu einer verminderten Expression von IL-2R auf der Oberfläche von

Makrophagen (Hancock *et al.*, 1988). PGE₂ kann außerdem die IL-1-Produktion, die TNF- α -Produktion und die durch IFN- γ induzierte MHC-II-Expression auf Makrophagen hemmen. Am Modell von Kupffer-Sternzellen konnte gezeigt werden, dass PGE₂ die LPS-stimulierte IL-1-Produktion in Form eines negativen Feedback-Mechanismus supprimiert (Shirahama *et al.*, 1988). Ähnliche Mechanismen sind auch für TNF- α beschrieben. Die zytotoxische Aktivität aktivierter Monozyten scheint ebenfalls dem Einfluss von Prostaglandinen zu unterliegen, wobei PGE₂ und Lipoxygenase-Produkte gegensätzliche Effekte haben (Braun *et al.*, 1990; Bonta und Ben-Efraim, 1990). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass Prostaglandine regulatorisch auf T- und B-Lymphozyten wirken. Über die Erhöhung von intrazellulärem cAMP, das mit dem Phosphatidyl-Inositol-Stoffwechsel interferiert (Rincon *et al.*, 1988; Kammer, 1988) und über eine Hemmung der Induktion von Proto-Onkogenen wie c-jun (Tamir und Isakov, 1991) können Prostaglandine die physiologische Aktivierung von T-Zellen über den TCR inhibieren. Weiterhin ist belegt, dass PGE₂ die Proliferation, die IL-2R-Expression (Johnson und Smith, 1990; Krause und Deutsch, 1991) und die IL-2-Produktion (Wacholtz *et al.*, 1991) von T-Lymphozyten inhibiert. Bemerkenswert ist, dass PGE₂ bei Th₁-Zellen eine Reduktion von Proliferation und Produktion von IL-2 und IFN- γ bewirkt, während Th₂-Zellen unbeeinflusst bleiben, obwohl es in beiden Fällen zu einer Erhöhung von cAMP kommt (Munoz *et al.*, 1990; Betz und Fox, 1991). Von B-Lymphozyten ist bekannt, dass PGE₁ (Patke *et al.*, 1991) und PGE₂ die Proliferation und die Differenzierung zu Immunglobulin-produzierenden Zellen hemmen. Auch Mesangiumzellen und andere organspezifische Zellen setzen nach Stimulation mit IL-1 oder TNF- α vermehrt Prostaglandine frei (Topley *et al.*, 1989). Indomethacin, ein nicht-steroidales Antiphlogistikum, ist in der Lage, durch Blockade der organständigen, lokalen Prostaglandinsynthese das IL-1-induzierte Wachstum von Mesangiumzellen zu steigern (Stahl *et al.*, 1990). Exogenes PGE₂ antagonisiert die proliferationsfördernde Wirkung von IL-1. Auf Fibroblasten stimuliert IL-1 die IL-1R-Expression durch endogene Prostaglandinproduktion. Ebenso kann durch exogene Zugabe von PGE₁ oder PGE₂ eine Zunahme der IL-1R-Expression erzielt werden (Korn *et al.*, 1989; Chiou *et al.*, 1990). In Analogie zur allogenen Transplantation spielen Prostaglandine und Zytokine bei der Toleranzinduktion im mütterlichen Organismus gegenüber dem Feten eine wichtige Rolle. IL-6 stimuliert die Prostaglandinproduktion in menschlichen Amnion- und Decidua-Zellen und hemmt dadurch die Aktivierung mütterlicher Leukozyten mit anti-Trophoblasten-Aktivität (Parhar *et al.*, 1989; Mitchell *et al.*, 1991). Diese beschriebenen

Interaktionen belegen, dass Zytokine und Prostaglandine in einem Netzwerk aus gegenseitiger Stimulation und Suppression eng miteinander verflochten sind.

1.12. IMMUNSUPPRESSIVA

Zur Vermeidung von Transplantatabstoßungen werden grundsätzlich zwei verschiedene Ansätze parallel verfolgt. Erstens kann eine möglichst gute Übereinstimmung von Spender- und Empfängergewebe (HLA-Match) die ungewollte Immunantwort begrenzen. Zweitens kann durch die medikamentöse Beeinflussung der Immunantwort des Empfängers die Abstoßungsreaktion unterdrückt werden. Trotz beachtlicher Erfolge auf dem Gebiet der medikamentösen Immunsuppression in den letzten Jahren ist das Problem der Transplantatabstoßung noch nicht gelöst. Vor allem chronische Veränderungen in der Transplantatnieren können bis heute nicht ausreichend verhindert werden, teilweise trägt auch die immunsuppressive Therapie selbst zur Organschädigung bei (z.B. chronische CNI-Nephrotoxizität). Darüber hinaus hat die Einnahme der Immunsuppressiva erhebliche Nebenwirkungen, insbesondere die erhöhte Infektanfälligkeit und das erhöhte Malignomrisiko. Das Ziel bei der Entwicklung neuer Immunsuppressiva besteht daher in der Erhöhung der Spezifität der Wirkung auf das Immunsystem bei gleichzeitiger Reduktion unerwünschter Nebenwirkungen mit dem Ergebnis einer lebenslangen spezifischen Immuntoleranz.

1.12.1. STEROIDE

Prednisolon (Decortin H[®]) und Methylprednisolon (Urbason[®]), die ältesten in der Prophylaxe akuter Rejektionen eingesetzten Medikamente, gehören den modernen Therapieprotokollen unverändert an. Glukokortikoide penetrieren die Zellmembran und binden an zytoplasmatische Rezeptoren. Der entstandene Komplex dringt in den Zellkern ein und interagiert mit spezifischen DNS-Sequenzen, den sogenannten glucocorticoid response elements. In den Makrophagen wird die Transkription von IL-1, IL-6 und TNF- α inhibiert. Durch die Hemmung der MHC-Expression wird zusätzlich die T-Zell-Aktivierung verhindert (Fertsch *et al.*, 1987; Zimmer und Jones, 1990; Politis *et al.*, 1992). In T-Zellen hemmen Glukokortikoide die IL-2-Produktion, außerdem kommt es zu einer Verminderung der IL-2R-Bindungsfähigkeit. Durch Hemmung von Transkription und Translation des Phospholipase-Gens und der Translation der

Prostaglandin-Synthetase kommt es zu einer Verminderung der Eicosanoidsynthese (Nakano *et al.*, 1990; Bailey, 1991). Die verminderte Expression dieser Faktoren, die für die Aktivierung von Endothelzellen und die daraus resultierende Expression von Adhäsionsmolekülen maßgeblich sind, reduziert die Adhäsion und damit die gerichtete Migration von Entzündungszellen in das Transplantat (Pober und Cotran, 1990). Steroide weisen ein erhebliches Nebenwirkungspotential auf. Selbst unter einer niedrig dosierten Erhaltungstherapie werden Katarakte, Steroidakne, Psychosen, Magen-Ulzera und Hirsutismus beobachtet. Die katabolen Eigenschaften der Steroide verursachen Wundheilungsstörungen sowie Atrophie von Muskulatur und Haut. Zudem ist das Risiko für die Entwicklung einer Osteoporose durch Auflösung der mesenchymalen Knochenmatrix, durch die teilweise Vitamin-D-antagonistische Wirkung und durch die Hemmung der Knochenneubildung infolge verminderter Expression des Prokollagen I-Gens erhöht. Nierentransplantierte Patienten sind wegen des häufig gleichzeitig bestehenden Hyperparathyreoidismus diesbezüglich besonders gefährdet. Eine Steroidtherapie hat darüber hinaus negative Auswirkungen auf das kardiovaskuläre Risikoprofil. Aufgrund mineralokortikoider Effekte kann es zu Wasser- und Natriumretention mit der Entwicklung eines arteriellen Hypertonus kommen. Die glukokortikoiden Wirkungen können zur Manifestation eines Diabetes mellitus führen, zudem verschlechtern die Steroide das Lipidprofil. Wegen der häufigen und erheblichen Nebenwirkungen wurden in den letzten Jahren vermehrt Versuche zur vorzeitigen Beendigung der Steroidtherapie nach Transplantation unternommen (Opelz, 1995). Unter einer Kombinationstherapie mit Mucophenolsäure und einem Calcineurininhibitor ist es möglich, am Ende des ersten Jahres nach Transplantation Steroidfreiheit zu erzielen, ohne dass es zu einer vermehrten Inzidenz akuter Rejektionen kommt (Budde *et al.*, 2001).

1.12.2. CALCINEURININHIBITOREN

CNI sind unverzichtbarer Bestandteil moderner immunsuppressiver Therapieregime. CNI hemmen reversibel die IL-2-Produktion von T-Lymphozyten, welche für deren Aktivierung von entscheidender Bedeutung ist.

1.12.2.1. CYCLOSPORIN A

Der Wirkstoff wurde 1976 aus der norwegischen Flechte (*Tolypocladium inflatum gams*) isoliert. Er wirkt wie alle Cyclosporine entzündungshemmend, antimykotisch und antiparasitär, vor allem aber immunsuppressiv. Die Markteinführung von CsA (Sandimmun[®]) im Jahre 1983 revolutionierte die Transplantationsmedizin. CsA ist heute ein Basismedikament der immunsuppressiven Therapie. Es bindet an zytosolischen Proteinen, den Cyclophyllinen. Cyclophylline sind Isomerasen, welche die cis-trans-Konformationsänderung von Peptiden katalysieren. Der aktive Komplex aus CsA und Cyclophyllin bindet an Calcineurin und inhibiert diese calciumabhängige Phosphatase. Durch die Hemmung des Calcineurins wird die Dephosphorylierung des nuclear factor of activated T-cells (NFAT) verhindert. NFAT kann somit nicht mehr vom Zytoplasma in den Zellkern übertreten und die Aktivierung des IL-2-Gens bleibt aus. Dadurch wird die T-Zell-Aktivierung und die Produktion proinflammatorischer Zytokine reversibel gehemmt. Die Spezifität von CsA erklärt sich aus der Tatsache, dass NFAT nur in T-Lymphozyten vorhanden ist. CsA ist ein Medikament mit einer geringen therapeutischen Breite. Wesentlichen Beitrag zur Dosistitration und zum zuverlässigen Therapiemonitoring leistete die Weiterentwicklung der Galenik. Statt als lipophile Suspension mit intra- und interindividuell sehr variabler Absorption steht CsA seit Mitte der 90er Jahre als wasserlösliche Mikroemulsion (Sandimmun Optoral[®]) zur Verfügung. Die Resorptionsfähigkeit des Präparates nach oraler Einnahme wurde dadurch deutlich verbessert. Nach intestinaler Absorption wird CsA an Erythrozyten und Lipoproteine gebunden. CsA wird hepatisch über das Cytochrom P450-System metabolisiert und zu 95% biliär und zu 5% renal eliminiert. Bei der Therapie sind aus diesem Grund Interaktionen mit einer Reihe von Medikamenten, die ebenfalls mit dem Cytochrom P450-System interagieren, zu berücksichtigen. Die bedeutendste unerwünschte Nebenwirkung ist die Nephrotoxizität. Man unterscheidet die akute Nephrotoxizität infolge Vasokonstriktion an den Vasa afferens von der chronischen Toxizität in Form einer irreversiblen Nephrosklerose (Kopp und Klotman, 1990). Unter der Therapie mit CsA kann sich ein arterieller Hypertonus aufgrund generalisierter Vasokonstriktion und Natriumretention entwickeln oder verstärken. Spezifische Nebenwirkungen sind darüber hinaus Hyperlipidämie, Hirsutismus und die Ausbildung einer Gingivahyperplasie.

1.12.2.2. TACROLIMUS

Das lipophile Tacrolimus wurde 1984 als Produkt des Actinomyceten *Streptomyces tsukubaensis* isoliert. Als Medikament ist Tacrolimus / FK 506 (Prograf®) seit 1995 verfügbar. Die reversible Hemmung der Signaltransduktion in den T-Helferzellen entsteht durch die Bindung an das zytosolische FK-Bindungsprotein 12 (FKBP 12). Der FK506-FK-Bindungsproteinkomplex inhibiert ähnlich wie CsA die Phosphatase Calcineurin und verhindert dadurch die Transkription und Produktion von IL-2. Tacrolimus wird nach intestinaler Absorption zu 95% an Erythrozyten gebunden. Nur der nicht gebundene Anteil ist pharmakologisch wirksam. Die Elimination erfolgt hepatisch, die Halbwertszeit variiert zwischen 4 und 40 Stunden. CsA und Tacrolimus haben den gleichen Wirkmechanismus und weisen daher auch ein ähnliches Nebenwirkungsprofil auf. Beide Medikamente wirken auch in vergleichbarem Ausmaß nephrotoxisch (Mihatsch *et al.*, 1998; Henry, 1999). Unter Tacrolimus werden allerdings häufiger neurotoxische (z. B. Tremor, Krampfanfälle, Enzephalopathie) und gastro-intestinale Nebenwirkungen beobachtet. Die Inzidenz eines Diabetes mellitus ist im Vergleich zu einer Therapie mit CsA erhöht. Die Beta-Zell-Toxizität am Pankreas ist dosisabhängig und bei Dosisreduktion reversibel. Im Gegensatz zu CsA führt Tacrolimus nicht zu einer Hyperlipidämie. Die immunsuppressive Potenz von Tacrolimus ist im Vergleich zu CsA deutlich höher (Han *et al.*, 1995; Halloran *et al.*, 1998). Dementsprechend liegen die therapeutischen Wirkstoffkonzentrationen im Blut für Tacrolimus mit 5-10 µg/l in der Erhaltungstherapie und 10-15 µg/l in der Initialtherapie deutlich niedriger als für CsA (Erhaltungstherapie: 100-150 µg/l, Initialtherapie: 150-250 µg/l).

1.12.3. SIROLIMUS

Sirolimus / Rapamycin (Rapamune®) ist ein aus dem Streptomyceten *Streptomyces hygroscopicus* isoliertes Makrolid. Sirolimus und Tacrolimus sind verwandte Substanzen, die jedoch einen unterschiedlichen Wirkmechanismus haben. Sirolimus bindet wie Tacrolimus an das zytosolische FK-Bindungsprotein 12. Durch Komplexbildung mit dem spezifischen Zielprotein mTOR, mammalian target of rapamycin, einer Phosphatidylinositol-3-Kinase, wird die Aktivierung der p34cdc2-Kinase und die Komplexbildung mit Cyclin E verhindert. Dies bedingt, dass der Übertritt der T-Zellen

von der G₁-Phase in die S-Phase des Zellzyklus und damit die Proliferation verhindert wird. Im Unterschied zu den CNI bleibt die IL-2-Produktion aktivierter T-Zellen erhalten. Die Elimination erfolgt hepatisch. Die Halbwertszeit beträgt 57–63 Stunden. Klinische Untersuchungen bestätigen eine im Vergleich zu CsA und Tacrolimus geringere Nephrotoxizität (Kreis, 2001; Oberbauer *et al.*, 2005). Relevante Nebenwirkungen sind Myelotoxizität, Hyperlipidämie und Wundheilungsstörungen (Morelon *et al.*, 2001). Rapamune[®] ist seit 2001 für die Prophylaxe von Rejektionen nach Nierentransplantation zugelassen. Die therapeutischen Wirkstoffkonzentrationen werden mit 4-12 µg/l in der Erhaltungstherapie und 12-20 µg/l in der Initialtherapie angegeben.

1.12.4. ANTIMETABOLITE

1.12.4.1. AZATHIOPRIN

Imurek[®] wird seit 1962 in der Transplantationsmedizin eingesetzt. Das Purinanalogen wird enzymatisch in 6-Mercaptopurin umgewandelt. Aus 6-Mercaptopurin entstehen Thionukleotide, die durch Hemmung der 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat-Synthese sowie durch Hemmung der Konversion von Inositol-Monophosphat zu AMP und GMP die de-novo Synthese von Purin-Nukleotiden inhibieren (Elion, 1989). Die Hemmung von DNA- und RNA-Synthese führt zur Hemmung der Proliferation von T-Lymphozyten. Die Zytokinsynthese bereits aktivierter Lymphozyten wird im Gegensatz dazu nicht beeinflusst. Die myelosuppressive Wirkung führt zu klinisch relevanten Nebenwirkungen wie Leukopenie, Thrombopenie und Anämie. Gastrointestinale Nebenwirkungen wie Cholestase (Sparberg *et al.*, 1969), Hepatitis oder Pankreatitis (Mallory und Kern, 1980) können ebenfalls auftreten. Die immunsuppressiven Eigenschaften prädisponieren zu malignen Hautläsionen (Blohme und Larko, 1984). Azathioprin ist potenziell teratogen und karzinogen. Aufgrund der im Vergleich zu Mucophenolsäure geringeren immunsuppressiven Wirkung und der gut dokumentierten Nebenwirkungen wird Azathioprin in der Primärtherapie nach Nierentransplantation nur noch sehr selten eingesetzt.

1.12.4.2. MYCOPHENOLAT-MOFETIL

Mycophenolat-Mofetil (Cellcept[®]) ist ein Ester der Mucophenolsäure (MPA), die erstmalig aus dem Pilz *Penicillium stoloniferum* isoliert wurde. MPA ist heute essentieller

Bestandteil der Immunsuppression nach Nierentransplantation. MPA hemmt reversibel die Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), das Schlüsselenzym der Purinbiosynthese. Die IMPDH liegt intrazellulär als konstitutive Form (Typ I) und als induzierbare Form (Typ II) vor. Die induzierbare IMPDH findet sich vorwiegend in aktivierten Lymphozyten und ist etwa fünfmal empfindlicher auf MPA. Durch Hemmung der IMPDH wird die Synthese des Purins Guanin blockiert, konsekutiv werden die RNA- und die DNA-Synthese und damit Proteinbiosynthese und Zellproliferation inhibiert (Eugui *et al.*, 1991). MPA hat eine gute orale Bioverfügbarkeit und wird nach hepatischer Metabolisierung zu MPA-Glucuronid (MPAG) vorwiegend renal eliminiert. Häufig treten gastro-intestinale Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen oder Diarrhoe auf, die in der Regel nach Dosisreduktion sistieren. Seltener werden myelotoxische Nebenwirkungen beobachtet. Unter der Therapie mit MPA wird eine erhöhte Inzidenz für CMV-Infekte beobachtet. Die Patienten erhalten daher parallel eine antivirale Prophylaxe.

1.12.5. ANTILYMPHOZYTÄRE ANTIKÖRPER

Zur Induktionstherapie vor Nierentransplantation können monoklonale oder polyklonale Antikörper gegen T-Zellen eingesetzt werden. OKT3 (Orthoclone[®]) ist ein muriner monoklonaler Antikörper gegen den CD3-Komplex auf T-Lymphozyten. Thymoglobulin[®] und Lymphoglobulin[®] sind polyklonale Immunsereen gegen humane T-Lymphozyten vom Kaninchen bzw. vom Pferd. Diese Substanzen führen zur Deaktivierung und Zerstörung von T-Lymphozyten. Zu Beginn der Therapie kann es jedoch zu einer polyklonalen Aktivierung der T-Zellen mit Ausschüttung von Zytokinen und einer lebensbedrohlichen Sofortreaktionen kommen (CRS, cytokine release syndrome). Darüber hinaus bewirken diese Substanzen eine sehr starke Immunsuppression durch eine unspezifische Zerstörung aller T-Lymphozyten. Funktionsfähige T-Zellen in ausreichender Anzahl sind erst einige Tage nach Therapie wieder nachweisbar. Dadurch ist die Infektanfälligkeit stark erhöht. Langfristig fand man darüber hinaus eine erhöhte Inzidenz von lymphoproliferativen Erkrankungen bei diesen Patienten (Swinnen *et al.*, 1990; Opelz *et al.*, 2006). Moderner und seit Ende der 90er Jahre verfügbar sind Basiliximab (Simulect[®]), ein monoklonaler chimärer Antikörper gegen die α -Kette des IL-2R, sowie Daclizumab (Zenapax[®]), ein monoklonaler humanisierter Antikörper gegen die α -Kette des IL-2R. Diese Antikörper blockieren die Bindung des autokrinen Wachstumsfaktors IL-2 an den IL-2R auf T-Lymphozyten.

1.12.6. THERAPEUTISCHE MEDIKAMENTENSPIEGEL

Für die in dieser Arbeit untersuchten Immunsuppressiva werden die nachfolgend genannten therapeutischen Wirkstoffkonzentrationen im Blut angegeben.

	Talspiegel	Spitzenspiegel
PGE₁ (Cawallo <i>et al.</i> , 1995)	5 – 10 ng/ml	400 – 800 ng/ml
Cyclosporin A (Oellerich <i>et al.</i> , 1995)	100 – 350 ng/ml	700 – 1400 ng/ml
Methylprednisolon (Rota <i>et al.</i> , 1992)	50 – 700 ng/ml	20 µg/ml
Mycophenolat (Shaw <i>et al.</i> , 2000)	1 – 3,5 µg/ml	40 µg/ml

1.13. ZIEL DER VORGELEGTEN ARBEIT

Die zentrale Bedeutung der T-Lymphozyten für Rejektionen nach allogenen Organtransplantationen ist durch die Akzeptanz allogener Transplantate in T-Zell-defizienten Tieren belegt (Chavin *et al.*, 1993; Bishop *et al.*, 1994). Das vermehrte Auftreten der Th₂-Zytokine IL-4 und IL-10 in tolerierten Organen legt die Vermutung nahe, dass den Th₁-Zytokinen bei der Abstoßungsreaktion eine wesentliche Funktion zukommt (Sun *et al.*, 1992; Isobe *et al.*, 1997; DerSimonian *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2004). Die Balance zwischen Th₁- und Th₂-Zytokinen hat scheinbar einen wesentlichen Einfluss auf das Überleben eines Spenderorgans (Mottram *et al.*, 1995; Suzuki *et al.*, 1999; Ganschow *et al.*, 2001). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll die Frage beantwortet werden, ob den klinisch beobachteten immunsuppressiven Wirkungen von PGE₁ (Moran *et al.*, 1990) Änderungen der Proliferation und der Zytokinproduktion peripherer Lymphozyten zugrunde liegen. Insbesondere soll überprüft werden, ob die Einnahme von Misoprostol

in vivo zu einer qualitativen Veränderung der Zytokinexpression im Sinne einer überwiegenden Expression von Th₂-Zytokinen führt.

Die Untersuchung der IL-2-Produktion ist unverzichtbar, weil die T-Zell-Aktivierung Ausgangs- und Mittelpunkt einer Abstoßungsreaktion ist. Dieser Parameter kann daher als Maß für die Aktivierung von T-Lymphozyten genutzt werden (Lechler *et al.*, 1990). In Serum und Urin wurden erhöhte Konzentrationen von IL-2 und IL-2R bei Rejektionen gemessen (Hancock *et al.*, 1987; Niguma *et al.*, 1991; Cho *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2004). Außerdem wurde gezeigt, dass PGE die IL-2-Produktion und IL-2R-Expression supprimiert (Rappaport und Dodge, 1982; Santoli und Zurier, 1989; Felli *et al.*, 1996). Diese Befunde machen deutlich, dass IL-2 eine zentrale Rolle in der Pathogenese von Abstoßungsreaktionen einnimmt und die exogene Gabe von PGE₁ über einen Eingriff in diesen Regulationsmechanismus zu einer verbesserten Transplantatfunktion führen könnte (Haynes *et al.*, 1992; Mnich *et al.*, 1995; Goronzy *et al.*, 1996; Miles *et al.*, 2003). IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin, das bei Abstoßungsreaktionen im Nierengewebe vermehrt exprimiert wird. Auch in Serum und Urin sind bei Rejektionen erhöhte IL-6-Konzentrationen messbar (Waiser *et al.*, 1997). Über mögliche Interaktionen zwischen IL-6 und Prostaglandinen ist wenig bekannt. Der hemmende Effekt von IL-6 auf mütterliche Leukozyten in der Decidua, der durch Stimulation der Prostaglandinsynthese vermittelt wird, ist ein Beispiel für in Frage kommende Mechanismen. Die GM-CSF-Expression bei Rejektionen wurde bisher kaum untersucht (Budde *et al.*, 1994). Die vielfältigen GM-CSF-Effekte innerhalb des Immunsystems legen aber die Vermutung nahe, dass GM-CSF auch bei Abstoßungsreaktionen bedeutsam ist. Insbesondere sein Einfluss auf die Expression von IL-2R und auf die Produktion von Zytokinen lassen weitere Untersuchungen lohnenswert erscheinen. Zur Beurteilung der Th₂-Immunantwort soll die Expression von IL-4 und IL-10 untersucht werden.

Die Schwerpunkte unserer Untersuchungen lagen auf dem zeitlichen Verlauf (Kinetik), der Dosisabhängigkeit (Dosis-Wirkung) und der individuellen Variabilität. Sämtliche Fragestellungen wurden in vitro, in Zellkulturversuchen an peripheren mononukleären Zellen, und in vivo, an gesunden Probanden, untersucht.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. MATERIALIEN

2.1.1. PROBANDEN FÜR IN VIVO-VERSUCHE

An den in vivo-Versuchen nahmen gesunde Probanden im Alter von 21 bis 36 Jahren, die keine weitere Medikation einnahmen, teil. Alle Probanden erklärten nach ausführlicher Aufklärung über die Studie ihr Einverständnis.

2.1.2. ZELLEN FÜR IN VITRO-VERSUCHE

Für die Zellkulturversuche wurden Lymphozyten aus dem peripheren venösen Blut von drei gesunden Personen, 1 weibliche und 2 männliche, aus dem o.g. Kollektiv, mit Hilfe der Ficoll-Dichtegradienten-Separation isoliert.

2.1.3. ZELLKULTURMEDIUM UND PUFFER

RPMI 1640, Low Endotoxin: seromed[®] Biochrom KG, Berlin, Deutschland, Nr. F1215

L-Glutamin: seromed[®] Biochrom KG, Nr. 0282

Fetales Kälberserum (FCS): 10%, seromed[®] Biochrom KG, Nr. S2423

Penicillin: 1%, seromed[®] Biochrom KG, Nr. A2213

Streptomycin: 1%, seromed[®] Biochrom KG, Nr. A331-27

Phosphate Buffered Saline (PBS): seromed[®] Biochrom KG, Nr. L1825

2.1.4. CHEMIKALIEN

2.1.4.1. LYMPHOZYTENISOLIERUNG

Ficoll-Paque Research Grade: Pharmacia Biotech[®], Schweden, Nr. 252886

2.1.4.2. LYMPHOZYTENPROLIFERATIONSTEST

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT): Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland, Nr. M5655

MTT-Lösung: 5 mg/ml MTT in PBS

n-Dodecylsulfat-Natriumsalz (SDS): Merck, Darmstadt, Deutschland, Nr. 13760

SDS-Lösung: 10% SDS in 0,01 M HCl

anti-CD3-mab: Orthoclone[®], Sigma-Aldrich, Nr. C2350

2.1.4.3. ZYTOKIN-ELISA

Coating Solution: 0,1 M NaHCO₃, pH 8,2

PBS Solution: 80,0 g NaCl, 11,6 g Na₂HPO₄, 2,0 g KH₂PO₄, 2,0 g KCl, q.s. 10 l, pH 7,0

NaHCO₃: 7,5%, seromed[®] Biochrom KG, Nr. L1715

Tween-20 pure: Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg, Deutschland, Nr. 03767

PBS/Tween: 0,5 ml Tween-20 pure in 1000 ml PBS

Avidinperoxidase: 1 mg/ml, Sigma-Aldrich, Nr. A3151

Wasserstoffperoxid: 30%, Merck, Nr. K240800097

2,2-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic-acid) ABTS: Sigma-Aldrich, Nr. A1888

ABTS-Substrat-Solution: 150 mg 2,2-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic-acid) und 500 ml 0,1 M Citric Acid in dH₂O, pH 4,35

n-Dodecylsulfat-Natriumsalz (SDS): Merck, Nr. 13760

N,N-dimethylformamide DMF: Merck, Nr. K21620234

SDS/DMF-Stop-Solution: 80 g SDS und 200 ml N,N-dimethylformamide in 220 ml dH₂O

2.1.5. ANTIKÖRPER

Alle Antikörper und die Zytokin-Standards für die Zytokin-ELISA-Tests wurden von der Firma Pharmingen, San Diego, USA, erworben.

2.1.5.1. CAPTURE-ANTIKÖRPER

Die Test-Antikörper wurden einheitlich in der Konzentration 2 µg/ml verwendet.

anti-hu-IL2-c-mab: Pharmingen, Nr. 18951D
anti-hu-IL4-c-mab: Pharmingen, Nr. 18651D
anti-hu-IL6-c-mab: Pharmingen, Nr. 18871D
anti-hu-IL10-c-mab: Pharmingen, Nr. 18551D
anti-hu-IFN-γ-c-mab: Pharmingen, Nr. 18891D
anti-hu-TNF-α-c-mab: Pharmingen, Nr. 18631D
anti-hu-GM-CSF-c-mab: Pharmingen, Nr. 18581D

2.1.5.2. DETECTION-ANTIKÖRPER

Die Biotin-markierten Antikörper wurden einheitlich in der Konzentration 1 µg/ml verwendet.

anti-hu-IL2-d-mab: Pharmingen, Nr. 20672D
anti-hu-IL4-d-mab: Pharmingen, Nr. 18502D
anti-hu-IL6-d-mab: Pharmingen, Nr. 18882D
anti-hu-IL10-d-mab: Pharmingen, Nr. 18562D
anti-hu-IFN-γ-d-mab: Pharmingen, Nr. 18902D
anti-hu-TNF-α-d-mab: Pharmingen, Nr. 18642D
anti-hu-GM-CSF-d-mab: Pharmingen, Nr. 18592D

2.1.6. ZYTOKIN-STANDARDS

r-hu-IL-2: Pharmingen, Nr. 19621T
r-hu-IL-4: Pharmingen, Nr. 19641V
r-hu-IL-6: Pharmingen, Nr. 19661V
r-hu-IL-10: Pharmingen, Nr. 19701V
r-hu-IFN-γ: Pharmingen, Nr. 19751N
r-hu-TNF-α: Pharmingen, Nr. 19761T
r-hu-GM-CSF: Pharmingen, Nr. 19741V

2.1.7. IMMUNSUPPRESSIVA

Misoprostol / Cytotec®: Heumann Pharma GmbH, Nürnberg, Deutschland

Prostaglandin E₁: Sigma-Aldrich, Nr. P8908

Cyclosporin A: Sigma-Aldrich, Nr. C3662

Methylprednisolon: Sigma-Aldrich, Nr. M0639

Mycophenolat: Sigma-Aldrich, Nr. M3536

2.1.8. PLASTIKWAREN

Mikrotiter-Platten 96-well: Falcon Microtest™ Tissue Culture Plate, steril, Becton Dickinson, USA, Nr. 3072

Mikrotiter-Platten 6-well: Falcon Multiwell™ Tissue Culture Plate, steril, Becton Dickinson, Nr. 3046

Zentrifugenröhrchen: Conical Centrifuge Tube, steril, 15 ml, Nalge Nunc International, Naperville, USA, Nr.151791

Falcon-Röhrchen 50 ml: steril, Nunc International, Nr. 420702

ELISA-Platten: Nunc-Immuno™ Plate, Maxi-Sorp™ Surface, Nalge Nunc International, Dänemark, Nr. 2442404

Reaktionsgefäße 1,5 ml: Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland, Nr. 0030 102 002

2.1.9. GERÄTE

Laminar-Flow: Holten LaminAir, HB 2448, Dänemark

Brutschrank: Heto Cell House 200, Allerød, Dänemark

Zentrifuge: Heraeus Megafuge 2.0 R, Heraeus Instrumente GmbH, Berlin, Deutschland

Zentrifuge: Biofuge fresco, Heraeus Instrumente GmbH

ELISA-Reader: MRX Microplate Reader, Dynatech Laboratories, Guersney, Island

Vortexer: Vortex-Genie 2™ G-650E, Scientific Industries, New York, USA

Pipette: LaminAir PiaAccu

Pipettenspitzen: Falcon® Serological pipet, steril, 10 ml, Becton Dickinson

Mikroskop: DM Inverses Lichtmikroskop für Zellkulturen, Leica, Wetzlar, Deutschland

Hämocytometer: Neubauer Improved Precicolor, Deutschland

2.2. METHODEN

2.2.1. ISOLIERUNG DER LYMPHOZYTEN

Zur Isolierung der Lymphozyten aus dem peripheren venösen Blut wurde das etablierte Verfahren der Ficoll-Dichtegradienten-Separation angewandt. Vollblut wurde in sterilen Röhrchen mit PBS-Puffer zu gleichen Teilen verdünnt. Sterile Röhrchen mit je 4 ml Ficoll-Lösung wurden vorsichtig mit 10 ml Blut-Puffer-Gemisch überschichtet und anschließend für 20 Minuten bei 2400 U/min bei Raumtemperatur (T_R) zentrifugiert. Beim Zentrifugieren wandern Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte durch die Ficoll-Schicht und setzen sich am Boden des Röhrchens ab. Lymphozyten haben eine geringere Dichte als die Ficoll-Lösung und kommen daher in einer Schicht zwischen Ficoll-Lösung und Plasma zu liegen. Mit einer sterilen Pasteurpipette wurde diese Lymphozytenschicht vorsichtig abgesaugt und in ein neues Röhrchen übertragen. Anschließend wurden die Zellen in calcium- und magnesium-freien PBS-Puffer aufgenommen und bei 1500 U/min für 5 Minuten (T_R) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und der Waschvorgang wiederholt. Das so gewonnene und gewaschene Pellet wurde in je 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (Mikamo, 1988).

2.2.2. ZELLKULTURBEDINGUNGEN

Die isolierten Lymphozyten wurden in RPMI-Flüssigmedium kultiviert, welches Zusätze aus Serum (10% fetales Kälberserum), Antibiotika (Penicillin und Streptomycin) und Glutamin enthielt. Die Osmolarität betrug 290 mOsm/Kg und ist in dieser Modifikation besonders für die Kultivierung von peripheren humanen Lymphozyten geeignet (Lindl und Bauer, 1989). Einstellungen des Brutschrankes: 37,0 °C, 5% CO₂ 95% relative Luftfeuchtigkeit.

2.2.3. STIMULATION DER LYMPHOZYTEN

Für die Proliferationstests und für die Untersuchungen der Zytokinproduktion wurden die Lymphozyten mit dem monoklonalen Antikörper aCD3mab in einer Konzentration von 10 ng/ml stimuliert. Der CD-3-Komplex bildet zusammen mit dem T-Zell-Rezeptor

(TCR) den T-Zell-Rezeptorkomplex (TCR-CD3-Komplex). Dieser wird auf allen T-Lymphozyten exprimiert und ist für die Signaltransduktion in das Innere der Zelle verantwortlich (Weiss *et al.*, 1986). Anti-CD3 wirkt auf alle T-Zellen mitogen und aktiviert sie zur Zytokinproduktion, Proliferation und Ausübung ihrer Effektorfunktionen. Diese Stimulation der T-Lymphozyten *in vitro* imitiert die Antigen-spezifische Stimulation *in vivo* (Lindl und Bauer, 1989).

2.2.4. LYMPHOZYTENPROLIFERATIONSTEST

Die isolierten und gewaschenen Lymphozyten wurden im Zellkulturmedium resuspendiert, die Zellzahl mikroskopisch bestimmt und die Zelldichte auf 1×10^6 /ml eingestellt. Die Zellsuspension wurde in 96-well Mikrotiter-Platten, 100 μ l pro Napf, ausgesät. Die Proben wurden in An- oder Abwesenheit stimulierender α CD3mab für 72 Stunden bei 37,0 °C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurden 20 μ l sterile MTT-Lösung pro Napf zugesetzt und die Zellen für weitere 5 Stunden im Brutschrank inkubiert. MTT, ein schwach gelber Farbstoff, wird von mitochondrialen Dehydrogenasen durch Aufspaltung des Tetrazoliumringes in dunkelblaues Formazan umgewandelt. Die Menge des gebildeten Formazans ist direkt proportional zur Mitochondrienaktivität und somit ein Maß für die Anzahl lebender Zellen. Anschließend wurden pro Napf 100 μ l SDS zugesetzt. SDS als Detergenz lysiert die Zellen und setzt das gebildete Formazan frei. Die Intensität der Farblösung wurde photometrisch bei einer Testwellenlänge von 570 nm bestimmt.

2.2.5. ZYTOKINPRODUKTION UND -NACHWEIS

Auch für die Zytokintests wurde die Zelldichte auf 1×10^6 /ml eingestellt. Je 5 ml Zellsuspension wurden in 6-well Mikrotiter-Platten pipettiert und in Anwesenheit stimulierender α CD3mab über 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellkulturüberstände gewonnen und für 10 Minuten bei 3000 U/min (T_R) zentrifugiert. Die zellfreien Überstände wurden zu je 1 ml pro Eppendorf-Hütchen portioniert und bei -20 °C eingefroren.

2.2.5.1. ZYTOKIN-ELISA

Alle Zytokinmessungen wurden mittels ELISA, einem quantitativen und sensitiven enzym-immunologischen Testverfahren durchgeführt (Pharmingen, 1996). Bei diesem etablierten Verfahren wurde eine 96-well Mikrotiter-Platte mit 50 µl des gereinigten und verdünnten Testantikörpers (Capture-Antikörper) beschichtet. Nach 12stündiger Inkubationszeit bei 4 °C wurde die Platte mit PBS/Tween gewaschen. Nach 2stündiger Inkubation mit PBS / FCS (T_R) waren alle unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Die so vorbereitete ELISA-Platte ist zum Auftragen der Proben bereit. Jeweils 100 µl der Standards und der zellfreien Kulturüberstände wurden pro Napf aufgetragen und bei 4 °C für 12 Stunden inkubiert. Nach wiederholtem Waschen zur Entfernung aller nicht spezifisch gebundenen Anteile wurden 100 µl des Biotin-markierten Antikörpers (Detection-Antikörper) aufgetragen und die Proben erneut 45 Minuten (T_R) inkubiert. Durch erneutes Waschen mit PBS / Tween wurden ungebundene Detection-Antikörper entfernt. Anschließend wurde das Enzym Avidinperoxidase, welches an die gebundenen, Biotin-markierten Antikörper bindet, aufgebracht. Nach 30 Minuten wurde das Substrat (ABTS) für die Farbreaktion zugegeben. Die Farbreaktion kann beobachtet und optional mit SDS / DMF gestoppt werden. Die Farbintensität ist direkt proportional zu der Konzentration spezifisch gebundener Zytokine und wurde photometrisch bei einer Testwellenlänge von 405 nm bestimmt.

2.3. PROBANDENVERSUCHE

2.3.1. INDIVIDUELLE VARIABILITÄT DER LYMPHOZYTENPROLIFERATION

In Vorbereitung auf die in vivo-Studie mit Misoprostol wurde die Lymphozytenproliferation 36 gesunder Probanden im Alter von 24 bis 36 Jahren ($28,4 \pm 4,0$ Jahre) untersucht. Allen Personen wurde zur gleichen Tageszeit, um 8:00 Uhr, peripher venöses Blut entnommen. Die Lymphozyten der 19 männlichen und 17 weiblichen Probanden wurden mittels der Ficoll-Dichtegradienten-Separation isoliert. Mit einer Zelldichte von 1×10^6 /ml wurden je 100 µl/well der Zellsuspension in 96-well Mikrotiter-Platten ausgesät und mit aCD3mab in einer Konzentration von 10 ng/ml stimuliert. Nach 72stündiger Inkubation wurde die Proliferation mit Hilfe des MTT-Tests gemessen.

2.3.2. EINFLUSS DER TAGESZEIT AUF DIE LYMPHOZYTENPROLIFERATION

Danach wurde neun Probanden im Alter von 25 bis 36 Jahren ($26,3 \pm 2,3$ Jahre) zu unterschiedlichen Tageszeiten, morgens 8:00 Uhr, mittags 12:00 Uhr und abends 18:00 Uhr, peripher venöses Blut entnommen, um die Lymphozytenproliferation in Abhängigkeit von der Tageszeit zu untersuchen. Die Lymphozyten der sieben männlichen und zwei weiblichen Probanden wurden isoliert, mit einer Zelldichte von $1 \times 10^6/\text{ml}$ in 96-well Mikrotiter-Platten zu je 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ ausgesät, und mit aCD3mab in einer Konzentration von 10 ng/ml stimuliert. Nach 72stündiger Inkubationszeit wurde die Proliferation mit dem MTT-Test gemessen.

2.4. MISOPROSTOL-PROBANDENSTUDIE

2.4.1. KINETIK DER LYMPHOZYTENPROLIFERATION UND ZYTOKINPRODUKTION

Zunächst wurde an fünf gesunden Probanden im Alter von 26 bis 31 Jahren, mittleres Alter $28,6 \pm 2,1$ Jahre, die Lymphozytenproliferation in zeitlicher Abhängigkeit von der einmaligen Einnahme von 200 μg Misoprostol (Cytotec[®], orales PGE₁-Analogon) sehr engmaschig untersucht (Screening). Den Probanden wurde unmittelbar vor Einnahme der Medikation, morgens 8:00 Uhr, peripheres venöses Blut entnommen. Dieser Wert jedes Probanden wurde als Ausgangswert (100%) definiert. Jedem Probanden wurde 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h und 12 h nach Einnahme erneut Blut entnommen. Mittels der Ficoll-Dichtegradienten-Separation wurden die Lymphozyten der drei männlichen und zwei weiblichen Probanden isoliert. Mit einer Zelldichte von $1 \times 10^6/\text{ml}$ wurden je 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ der Zellsuspension in 96-well Mikrotiter-Platten ausgesät und mit aCD3mab in einer Konzentration von 10 ng/ml stimuliert. Nach 72stündiger Inkubationszeit wurde die Proliferation mit dem MTT-Tests gemessen. Die Werte nach Einnahme der Medikation wurden mit dem Ausgangswert (morgens 8:00 Uhr, vor Einnahme, 100%) desselben Probanden am selben Tag verglichen.

Anschließend wurde an weiteren 13 gesunden Probanden im Alter von 24 bis 36 Jahren, mittleres Alter $29,0 \pm 4,2$ Jahre, der Einfluss der Einnahme von 200 μg Misoprostol auf die Lymphozytenproliferation und auf die Zytokinexpression untersucht. Venöse Blutproben wurden jeweils morgens 8:00 Uhr, vor Einnahme (100%) sowie 3 h, 6 h, 9 h und 12 h nach der Medikamenteneinnahme entnommen. Die Lymphozyten der

sieben weiblichen und sechs männlichen Probanden wurden isoliert, mit einer Zelldichte von 1×10^6 /ml in 96-well Mikrotiter-Platten zu je 100 μ l/well ausgesät, und mit aCD3mab in einer Konzentration von 10 ng/ml stimuliert. Nach 72stündiger Inkubationszeit wurde die Lymphozytenproliferation gemessen.

Für die Bestimmung der Zytokinkonzentrationen wurden je 5 ml Zellsuspension in 6-well Mikrotiter-Platten ausgesät und in Anwesenheit stimulierender aCD3mab in einer Konzentration von 10 ng/ml inkubiert. Die Zelldichte wurde ebenfalls auf 1×10^6 /ml eingestellt. Nach 24stündiger Inkubation wurden die zellfreien Überstände gewonnen, portioniert und bei -20 °C eingefroren. Die Zytokinkonzentrationen in den Überständen wurden innerhalb von vier Wochen mittels Sandwich-ELISA gemessen.

2.4.2. EINFLUSS DER MISOPROSTOL-DOSIS AUF LYMPHOZYTENPROLIFERATION UND ZYTOKINPRODUKTION

An dieser Stelle wurde untersucht, ob Misoprostol in vivo einen dosisabhängigen Effekt auf die Lymphozytenproliferation hat. Zwanzig gesunde Probanden, 11 männliche und 9 weibliche, im Alter von 21 bis 36 Jahren, mittleres Alter $26,6 \pm 4,4$ Jahre, erhielten an nicht aufeinanderfolgenden Tagen Misoprostol (Cytotec®) in aufsteigender Dosierung (50 μ g, 100 μ g, 200 μ g, 400 μ g) per os. Die Messzeitpunkte wurden entsprechend der Ergebnisse der vorangegangenen Kinetik-Untersuchungen gewählt: vor der Einnahme der Medikation (morgens 8:00 Uhr, Ausgangswert, 100%) sowie jeweils 4 h (12:00 Uhr) und 9 h (17:00 Uhr) nach der Medikation wurde Blut entnommen. Die isolierten Lymphozyten wurden im Zellkulturmedium suspendiert. Die Zellsuspension (1×10^6 /ml, 100 μ l/well) wurde in 96-well Mikrotiter-Platten ausgesät. Die Zellen wurden mit aCD3mab (10 ng/ml) stimuliert und die Proliferation nach 72stündiger Inkubation mit dem MTT-Test gemessen.

Zusätzlich wurde untersucht, ob Misoprostol in vivo dosisabhängige Effekte auf die Zytokinproduktion hat. Stellvertretend für die Th₁-Zytokine wurden IL-2 und IFN- γ , für die Th₂-Zytokine IL-4 und IL-10 untersucht. Hierzu wurden je 5 ml Zellsuspension mit einer Zelldichte von 1×10^6 /ml in Anwesenheit stimulierender aCD3mab in 6-well Mikrotiter-Platten ausgesät. Nach 24stündiger Inkubation wurden die zellfreien Überstände gewonnen, portioniert und bei -20 °C eingefroren. Die Zytokinkonzentrationen wurden innerhalb von vier Wochen mittels Sandwich-ELISA gemessen. Die Ausgangswerte (morgens 8:00 Uhr, vor Einnahme) wurden jeweils als 100%

definiert. Die Messwerte nach der Einnahme wurden mit den korrespondierenden Werten des Kontrolltages (keine Einnahme) verglichen.

2.5. ZELLKULTURVERSUCHE

2.5.1. EINFLUSS VERSCHIEDENER IMMUNSUPPRESSIVA AUF LYMPHOZYTEN-PROLIFERATION UND ZYTOKINPRODUKTION IN VITRO

Abschließend wurde der Einfluss von PGE₁, CsA, MP und MPA auf die Lymphozytenproliferation und die Zytokinproduktion in vitro untersucht.

Lymphozyten wurden aus dem peripher venösen Blut gesunder Probanden isoliert. Die Zellsuspension (1×10^6 /ml, 100 µl/well) wurde in 96-well Mikrotiter-Platten ausgesät. Die Lymphozyten wurden mit verschiedenen Konzentrationen von PGE₁, CsA, MP und MPA und in Anwesenheit von aCD3mab (10 ng/ml) für 72 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Lymphozytenproliferation mit Hilfe des MTT-Tests gemessen. Zusätzlich wurde die Zytokinproduktion von IL-2 (Th₁-Zytokine) und IL-10 (Th₂-Zytokine) im Kulturüberstand untersucht. Hierzu wurden je 5 ml Zellsuspension (1×10^6 /ml) mit verschiedenen Konzentrationen von PGE₁, CsA, MP und MPA und in Anwesenheit stimulierender aCD3mab (10 ng/ml) in 6-well Mikrotiter-Platten ausgesät. Nach 24stündiger Inkubation wurden die zellfreien Überstände gewonnen, portioniert und bei -20°C eingefroren. Die Zytokinkonzentrationen wurden innerhalb von vier Wochen mittels Sandwich-ELISA gemessen.

2.6. STATISTIK

Grundsätzlich wurden alle Tests in Form von Dreifachbestimmungen durchgeführt und daraus jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Zur Überprüfung von Unterschieden zwischen den Mittelwerten wurden Varianzanalyse, *t*-Test und Wilcoxon-Test angewandt. *p*-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

3. ERGEBNISSE

3.1. LYMPHOZYTENPROLIFERATION UNBEHANDELTEN PROBANDEN

3.1.1. INDIVIDUELLE VARIABILITÄT DER LYMPHOZYTENPROLIFERATION

Von 36 gesunden, unbehandelten Probanden wurde morgens um 8:00 Uhr Blut entnommen, um die Lymphozytenproliferation zu untersuchen. Die Proliferation variierte inter-individuell zwischen $0,111 \pm 0,006$ und $0,470 \pm 0,021$. Geschlechterspezifische Unterschiede zwischen den 17 weiblichen und 19 männlichen Probanden ($0,263 \pm 0,102$ vs. $0,250 \pm 0,101$) waren nicht nachweisbar (Abb. 1).

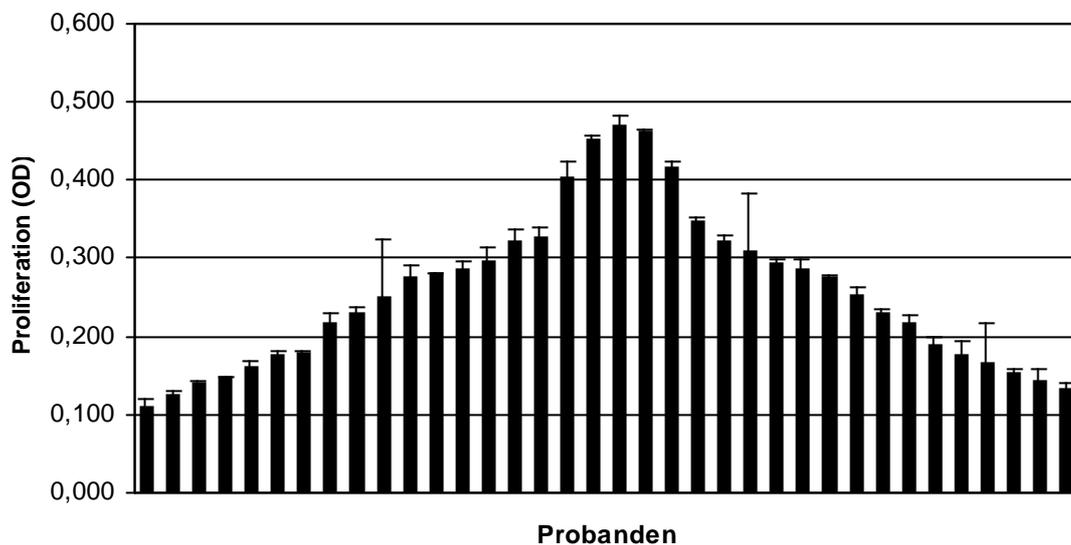


Abb. 1: Anti-CD3-stimulierte Lymphozytenproliferation gesunder Probanden um 8:00 Uhr.

3.1.2. EINFLUSS DER TAGESZEIT AUF DIE LYMPHOZYTENPROLIFERATION

An neun gesunden, unbehandelten Probanden wurde untersucht, ob die Proliferation peripherer Lymphozyten tageszeitlichen Schwankungen unterliegt. Zwischen den verschiedenen Tageszeiten wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet ($100,0\% \pm 35,7\%$ vs. $99,9\% \pm 16,4\%$ vs. $104,9\% \pm 19,6\%$), (Abb. 2).

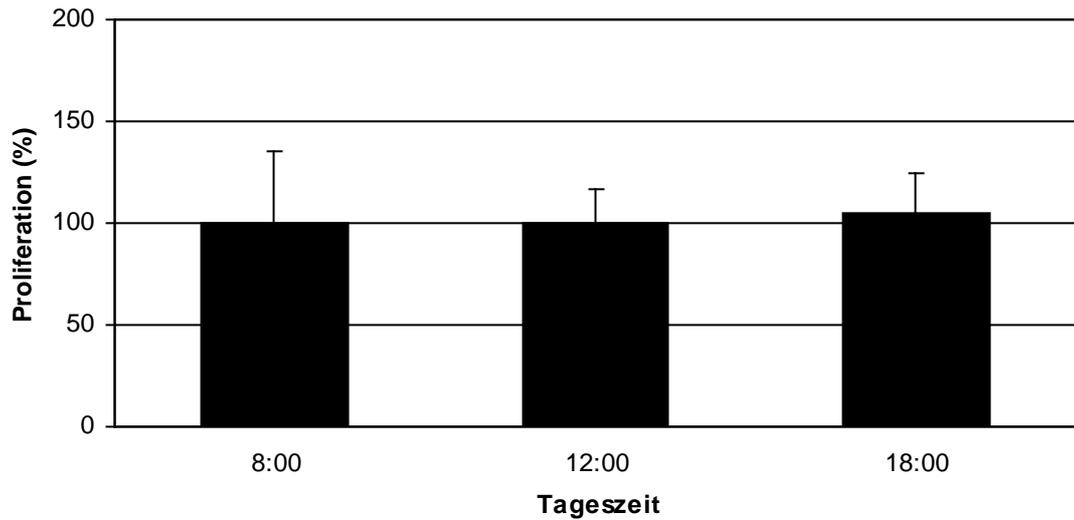


Abb. 2: Anti-CD3-stimulierte Lymphozytenproliferation in Abhängigkeit von der Tageszeit. Die 8:00 Uhr-Werte jedes Probanden wurden als Ausgangswert, entsprechend 100%, zugrunde gelegt.

3.2. MISOPROSTOL-PROBANDENSTUDIE

3.2.1. KINETIK DER LYMPHOZYTENPROLIFERATION

An fünf Probanden wurde die Kinetik der Lymphozytenproliferation nach Einnahme von 200 µg Misoprostol engmaschig untersucht.

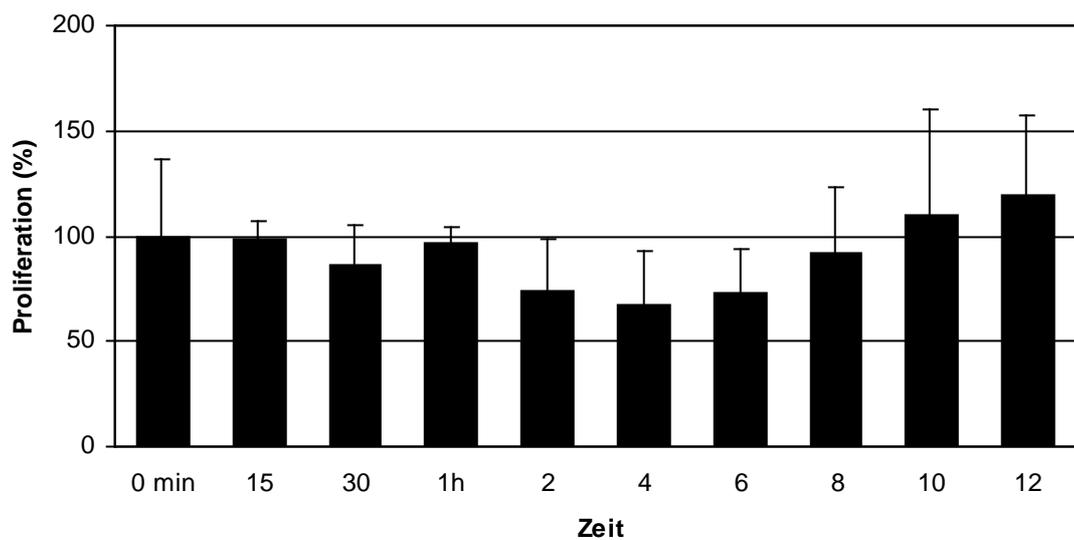


Abb. 3: Anti-CD3-stimulierte Lymphozytenproliferation vor und nach Einnahme von 200 µg Misoprostol. Die Werte nach Einnahme wurden auf den Ausgangswert vor Einnahme (0 min, 100%) bezogen.

Im zeitlichen Verlauf zeigte sich inter-individuell ein variabler Abfall der Proliferation um 1,1% bis 69,9%. Im Mittel fiel die Lymphozytenproliferation 4 Stunden nach Medikation um 33,0% ab ($100\% \pm 36,9\%$ vs. $67,0\% \pm 25,7\%$). Nach 10 Stunden wurde das Ausgangsniveau wieder erreicht ($100\% \pm 36,9\%$ vs. $110,1\% \pm 49,9\%$), (Abb. 3).

Zur Validierung der Ergebnisse untersuchten wir die Lymphozytenproliferation in zeitlicher Abhängigkeit zur Einnahme von 200 µg Misoprostol an einem größeren Kollektiv (n=13). Im zeitlichen Verlauf zeigte sich inter-individuell ein variabler Abfall der Lymphozytenproliferation um 13,7% bis 69,9%. Im Mittel fiel die Lymphozytenproliferation 4 Stunden nach Medikation um 41,3% ab ($100,0\% \pm 34,7\%$ vs. $58,7\% \pm 14,9\%$, $p < 0,05$). Die Rückkehr zum Ausgangsniveau wurde nach 12 Stunden beobachtet ($100,0\% \pm 34,7\%$ vs. $99,5\% \pm 36,7\%$). Zu keinem Zeitpunkt war ein signifikanter Unterschied zwischen den weiblichen und männlichen Probanden nachweisbar (8:00 Uhr: $107,9\% \pm 27,6\%$ vs. $94,6\% \pm 32,0\%$, 4h: $52,9\% \pm 18,0\%$ vs. $62,6\% \pm 12,7\%$, 12h: $107,8\% \pm 49,5\%$ vs. $93,9\% \pm 29,4\%$), (Abb. 4).

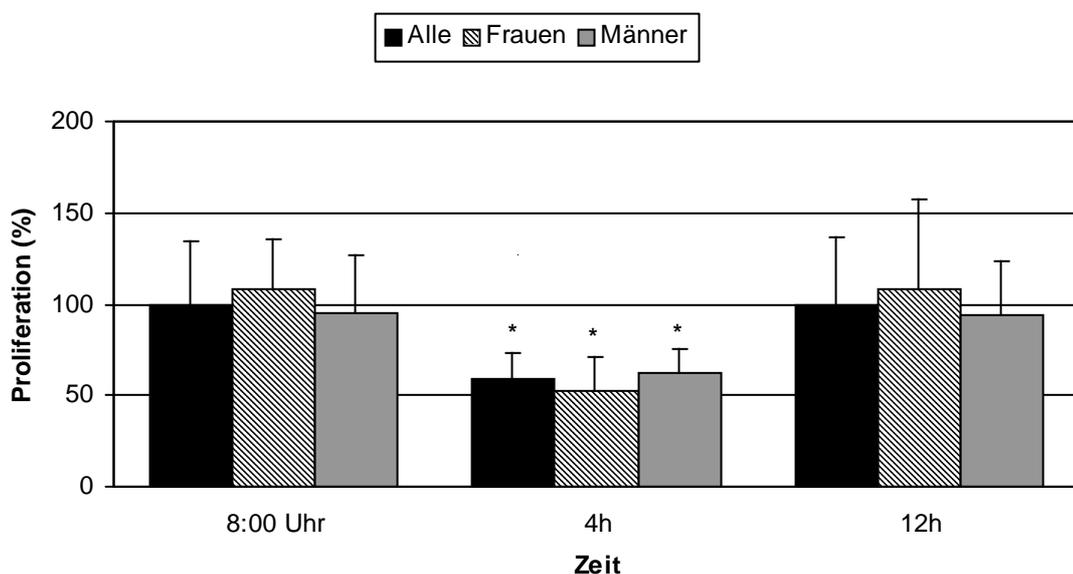


Abb. 4: Anti-CD3-stimulierte Lymphozytenproliferation vor (8:00 Uhr) und nach Einnahme (4h und 12h) von 200 µg Misoprostol. Die Werte vor Einnahme (8:00 Uhr) jedes Probanden wurden als Ausgangswert (100%) zugrunde gelegt. Die Werte nach Einnahme wurden auf den Ausgangswert bezogen.

* $p < 0,05$ vs. Ausgangswert.

3.2.2. KINETIK DER ZYTOKINPRODUKTION

An gesunden Probanden (n=13) wurde die Zytokinproduktion in zeitlicher Abhängigkeit zur Einnahme von 200 µg Misoprostol untersucht.

3.2.2.1. KINETIK DER IL-2-PRODUKTION

Die IL-2-Produktion fiel nach Einnahme von 200 µg Misoprostol nicht ab. Mittel fiel die IL-2-Produktion nach 9 Stunden um 15,4% ab, erreichte damit aber keine statistische Signifikanz ($100,0\% \pm 64,9\%$ vs. $84,6\% \pm 29,6\%$). Nach 12 Stunden stieg die IL-2-Produktion über Ausgangsniveau an, auch dieser Befund erreichte keine statistische Signifikanz ($100,0\% \pm 64,9\%$ vs. $189,1\% \pm 112,8\%$). Geschlechterspezifische Unterschiede waren ebenfalls nicht vorhanden (Abb. 5).

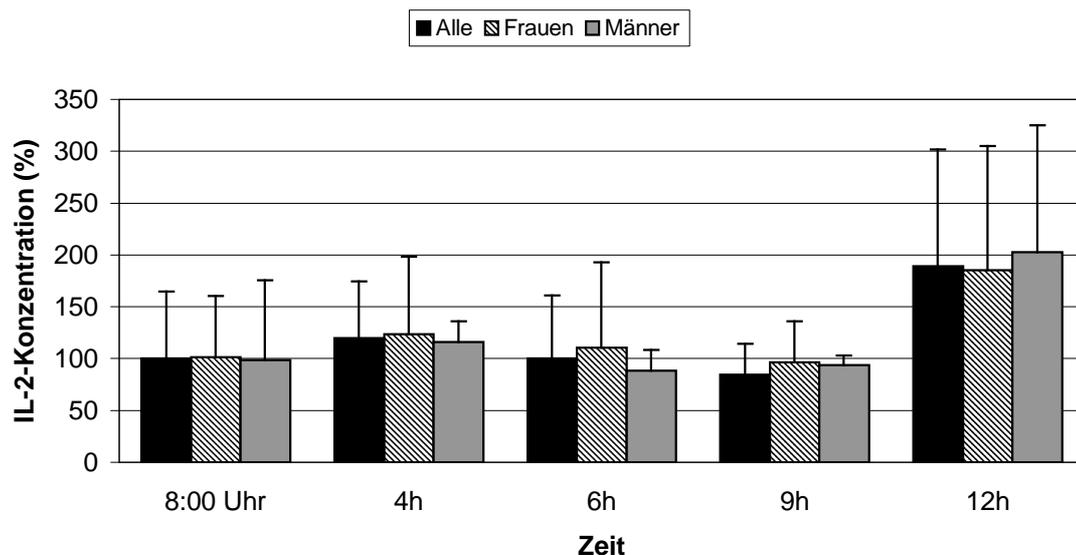


Abb. 5: Anti-CD3-stimulierte IL-2-Produktion vor (8:00 Uhr) und nach Einnahme (4h, 6h, 9h und 12h) von 200 µg Misoprostol. Die Werte vor Einnahme (8:00 Uhr) jedes Probanden wurden als Ausgangswert (100%) zugrunde gelegt.

3.2.2.2. KINETIK DER IFN- γ -KONZENTRATION

Die morgendlichen IFN- γ -Konzentrationen der männlichen Probanden lagen tendenziell höher als die der weiblichen Probanden ($137,9\% \pm 131,8\%$ vs. $88,9\% \pm 44,9\%$), der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Nach Einnahme von 200 µg Misoprostol fiel

die IFN- γ -Produktion ab, durchschnittlich um 30,5% nach 4 Stunden ($100,0\% \pm 101,6\%$ vs. $69,5\% \pm 71,7\%$, $p < 0,05$). Nach 12 Stunden war das Ausgangsniveau wieder erreicht ($100,0\% \pm 101,6\%$ vs. $100,1\% \pm 66,7\%$). Der maximale Abfall der IFN- γ -Produktion zeigte sich bei Männern nach 6 Stunden, bei Frauen nach 4 Stunden. Signifikante geschlechterspezifische Unterschiede waren nicht messbar (Abb. 6).

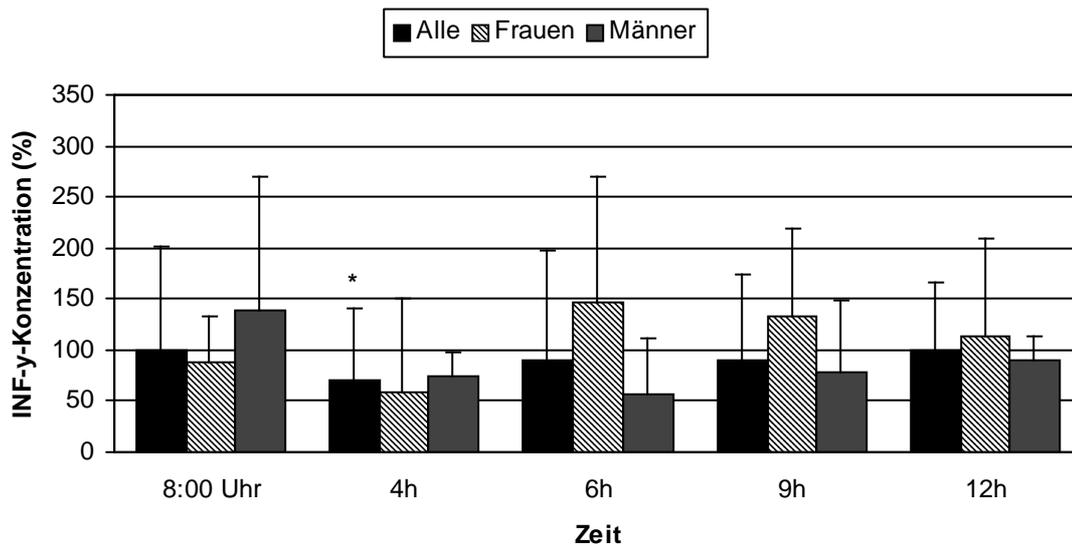


Abb. 6: Anti-CD3-stimulierte IFN- γ -Produktion vor (8:00 Uhr) und nach Einnahme (4h, 6h, 9h und 12h) von 200 μ g Misoprostol. Die Werte vor Einnahme (8:00 Uhr) jedes Probanden wurden als Ausgangswert (100%) zugrunde gelegt.

* $p < 0,05$ vs. Ausgangswert.

3.2.2.3. KINETIK DER IL-4-PRODUKTION

Nach Einnahme von 200 μ g Misoprostol stieg die IL-4-Produktion stetig an. Nach 9 Stunden war der Anstieg signifikant ($100,0\% \pm 30,3\%$ vs. $168,7\% \pm 59,5\%$, $p < 0,05$). Nach 12 Stunden wurden die höchsten IL-4-Konzentrationen innerhalb des Untersuchungszeitraumes gemessen, die IL-4-Produktion hatte sich mehr als verdoppelt ($100,0\% \pm 30,3\%$ vs. $263,6\% \pm 161,1\%$, $p < 0,05$). Die Steigerung der IL-4-Produktion fiel bei den Frauen deutlicher aus als bei den Männern (12h: $308,4\% \pm 200,0\%$ vs. $200,9\% \pm 54,4\%$), (Abb. 7).

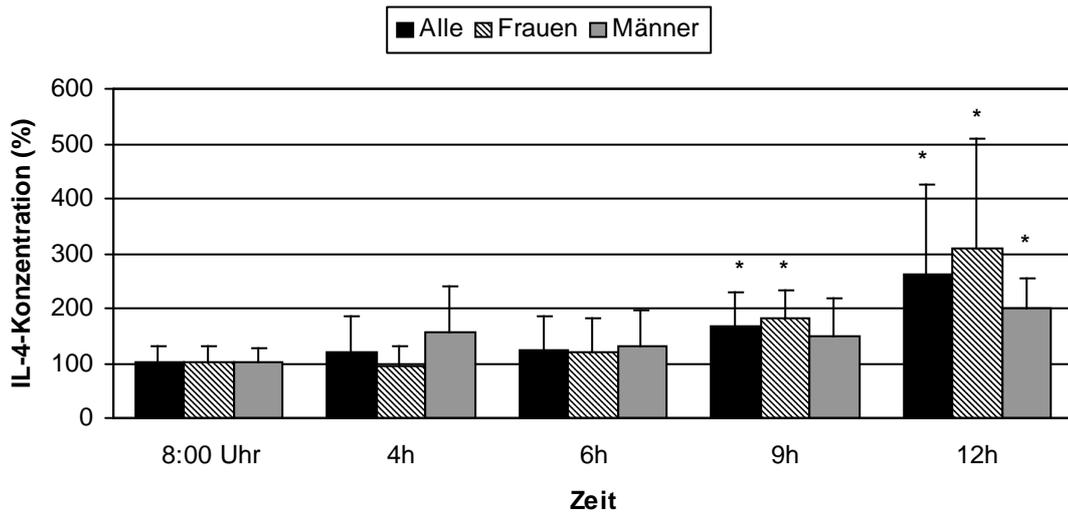


Abb. 7: Anti-CD3-stimulierte IL-4-Produktion vor (8:00 Uhr) und nach Einnahme (4h, 6h, 9h und 12h) von 200 µg Misoprostol. Die Werte vor Einnahme (8:00 Uhr) jedes Probanden wurden als Ausgangswert (100%) zugrunde gelegt. * $p < 0,05$ vs. Ausgangswert.

3.2.2.4. KINETIK DER IL-6-PRODUKTION

Nach der Einnahme von 200 µg Misoprostol fiel die IL-6-Produktion maximal um 17,2% ab (12h: 100,0% ± 42,8% vs. 82,8% ± 27,3%). Dieser Effekt war statistisch nicht signifikant. Weitere Veränderungen wurden nicht beobachtet (Abb. 8).

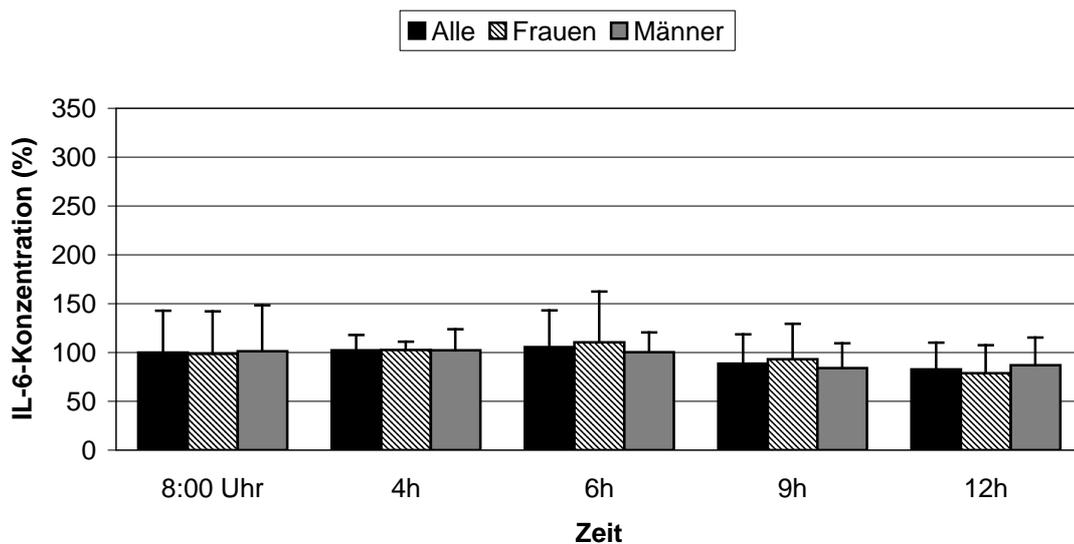


Abb. 8: Anti-CD3-stimulierte IL-6-Produktion vor (8:00 Uhr) und nach Einnahme (4h, 6h, 9h und 12h) von 200 µg Misoprostol. Die Werte vor Einnahme (8:00 Uhr) jedes Probanden wurden als Ausgangswert (100%) zugrunde gelegt.

3.2.2.5. KINETIK DER IL-10-PRODUKTION

Nach der Einnahme von 200 µg Misoprostol stieg die IL-10-Produktion stetig an. Nach 12 Stunden wurde eine Verdopplung der morgendlichen Ausgangskonzentrationen beobachtet (100,0% ± 38,3% vs. 225,8% ± 80,0%, $p < 0,05$). Dieses Ergebnis ließ sich sowohl für Frauen (12h: 106,4% ± 29,0% vs. 241,2% ± 47,6%, $p < 0,05$) als auch für Männer (12h: 90,8% ± 51,0% vs. 204,3% ± 114,9%, $p < 0,05$) nachweisen (Abb. 9).

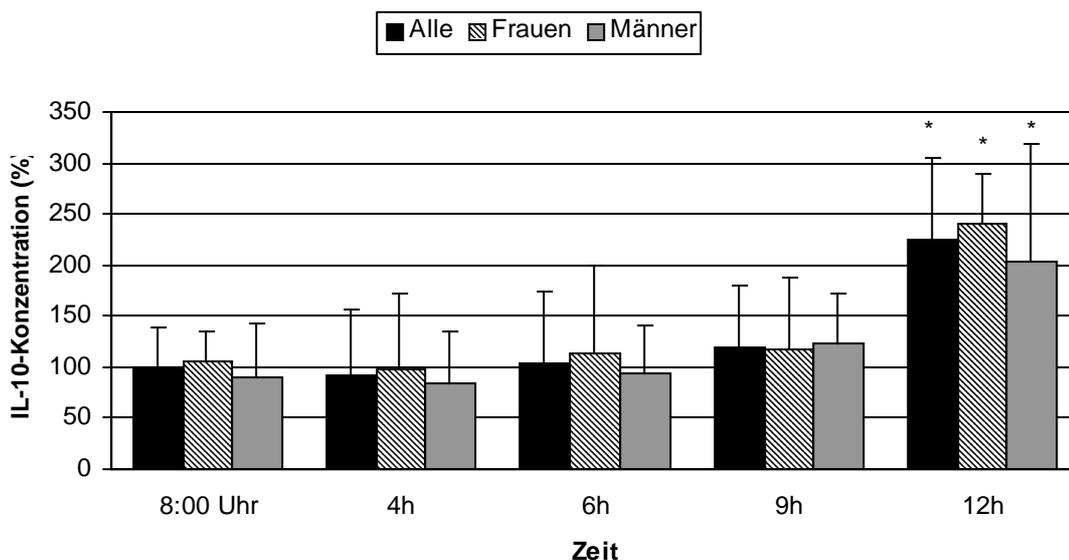


Abb. 9: Anti-CD3-stimulierte IL-10-Produktion vor (8:00 Uhr) und nach Einnahme (4h, 6h, 9h und 12h) von 200 µg Misoprostol. Die Werte vor Einnahme (8:00 Uhr) jedes Probanden wurden als Ausgangswert (100%) zugrunde gelegt.

* $p < 0,05$ vs. Ausgangswert.

3.2.2.6. KINETIK DER TNF- α -PRODUKTION

Die TNF- α -Produktion fiel nach Einnahme von 200 µg Misoprostol stetig ab. Der Abfall um 35,7% nach 9 Stunden war statistisch hoch signifikant (100,0% ± 53,8% vs. 64,3% ± 28,4%, $p < 0,005$). Der maximale Abfall um 37,1% zeigte sich nach 12 Stunden (100,0% ± 53,8% vs. 62,9% ± 30,0%, $p < 0,05$). Auffällig war, dass bei den männlichen Probanden keine signifikante Änderung der TNF- α -Produktion eintrat, während sich die TNF- α -Produktion bei den weiblichen Probanden nach 9 und 12 Stunden im Vergleich zur Ausgangskonzentration halbierte. Dieser geschlechterspezifische Unterschied war

signifikant (6h: $65,8\% \pm 26,7\%$ vs. $87,9\% \pm 20,7\%$, $p < 0,05$, 9h: $45,9\% \pm 31,8\%$ vs. $80,0\% \pm 14,0\%$, $p < 0,05$), (Abb. 10).

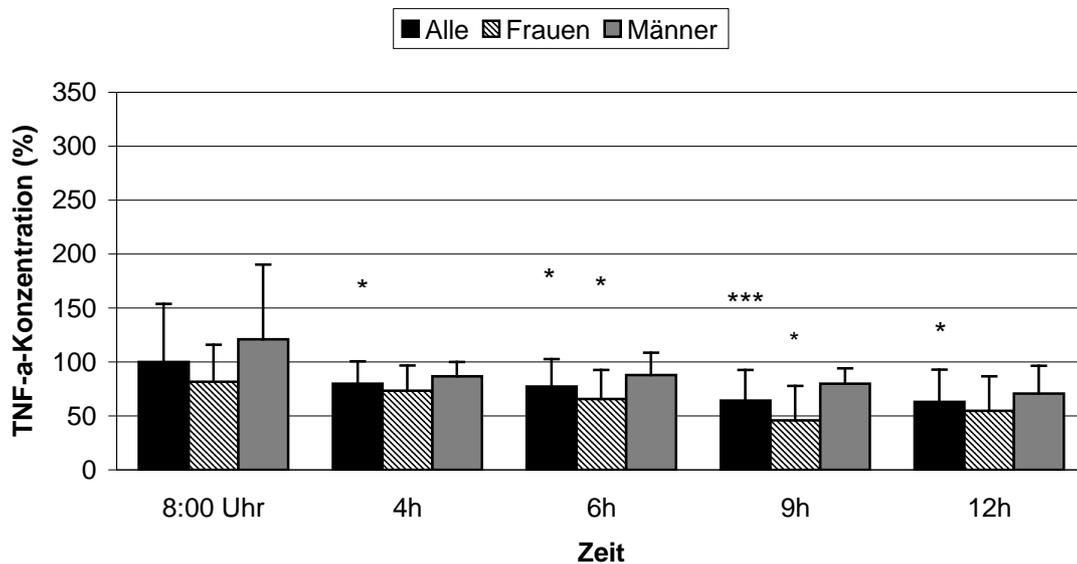


Abb. 10: Anti-CD3-stimulierte TNF- α -Produktion vor (8:00 Uhr) und nach Einnahme (4h, 6h, 9h und 12h) von 200 μ g Misoprostol. Die Werte vor Einnahme (8:00 Uhr) jedes Probanden wurden als Ausgangswert (100%) zugrunde gelegt.

* $p < 0,05$ vs. Ausgangswert.

*** $p < 0,005$ vs. Ausgangswert.

3.2.2.7. KINETIK DER GM-CSF-PRODUKTION

Nach Einnahme von 200 μ g Misoprostol fiel die GM-CSF-Produktion ab. Nach 4 Stunden um durchschnittlich 28,4% ($100,0\% \pm 25,2\%$ vs. $71,6\% \pm 19,2\%$, $p < 0,005$), nach 6 Stunden um durchschnittlich 18,6% ($100,0\% \pm 25,2\%$ vs. $81,4\% \pm 25,4\%$, $p < 0,05$). Im weiteren Verlauf stieg die GM-CSF-Produktion wieder an, um nach 12 Stunden wieder das Ausgangsniveau zu erreichen ($100,0\% \pm 25,2\%$ vs. $105,9\% \pm 18,9\%$). Die morgendlichen Ausgangskonzentrationen waren zwischen weiblichen und männlichen Probanden tendenziell, jedoch nicht statistisch signifikant unterschiedlich ($88,6\% \pm 13,9\%$ vs. $113,6\% \pm 30,2\%$). Der prozentuale Abfall der GM-CSF-Produktion zeigte keine geschlechterspezifischen Unterschiede (Abb. 11).

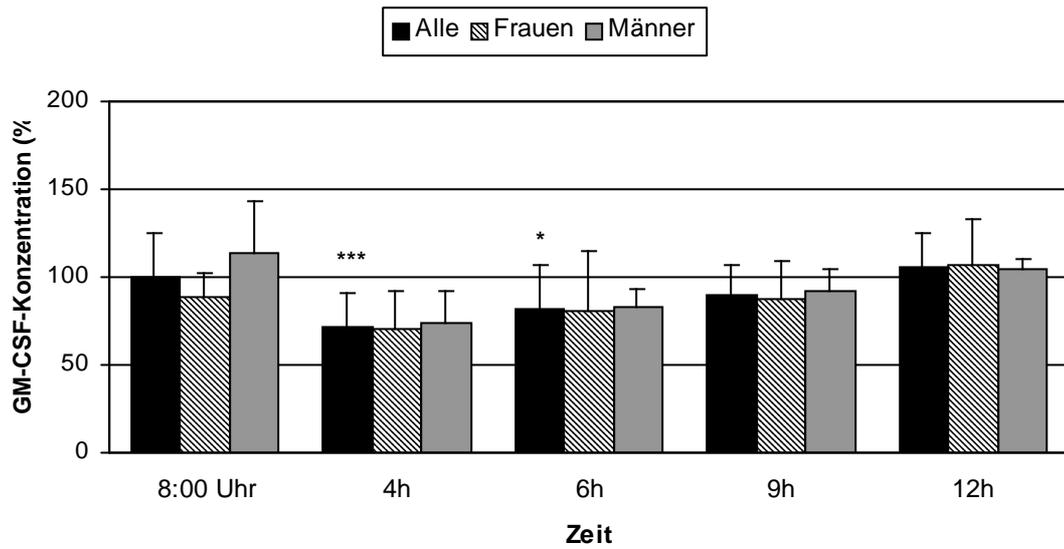


Abb. 11: Anti-CD3-stimulierte GM-CSF-Produktion vor (8:00 Uhr) und nach Einnahme (4h, 6h, 9h und 12h) von 200 µg Misoprostol. Die Werte vor Einnahme (8:00 Uhr) jedes Probanden wurden als Ausgangswert (100%) zugrunde gelegt.

* $p < 0,05$ vs. Ausgangswert.

*** $p < 0,005$ vs. Ausgangswert.

3.2.3. DOSISABHÄNGIGKEIT DER LYMPHOZYTENPROLIFERATION

An gesunden Probanden (n=20) untersuchten wir, ob der in vivo-Effekt von oral eingenommenem Misoprostol auf die Lymphozytenproliferation dosisabhängig ist.

Misoprostol	08:00 h (OD)	(%)	12:00 h (OD)	(%)	17:00 h (OD)	(%)
Kontrolle 0 µg	0,276 ± 0,086	100	0,291 ± 0,077	105,3	0,370 ± 0,086	134,1
50 µg	0,331 ± 0,037	100	0,260 ± 0,010	78,7*	0,323 ± 0,064	97,7**
100 µg	0,326 ± 0,076	100	0,261 ± 0,129	80,1*	0,318 ± 0,092	97,7*
200 µg	0,290 ± 0,092	100	0,206 ± 0,092	71,0**	0,328 ± 0,072	113,3*
400 µg	0,325 ± 0,047	100	0,174 ± 0,068	53,6***	0,303 ± 0,045	93,2**

Tab. 1: Anti-CD3-stimulierte Lymphozytenproliferation in vivo vor (8:00 Uhr) und nach Einnahme (12:00 und 17:00 Uhr) steigender Misoprostoldosierungen im Vergleich zur Kontrolle (keine Einnahme). Um die inter- und intraindividuelle Variabilität der Lymphozytenproliferation zu berücksichtigen, wurde der Ausgangswert (vor Einnahme) jedes Probanden an jedem Untersuchungstag als 100% festgelegt. Die Werte nach Einnahme (%) wurden auf den Ausgangswert des gleichen Tages bezogen und statistisch mit den entsprechenden Werten (gleicher Proband, gleiche Tageszeit) des Kontrolltages verglichen.

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

** $p < 0,01$ vs. Kontrolle.

*** $p < 0,005$ vs. Kontrolle.

Die Lymphozytenproliferation fiel nach Einnahme von Misoprostol ab. Steigende orale Dosierungen (50 µg, 100 µg, 200 µg, 400 µg) hemmten die Lymphozytenproliferation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dosisabhängig. Verglichen mit der Kontrolle trat der maximale Effekt 4 Stunden nach Einnahme der maximalen untersuchten Misoprostoldosis ein (400 µg: 53,6% ± 17,4% vs. 105,3% ± 20,3%, $p < 0,005$), (Tab. 1). Geschlechterspezifische Unterschiede waren nicht nachweisbar.

3.2.4. DOSISABHÄNGIGKEIT DER ZYTOKINPRODUKTION

Zeitgleich wurde am selben Kollektiv (20 gesunde Probanden) untersucht, ob die in vivo beobachteten Effekte von oral eingenommenem Misoprostol auf die Zytokinproduktion ebenfalls dosisabhängig sind.

3.2.4.1. DOSISABHÄNGIGKEIT DER IL-2-PRODUKTION

Nach Einnahme von Misoprostol beobachteten wir im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine zeit- und dosisabhängige Reduktion der IL-2-Produktion. Die Abnahme der IL-2-Produktion variierte 4 Stunden nach Einnahme von 200 µg Misoprostol individuell erheblich zwischen 0% und 90%. Die maximale Reduktion der IL-2-Produktion wurde 9 Stunden nach Einnahme von 400 µg Misoprostol gemessen (69,2% ± 24,1% vs. 180,4% ± 74,5%, $p < 0,01$), (Tab. 2). Geschlechterspezifische Unterschiede zeigten sich nicht.

Misoprostol	08:00 h pg/ml	(%)	12:00 h pg/ml	(%)	17:00 h pg/ml	(%)
Kontrolle 0 µg	206 ± 78	100	350 ± 322	169,9	372 ± 333	180,4
50 µg	234 ± 51	100	263 ± 109	112,5*	277 ± 68	118,2*
100 µg	325 ± 74	100	297 ± 200	91,5*	286 ± 223	88,1**
200 µg	286 ± 99	100	256 ± 453	89,6*	228 ± 287	79,8**
400 µg	269 ± 161	100	240 ± 373	89,4*	186 ± 185	69,2**

Tab. 2: Anti-CD3-stimulierte IL-2-Produktion in vivo vor (8:00 Uhr) und nach Einnahme (12:00 und 17:00 Uhr) steigender Misoprostoldosierungen im Vergleich zur Kontrolle (keine Einnahme). Um die inter- und intraindividuelle Variabilität der IL-2-Produktion zu berücksichtigen, wurde der Ausgangswert jedes Probanden (vor Einnahme) an jedem Untersuchungstag als 100% festgelegt. Die Werte nach Einnahme (%) wurden auf den Ausgangswert des gleichen Tages bezogen und statistisch mit den entsprechenden Werten (gleicher Proband, gleiche Tageszeit) des Kontrolltages verglichen.

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

** $p < 0,01$ vs. Kontrolle.

3.2.4.2. DOSISABHÄNGIGKEIT DER IFN- γ -PRODUKTION

Nach der Einnahme von Misoprostol beobachteten wir ebenfalls eine zeit- und dosisabhängige Abnahme der IFN- γ -Produktion. Die Reduktion der IFN- γ -Produktion 4 Stunden nach Einnahme von 200 μg Misoprostol variierte individuell beträchtlich zwischen 0% und 86%. Bei weiblichen Probanden wurde 4 Stunden nach Einnahme von 200 μg Misoprostol ein stärkerer Abfall der IFN- γ -Produktion beobachtet als bei männlichen Probanden ($56,0\% \pm 19,5\%$ vs. $24,8\% \pm 17,3\%$, $p < 0,05$). Die maximale Reduktion der IFN- γ -Produktion wurde 9 Stunden nach Einnahme von 200 μg Misoprostol gemessen ($69,6\% \pm 27,2\%$ vs. $154,5\% \pm 77,6\%$, $p < 0,05$), (Tab. 3).

Misoprostol	08:00 h ng/ml	(%)	12:00 h ng/ml	(%)	17:00 h ng/ml	(%)
Kontrolle 0 μg	1,10 \pm 0,82	100	1,92 \pm 0,98	174,1	1,70 \pm 0,75	154,5
50 μg	1,91 \pm 1,44	100	2,09 \pm 1,20	103,5*	2,74 \pm 0,98	143,4
100 μg	1,45 \pm 0,93	100	1,34 \pm 0,81	92,2***	2,45 \pm 1,92	168,4
200 μg	1,86 \pm 1,15	100	2,11 \pm 1,03	113,6*	1,29 \pm 0,81	69,6*
400 μg	1,56 \pm 1,17	100	1,41 \pm 0,87	90,7***	1,44 \pm 0,85	92,3*

Tab. 3: Anti-CD3-stimulierte IFN- γ -Produktion in vivo vor (8:00 Uhr) und nach Einnahme (12:00 und 17:00 Uhr) steigender Misoprostoldosierungen im Vergleich zur Kontrolle (keine Einnahme). Um die inter- und intraindividuelle Variabilität der IFN- γ -Produktion zu berücksichtigen, wurde der Ausgangswert jedes Probanden (vor Einnahme) an jedem Untersuchungstag als 100% festgelegt. Die Werte nach Einnahme (%) wurden auf den Ausgangswert des gleichen Tages bezogen und statistisch mit den entsprechenden Werten (gleicher Proband, gleiche Tageszeit) des Kontrolltages verglichen.

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

*** $p < 0,005$ vs. Kontrolle.

3.2.4.3. DOSISABHÄNGIGKEIT DER IL-4-PRODUKTION

Im Vergleich zur Kontrolle wurden nach Einnahme steigender Misoprostoldosierungen keine signifikanten Änderungen der IL-4-Produktion beobachtet. Bei geschlechtsspezifischer Betrachtung der Befunde fiel allerdings eine Steigerung der IL-4-Produktion bei den Männern und ein Abfall der IL-4-Produktion bei den Frauen auf (200µg, 4h: +31,9% ± 19,4% vs. -21,8% ± 11,3%, $p < 0,05$), (Tab. 4).

Misoprostol	08:00 h pg/ml	(%)	12:00 h pg/ml	(%)	17:00 h pg/ml	(%)
Kontrolle 0 µg	59,0 ± 44,2	100	65,4 ± 20,3	110,8	57,4 ± 34,3	97,3
50 µg	61,8 ± 14,3	100	78,7 ± 7,1	127,3	74,2 ± 18,4	120,0
100 µg	69,0 ± 11,2	100	72,5 ± 5,2	105,0	80,7 ± 10,2	116,9
200 µg	69,5 ± 17,6	100	73,9 ± 11,3	106,4	75,3 ± 16,9	108,3
400 µg	70,8 ± 21,9	100	66,1 ± 9,0	93,4	67,7 ± 16,4	95,6

Tab. 4: Anti-CD3-stimulierte IL-4-Produktion in vivo vor (8:00 Uhr) und nach Einnahme (12:00 und 17:00 Uhr) steigender Misoprostoldosierungen im Vergleich zur Kontrolle (keine Einnahme). Um die inter- und intraindividuelle Variabilität der IL-4-Produktion zu berücksichtigen, wurde der Ausgangswert jedes Probanden (vor Einnahme) an jedem Untersuchungstag als 100% festgelegt. Die Werte nach Einnahme (%) wurden auf den Ausgangswert des gleichen Tages bezogen und statistisch mit den entsprechenden Werten (gleicher Proband, gleiche Tageszeit) des Kontrolltages verglichen.

3.2.4.4. DOSISABHÄNGIGKEIT DER IL-10-PRODUKTION

Verglichen mit der unbehandelten Kontrolle führte die Einnahme von 50 µg und 100 µg Misoprostol nach 9 Stunden zu einer signifikanten Steigerung der IL-10-Produktion. Höhere Dosierungen hatten im Gegensatz dazu keinen Einfluss auf die IL-10-Produktion. Geschlechterspezifische Unterschiede waren nicht nachweisbar (Tab. 5).

Misoprostol	08:00 h ng/ml	(%)	12:00 h ng/ml	(%)	17:00 h ng/ml	(%)
Kontrolle 0 µg	1,53 ± 0,99	100	1,46 ± 0,96	95,4	1,74 ± 1,31	114,3
50 µg	1,50 ± 1,01	100	1,92 ± 0,93	128,3	2,47 ± 0,99	165,4*
100 µg	1,64 ± 1,28	100	1,90 ± 1,18	115,5	2,30 ± 1,14	139,9**
200 µg	1,10 ± 0,84	100	0,87 ± 0,95	79,4	1,26 ± 1,47	114,3
400 µg	1,32 ± 0,93	100	1,44 ± 1,22	109,4	1,65 ± 1,23	125,3

Tab. 5: Anti-CD3-stimulierte IL-10-Produktion in vivo vor (8:00 Uhr) und nach Einnahme (12:00 und 17:00 Uhr) steigender Misoprostoldosierungen im Vergleich zur Kontrolle (keine Einnahme). Um die inter- und intraindividuelle Variabilität der IL-10-Produktion zu berücksichtigen, wurde der Ausgangswert jedes Probanden (vor Einnahme) an jedem Untersuchungstag als 100% festgelegt. Die Werte nach Einnahme (%) wurden auf den Ausgangswert des gleichen Tages bezogen und statistisch mit den entsprechenden Werten (gleicher Proband, gleiche Tageszeit) des Kontrolltages verglichen.

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

** $p < 0,01$ vs. Kontrolle.

3.3. ZELLKULTURVERSUCHE

3.3.1. EINFLUSS VERSCHIEDENER IMMUNSUPPRESSIVA AUF DIE LYMPHOZYTEN-PROLIFERATION IN VITRO

In vitro wurde der Einfluss von PGE₁ auf die Proliferation peripherer Lymphozyten untersucht und mit dem Einfluss der Immunsuppressiva CsA, MP und MPA verglichen. Hierfür wurden Lymphozyten unbehandelter Probanden in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von PGE₁, CsA, MP und MPA mit aCD3mab stimuliert.

3.3.1.1. PROSTAGLANDIN E₁

Die anti-CD3-stimulierte Lymphozytenproliferation ließ sich durch Zugabe von PGE₁ inhibieren. Dieser Effekt zeigte sich dosisabhängig und ließ sich bereits bei niedrigen therapeutischen PGE₁-Konzentrationen nachweisen (PGE₁ 3,5 ng/ml: 81,2% ± 12,3% vs. 100,0% ± 4,6%, $p < 0,05$). Konzentrationssteigerungen bis 350 ng/ml führten zu einer deutlichen Steigerung dieses Effektes (Abb. 12).

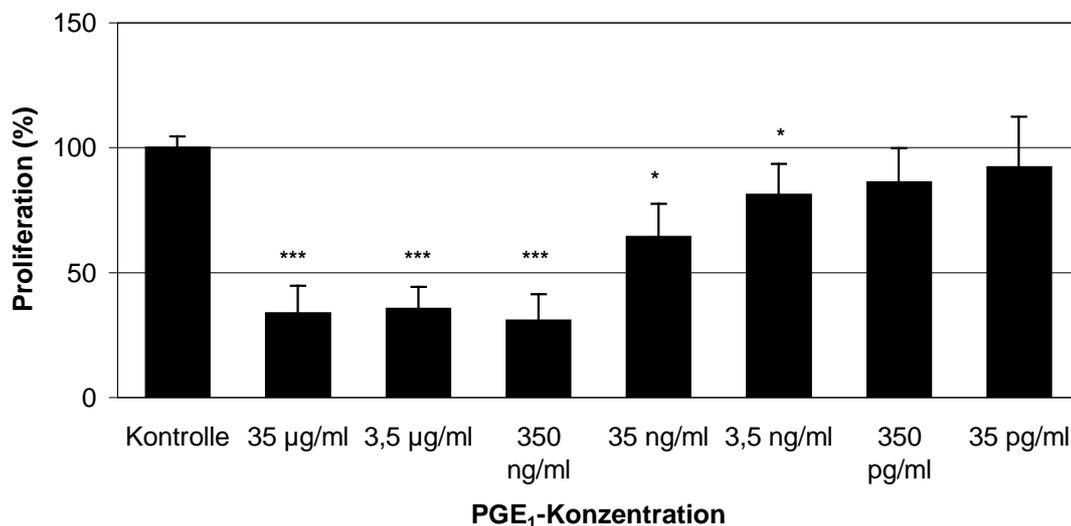


Abb. 12: Anti-CD3-stimulierte Lymphozytenproliferation in Abhängigkeit von der PGE₁-Konzentration in vitro, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

*** $p < 0,005$ vs. Kontrolle.

3.3.1.2. CYCLOSPORIN A

Die Proliferation peripherer Lymphozyten wurde durch CsA in vitro dosisabhängig unterdrückt. Im Bereich therapeutischer CsA-Konzentrationen wurde die Lymphozytenproliferation nahezu komplett gehemmt (CsA 120 ng/ml: 21,1% ± 13,5% vs. 100,0% ± 4,6%, $p < 0,005$). Bereits deutlich unterhalb des therapeutischen Bereiches war eine signifikante Reduktion der Lymphozytenproliferation nachweisbar (CsA 1,2 ng/ml: 71,3% ± 13,2% vs. 100,0% ± 4,6%, $p < 0,05$), (Abb. 13).

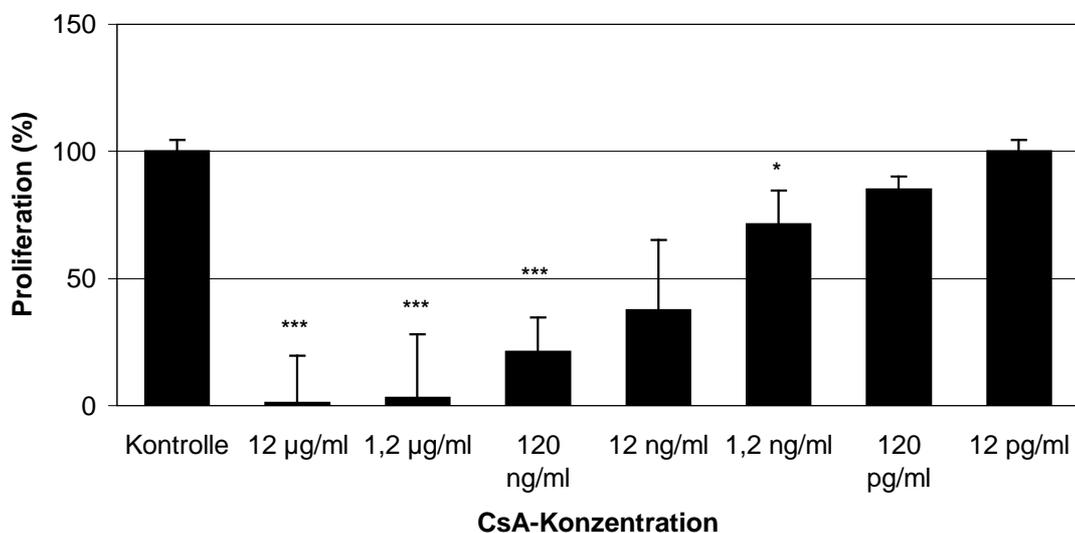


Abb. 13: Anti-CD3-stimulierte Lymphozytenproliferation in Abhängigkeit von der CsA-Konzentration in vitro, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

*** $p < 0,005$ vs. Kontrolle.

3.3.1.3. METHYLPREDNISOLON

Auch MP inhibierte die Proliferation peripherer Lymphozyten in vitro dosisabhängig. Bei Konzentrationen im therapeutischen Bereich ließ sich eine signifikante Reduktion der Lymphozytenproliferation nachweisen (MP 38 ng/ml: 72,8% ± 11,6% vs. 100,0% ± 4,6%, $p < 0,05$; MP 38 µg/ml: 1,5% ± 25,1% vs. 100,0% ± 4,6%, $p < 0,01$). Niedrigere (subtherapeutische) Konzentrationen hatten keinen messbaren Einfluss auf die Proliferation (Abb. 14).

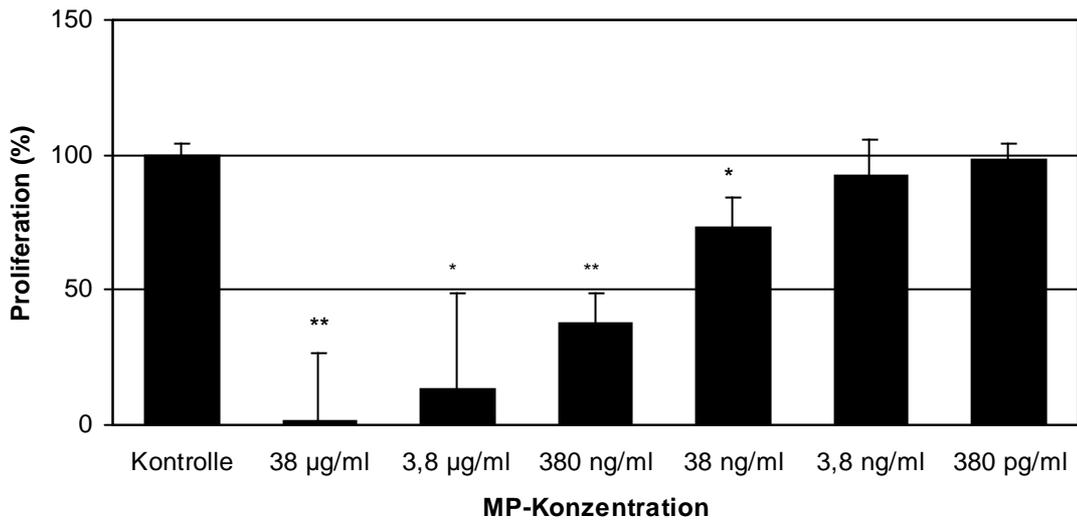


Abb. 14: Anti-CD3-stimulierte Lymphozytenproliferation in Abhängigkeit von der MP-Konzentration in vitro, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle. ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle.

3.3.1.4. MYCOPHENOLAT

MPA hatte in vitro in therapeutischen Konzentrationen einen inhibierenden Effekt auf die Lymphozytenproliferation 3 µg/ml: 37,9% ± 19,4% vs. 100,0% ± 4,6%, $p < 0,01$). Dieser Effekt war bereits für subtherapeutische MPA-Konzentrationen nachweisbar. Eine Konzentrationssteigerung über den therapeutischen Bereich hinaus inhibierte die Proliferation fast vollständig (Abb. 15).

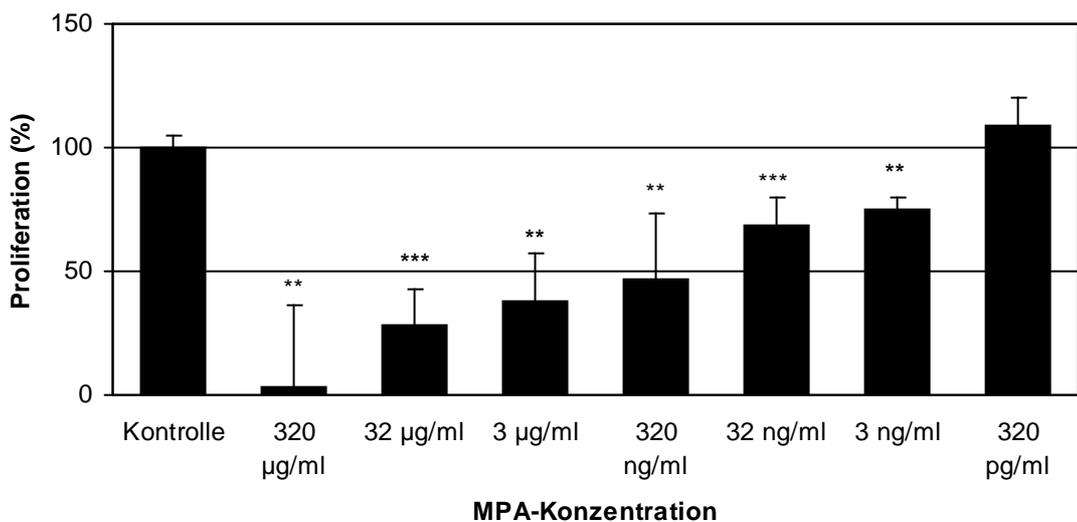


Abb. 15: Anti-CD3-stimulierte Lymphozytenproliferation in Abhängigkeit von der MPA-Konzentration in vitro, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle. *** $p < 0,005$ vs. Kontrolle.

3.3.2. EINFLUSS VERSCHIEDENER IMMUNSUPPRESSIVA AUF DIE ZYTOKIN-PRODUKTION IN VITRO

Die Effekte von PGE₁ auf die Zytokinproduktion peripherer Lymphozyten wurden in vitro untersucht und mit den Immunsuppressiva CsA, MP und MPA verglichen. Lymphozyten unbehandelter Probanden wurden in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von PGE₁, CsA, MP und MPA in vitro mit aCD3mab stimuliert. Stellvertretend für die Th₁- und Th₂-Zytokine wurde die Produktion von IL-2 und IL-10 untersucht.

3.3.2.1. PROSTAGLANDIN E₁

In vitro hemmte PGE₁ die IL-2-Produktion peripherer Lymphozyten. Im Bereich therapeutischer PGE₁-Konzentrationen war die Hemmung der IL-2-Produktion jedoch nicht signifikant. Erst Konzentrationen oberhalb des therapeutischen Bereiches führten zu einer signifikanten Hemmung der IL-2-Produktion (PGE₁ 35 µg/ml: 58,0% ± 13,9% vs. 99,9% ± 14,1%, $p < 0,005$), (Abb. 16).

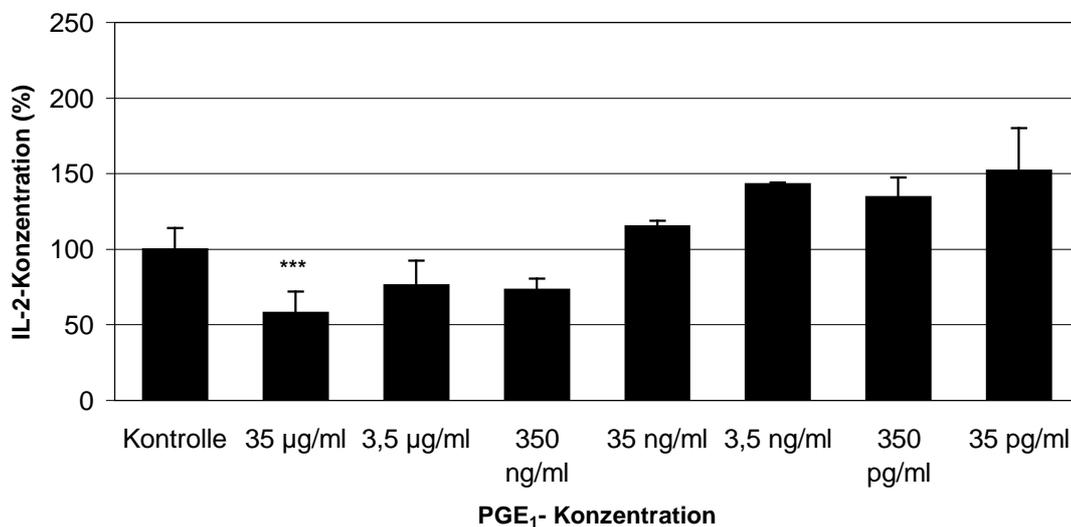


Abb. 16: Anti-CD3-stimulierte IL-2-Produktion peripherer Lymphozyten in Abhängigkeit von der PGE₁-Konzentration in vitro, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

*** $p < 0,005$ vs. Kontrolle.

Anschließend wurde der Effekt von PGE₁ auf die IL-10-Produktion in vitro untersucht.

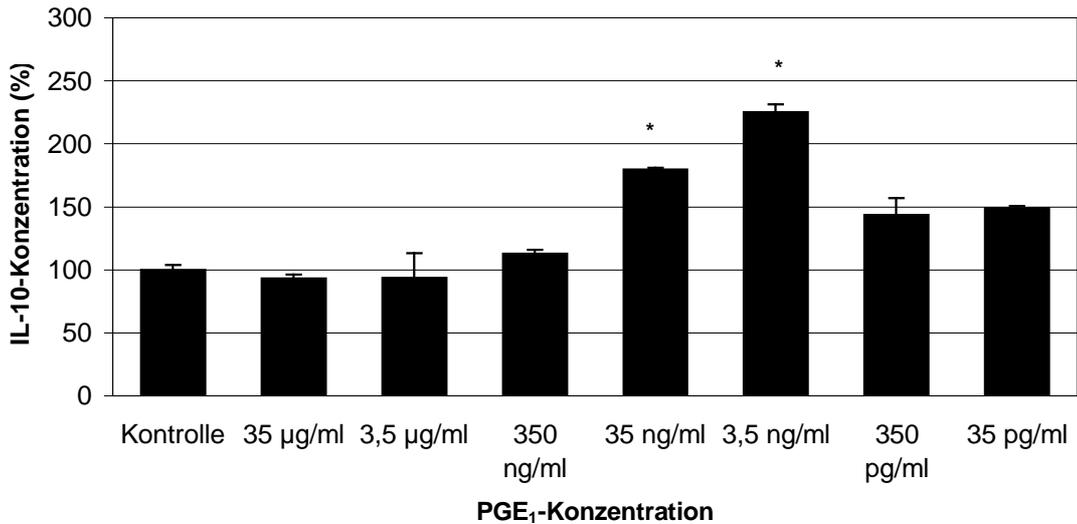


Abb. 17: Anti-CD3-stimulierte IL-10-Produktion peripherer Lymphozyten in Abhängigkeit von der PGE₁-Konzentration in vitro, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Niedrige therapeutische PGE₁-Konzentrationen führten in vitro zu einer signifikanten Steigerung der IL-10-Produktion (PGE₁ 3,5 ng/ml: 225,1% ± 6,1% vs. 100,0% ± 3,7%, $p < 0,05$; PGE₁ 35 ng/ml: 179,8% ± 1,3% vs. 100,0% ± 3,7%, $p < 0,05$). Sowohl geringere als auch höhere PGE₁-Konzentrationen hatten im Gegensatz dazu keinen signifikanten Einfluss auf die IL-10-Produktion in vitro (Abb. 17).

3.3.2.2. CYCLOSPORIN A

Vergleichend wurde der Einfluss der CsA-Konzentration auf die IL-2-Produktion peripherer Lymphozyten in vitro untersucht.

CsA inhibierte die IL-2-Produktion dosisabhängig. Im Bereich niedriger therapeutischer Konzentrationen (CsA-Talspiegel) war im Vergleich zur Kontrolle eine um 39,9% geringere IL-2-Produktion nachweisbar (CsA 120 ng/ml: 60,1% ± 20,6% vs. 100,0% ± 11,0%). Im Bereich der CsA-Spitzenpiegel wurde die maximale Hemmung der IL-2-Produktion beobachtet (CsA 1,2 µg/ml: 31,6% ± 2,4% vs. 100,0% ± 11,0%, $p < 0,05$). Weitere Konzentrationssteigerungen hatten keinen darüber hinaus gehenden Effekt (Abb. 18).

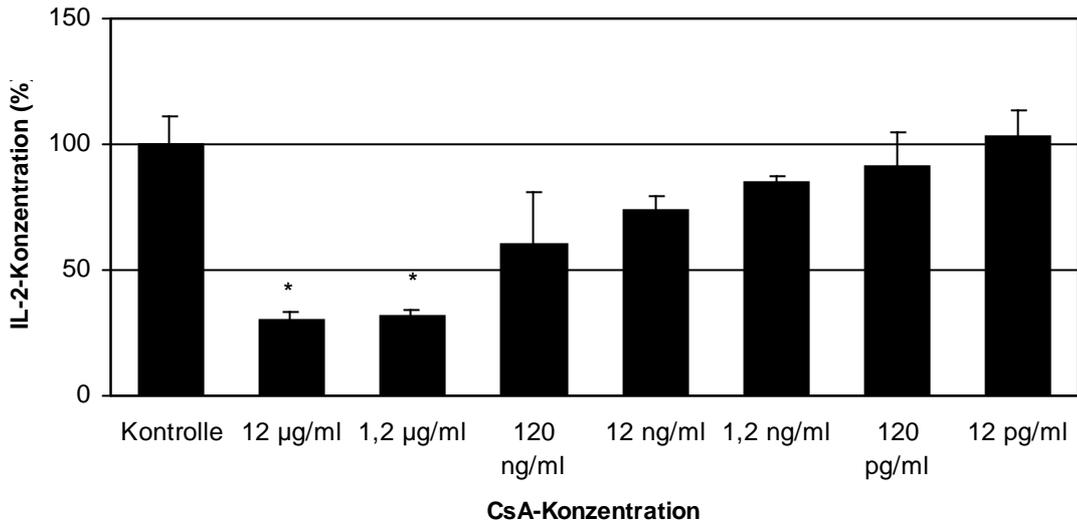


Abb. 18: Anti-CD3-stimulierte IL-2-Produktion peripherer Lymphozyten in Abhängigkeit von der CsA-Konzentration in vitro, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Zusätzlich wurde der Einfluss der CsA-Konzentration auf die IL-10-Produktion in vitro untersucht.

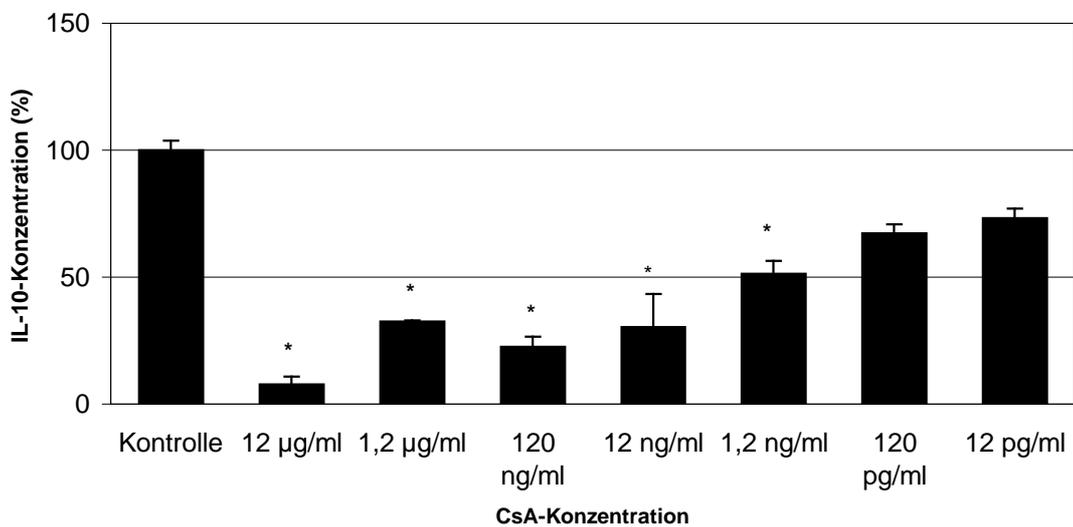


Abb. 19: Anti-CD3-stimulierte IL-10-Produktion peripherer Lymphozyten in Abhängigkeit von der CsA-Konzentration in vitro, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

CsA hatte in vitro einen dosisabhängig inhibierenden Effekt auf die IL-10-Produktion peripherer Lymphozyten. Eine signifikante Hemmung der IL-10-Produktion war bereits für subtherapeutische Konzentrationen nachweisbar (CsA 1,2 ng/ml: $51,3\% \pm 5,1\%$ vs. $100,0\% \pm 3,7\%$, $p < 0,05$). Im Bereich niedriger therapeutischer Konzentrationen (Talspiegel) war eine um 77,3% geringere IL-10-Produktion messbar (CsA 120 ng/ml: $22,7\% \pm 4,0\%$ vs. $100,0\% \pm 3,7\%$, $p < 0,05$). Hohe therapeutische Konzentrationen (Spitzenspiegel) hatten keinen darüber hinaus gehenden Effekt auf die IL-10-Produktion in vitro (Abb. 19).

3.3.2.3. METHYLPREDNISOLON

Durch Zugabe von MP wurde die IL-2-Produktion peripherer Lymphozyten in vitro dosisabhängig gehemmt. Bereits bei subtherapeutischen MP-Konzentrationen trat eine signifikante Reduktion der IL-2-Produktion ein. In therapeutischen Konzentrationen wurde die IL-2-Produktion fast vollständig supprimiert (MP 3,8 $\mu\text{g/ml}$: $6,0\% \pm 1,7\%$ vs. $100,0\% \pm 11,0\%$, $p < 0,05$), (Abb. 20).

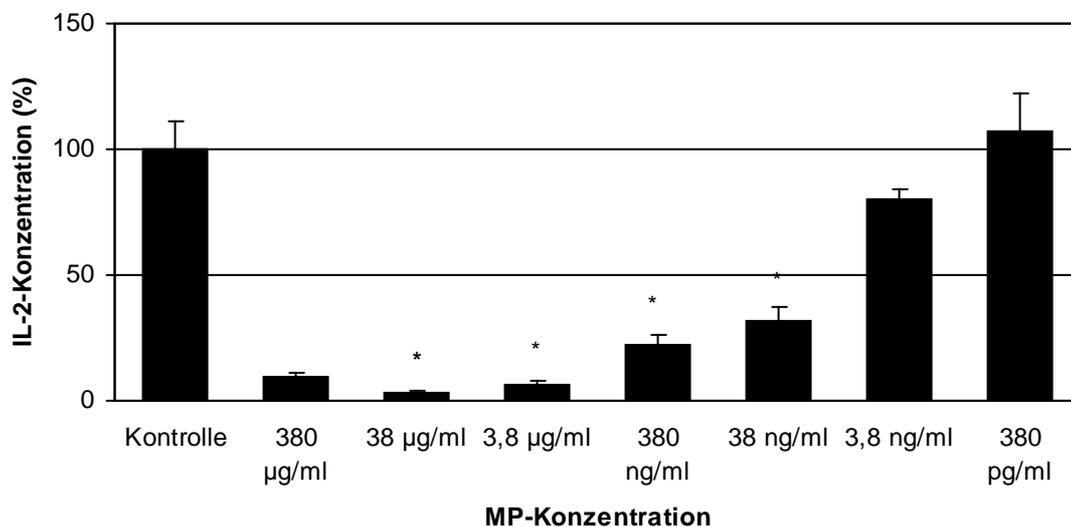


Abb. 20: Anti-CD3-stimulierte IL-2-Produktion peripherer Lymphozyten in Abhängigkeit von der MP-Konzentration in vitro, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Vergleichend wurde der Einfluss der MP-Konzentration auf die IL-10-Konzentration untersucht.

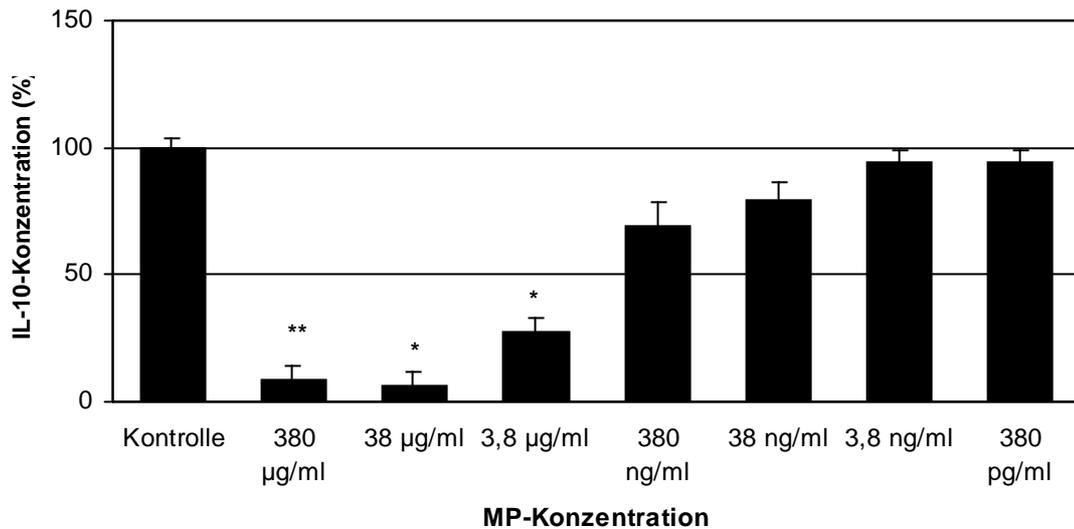


Abb. 21: Anti-CD3-stimulierte IL-10-Produktion peripherer Lymphozyten in Abhängigkeit von der MP-Konzentration in vitro, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

** $p < 0,01$ vs. Kontrolle.

Im therapeutischen Bereich inhibierte MP die IL-10-Produktion peripherer Lymphozyten (MP 3,8 µg/ml: 27,4% ± 5,2% vs. 100,0% ± 3,7%, $p < 0,05$). Steigerungen der MP-Konzentration führten zu einer darüber hinaus gehenden Hemmung der IL-10-Produktion. Subtherapeutische Konzentrationen hatten keinen nachweisbaren Effekt (Abb. 21).

3.3.2.4. MYCOPHENOLAT

In therapeutischen Konzentrationen hatte MPA in vitro keinen signifikanten Effekt auf die IL-2-Produktion peripherer Lymphozyten. Lediglich supratherapeutische MPA-Konzentrationen führten zu einer signifikanten Inhibierung der IL-2-Produktion (MPA 320 µg/ml: 45,2% ± 15,6% vs. 100,0% ± 11,0%, $p < 0,05$), (Abb. 22).

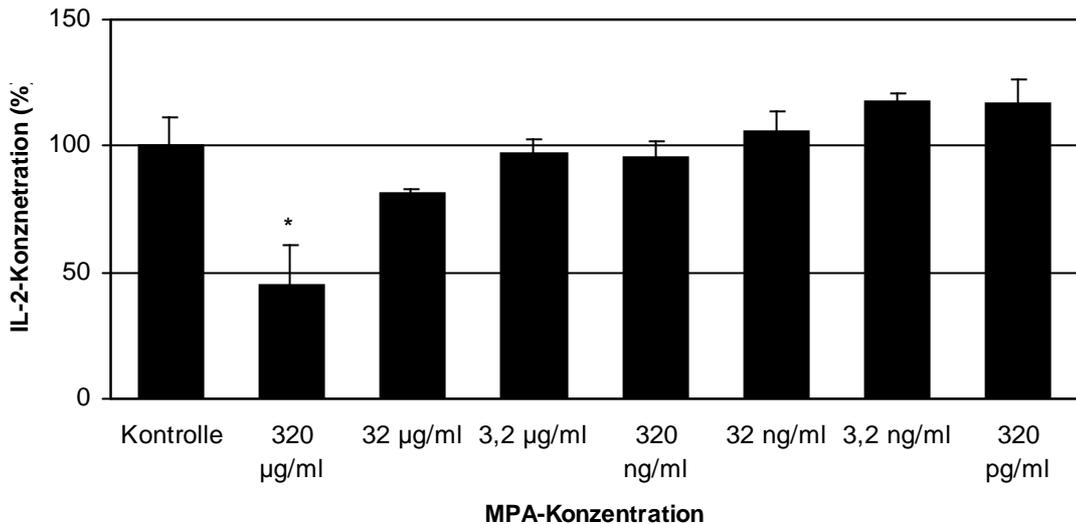


Abb. 22: Anti-CD3-stimulierte IL-2-Produktion peripherer Lymphozyten in Abhängigkeit von der MPA-Konzentration in vitro, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Die Zugabe von MPA führte zu einer Hemmung der IL-10-Produktion peripherer Lymphozyten in vitro. Subtherapeutische MPA-Konzentrationen führten zu einer signifikanten Hemmung der IL-10 Produktion (MPA 320 ng/ml: $40,3\% \pm 3,9\%$ vs. $100,0\% \pm 11,0\%$, $p < 0,005$). Im therapeutischen Bereich fiel die Hemmung der IL-10-Produktion vergleichbar stark aus (Abb. 23).

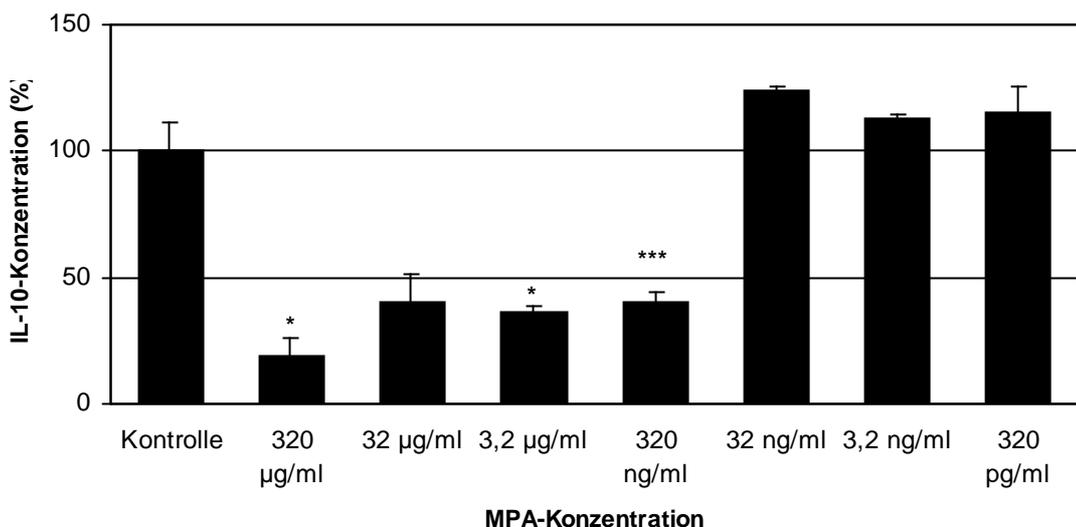


Abb. 23: Anti-CD3-stimulierte IL-10-Produktion peripherer Lymphozyten in Abhängigkeit von der MPA-Konzentration in vitro, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle; *** $p < 0,005$ vs. Kontrolle.

4. DISKUSSION

Die Nierentransplantation ist heute als Therapieverfahren der Wahl für Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz etabliert. Für den Patienten bedeutet die gelungene Transplantation sowohl eine Verbesserung der Lebensqualität (Waiser *et al.*, 1998) als auch eine höhere Lebenserwartung (Wolfe *et al.*, 1999). Die gewonnenen Vorteile müssen allerdings den Risiken der lebenslangen Einnahme immunsuppressiv wirkender Medikamente kritisch gegenübergestellt werden. Aufgrund der Suppression des Immunsystems besteht für transplantierte Patienten ein vergleichsweise erhöhtes Risiko an Infektionen oder Malignomen zu erkranken (Opelz *et al.*, 2006). Das durch die Grundlagenforschung zunehmend bessere Verständnis vom menschlichen Immunsystem, die experimentelle und klinische Forschung zu neuen und angewandten Immunsuppressiva sowie Langzeitbeobachtungen transplantierte Patienten haben bezüglich Nutzen-, Risiko- und Prognoseabschätzung in den letzten Jahren zu einem großen Erkenntnisgewinn geführt. Dadurch werden heute sehr gute Transplantatüberlebensraten in den ersten Monaten und Jahren nach Transplantation erzielt. Das Ziel aller Bemühungen um eine Therapieoptimierung ist vor allem der dauerhafte Erhalt der Organfunktionen bei gleichzeitiger Reduktion medikamenten-assoziiertes Nebenwirkungen. Dieses Ziel kann nur erreicht werden, indem die Spezifität der immunsuppressiven Therapie erhöht wird, bis hin zum Erreichen einer spezifischen Toleranz gegenüber dem Transplantat. Die Anzahl der zur Verfügung stehenden Immunsuppressiva hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Die verschiedenen Wirkstoffklassen unterscheiden sich in ihren Angriffspunkten am Immunsystem und können daher in unterschiedlichen Kombinationen eingesetzt werden (Neumayer *et al.*, 2008). Grundsätzlich wirken die meisten verfügbaren Immunsuppressiva vorrangig an den T-Lymphozyten, der "Steuerzentrale" des spezifischen Immunsystems.

In einer prospektiv randomisierten Doppelblind-Studie untersuchten Moran *et al.* (1990) den Effekt des oral verfügbaren PGE₁-Analogons Misoprostol auf die Transplantatfunktionen in der Frühphase nach Nierentransplantation. Die Patienten erhielten eine Standard-Immunsuppression bestehend aus Cyclosporin A und Prednisolon. In den ersten 12 Wochen nach Nierentransplantation erhielten die Patienten zusätzlich Misoprostol (4 x 200 µg/d per os) oder Placebo. Es zeigte sich, dass die Patienten der

Verum-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant bessere Nierenfunktion, gemessen an Serum-Kreatinin und Kreatinin-Clearance, sowie eine signifikant niedrigere Inzidenz akuter Rejektionen während des Beobachtungszeitraumes von 16 Wochen aufwiesen. Langzeitbeobachtungen oder Untersuchungen zugrunde liegender Mechanismen wurden in o.g. Untersuchung nicht durchgeführt. Ausgehend von diesen Beobachtungen stellte sich die Frage, ob der immunsuppressiven Wirkung von Misoprostol in vivo Änderungen der Lymphozytenproliferation und / oder der Zytokinproduktion zugrunde liegen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Misoprostol / PGE₁ auf die Funktion von T-Lymphozyten untersucht. Im Einzelnen wurde untersucht, ob es nach oraler Verabreichung von Misoprostol in vivo zu Veränderungen der Lymphozytenproliferation und / oder der Zytokinexpression – im Sinne einer überwiegender Expression von Th₂-Zytokinen – kommt. Darüber hinaus wurden die Effekte von PGE₁ auf zellulärer Ebene mit den Effekten etablierter Immunsuppressiva in vitro verglichen.

Zunächst wurde die physiologische Lymphozytenproliferation an gesunden Probanden untersucht. Die Stimulation der Lymphozyten erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen den CD3-Komplex (Lindl und Bauer, 1989). Untersuchungen von Levi *et al.* (1988) belegten für die Anzahl der T-Lymphozyten und der T-Helferzellen eine zirkadiane Variabilität. Behnken *et al.* (1985) konnten für einzelne Lymphozytenpopulationen (NK-Zellen, CD8⁺-Lymphozyten) ebenfalls einen zirkadianen Rhythmus nachweisen. Diese Phänomene korrelieren möglicherweise mit dem physiologischen, zirkadianen Rhythmus der endogenen Kortisolproduktion. Andererseits legen die auf Lymphozyten nachweisbaren adrenergen und cholinergen Rezeptoren auch eine Regulation durch das autonome Nervensystem nahe (Suzuki *et al.*, 1997). Als Konsequenz aus diesen Befunden führten wir die Blutentnahmen für die Ausgangswerte immer zur gleichen Tageszeit, morgens um 8:00 Uhr durch. Ebenso erfolgten alle weiteren Blutentnahmen zu definierten Zeitpunkten. Um exogene Einflüsse zu minimieren, wurden auch die Blutentnahme selbst und die Probenverarbeitung standardisiert. Wir verwendeten heparinisiertes Vollblut, da sich EDTA- oder Citratzusätze negativ auf das Wachstum von Lymphozyten auswirken können (Lindl und Bauer, 1989). Die Proben wurden ungekühlt unverzüglich aufgearbeitet und ausschließlich mit calcium- und magnesiumfreien Puffer gewaschen, um eine Hämolyse

zu vermeiden. In unseren Untersuchungen war die Lymphozytenproliferation gesunder Probanden unabhängig von der Tageszeit und annähernd normal verteilt. Auffällig war allerdings eine beträchtliche inter-individuelle Variabilität. Geschlechterspezifische Unterschiede waren nicht nachweisbar.

Um die Effekte der Einnahme von Misoprostol auf die Lymphozytenproliferation zu untersuchen, wurden zunächst engmaschige kinetische Untersuchungen an einer kleinen Gruppe gesunder Probanden (n=5) durchgeführt. Wir konnten nach Einnahme von 200 µg Misoprostol einen zeitabhängigen Abfall der anti-CD3-stimulierten Lymphozytenproliferation beobachten. Der maximale Effekt (Reduktion um 33% gegenüber dem Ausgangswert) zeigte sich nach vier Stunden. Nach neun Stunden hatte sich die Lymphozytenproliferation wieder normalisiert. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden die Kinetikuntersuchungen an einem größeren Kollektiv (n=13) wiederholt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen bestätigten den reversiblen Abfall der Lymphozytenproliferation (um 41% gegenüber dem Ausgangswert) vier Stunden nach Einnahme von 200 µg Misoprostol. Zwischen männlichen und weiblichen Probanden bestand kein Unterschied.

Parallel zur Lymphozytenproliferation untersuchten wir die Kinetik der Zytokinexpression nach Einnahme von Misoprostol. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, sezernieren Lymphozyten nach Antigen-Kontakt u.a. die Th₁-Zytokine IL-2 und IFN-γ. Diese proinflammatorischen Zytokine stimulieren die zelluläre Immunantwort. Vier Stunden nach Einnahme von 200 µg Misoprostol, also parallel zum Abfall der Lymphozytenproliferation, kam es zu einer reversiblen Reduktion der anti-CD3-stimulierten IFN-γ-Produktion um 31% gegenüber dem Ausgangswert. Neun Stunden nach Einnahme zeigte sich ein leichter Rückgang der IL-2-Produktion um 15% gegenüber dem Ausgangswert, dieser Abfall war jedoch statistisch nicht signifikant. Gold *et al.*, (1994) hatten bei ihren *in vitro*-Untersuchungen zu den Effekten von Prostaglandinen auf T-Zellfunktionen für Misoprostol und PGE₂ ebenfalls eine Inhibition der IL-2- und IFN-γ-Sekretion zeigen können.

Zur Klärung des Einflusses von Misoprostol auf die Th₂-Immunantwort untersuchten wir die Expression der Zytokine IL-4, IL-6 und IL-10. In den bereits erwähnten Untersuchungen von Gold *et al.*, (1994) hatte sich ebenfalls gezeigt, dass Prostaglandine eine Th₂-Antwort in Form einer verstärkten Produktion von IL-4 und IL-5 hervorrufen, während die Th₁-Antwort nahezu vollständig supprimiert wird (s.o.). IL-6 ist

ein pleiotropes Zytokin, das bei Abstoßungsreaktionen im Nierengewebe vermehrt exprimiert wird. In Serum und Urin sind vor allem bei akuten Rejektionen erhöhte IL-6-Konzentrationen messbar (Waiser *et al.*, 1997). Über mögliche Interaktionen von IL-6 und Prostaglandinen ist bisher nur wenig bekannt. Brass und Vetter (1995) konnten wechselseitige Einflüsse von Prostaglandinen und IL-6 bei Kupffer-Sternzellen und Hepatozyten belegen. Cheon *et al.* (2006) zeigten an humanen Monozyten *in vitro*, dass Misoprostol über einen cAMP-Anstieg die *de novo*-Synthese von IL-10 stimuliert. Wir konnten 12 Stunden nach Einnahme von Misoprostol unabhängig vom Geschlecht einen deutlichen Anstieg der IL-4-Produktion (um 164%) und der IL-10-Produktion (um 126%) nachweisen. Im Gegensatz dazu blieb die IL-6-Produktion unbeeinflusst.

Zusätzlich zu den klassischen Th₁-/Th₂-Zytokinen untersuchten wir die Expression von TNF- α und GM-CSF. Wir konnten zeigen, dass es 12 Stunden nach der Einnahme von Misoprostol zu einer signifikanten Reduktion der TNF- α -Produktion (um 37%) kam. Ein inhibierender Effekt von PGE₁ auf die TNF- α -Produktion wurde *in vitro* bereits an humanen Mesangiumzellen (Kishida *et al.*, 2005) und an LPS-stimulierten Monozyten (Widomski *et al.*, 1997) beschrieben. Zur Reversibilität des Effektes konnten wir keine Aussage treffen, da unser Beobachtungszeitraum auf 12 Stunden festgelegt war und zu diesem Zeitpunkt erst die maximale Reduktion der TNF- α -Produktion eintrat. Auffallend war, dass die Einnahme von Misoprostol bei weiblichen Probanden zu einer signifikanten Reduktion der TNF- α -Produktion führte, während die TNF- α -Produktion männlicher Probanden unbeeinflusst blieb. Geschlechterspezifische Unterschiede der (LPS-induzierten) TNF- α -Produktion peripherer Lymphozyten wurden auch von Imahara *et al.* (2005) beschrieben. Bisher konnte aber kein Zusammenhang zwischen dem klinischen Verlauf komplexer Erkrankungen (z.B. Atherosklerose, Rheumatoide Arthritis oder Sepsis), biologischen (z.B. Geschlecht) oder laborchemischen Parametern, genetischen Polymorphismen (z.B. TNF- α -Genvarianten) und den stark variierenden, zirkulierenden TNF- α -Spiegeln hergestellt werden (Schulz *et al.*, 2004).

GM-CSF ist primär für die Hämatopoese von essentieller Bedeutung. Sein Einfluss auf die Funktionen reifer Granulozyten und Makrophagen macht es aber auch zu einem bedeutenden regulatorischen Zytokin der peripheren Immunantwort. GM-CSF wirkt chemotaktisch auf Granulozyten und stimuliert die Phagozytoseaktivität. Die spezifische Rolle von GM-CSF bei Abstoßungsreaktionen wurde bislang nicht ausreichend untersucht. Es erscheint möglich, dass GM-CSF bei der Aktivierung und Rekrutierung eosinophiler Granulozyten, die vor allem in der Frühphase einer akuten Abstoßungs-

reaktion in Transplantaten auftreten, von Bedeutung ist (Budde *et al.*, 1994). Untersuchungen von Alam *et al.* (1995) zum Einfluss von Misoprostol auf den Verlauf allergischer Reaktionen haben *in vivo* eine signifikante Verringerung allergischer Spätreaktionen gezeigt. Parallel durchgeführte *in vitro*-Tests wiesen eine Hemmung der eosinophilen Chemotaxis und der GM-CSF-Produktion peripherer Lymphozyten nach. Wir beobachteten vier Stunden nach Einnahme von Misoprostol, unabhängig vom Geschlecht, einen reversiblen Abfall der GM-CSF-Produktion um 28%. Nach 12 Stunden hatte sich die GM-CSF-Produktion wieder normalisiert.

Nach Abschluss der Untersuchungen zur Kinetik legten wir die repräsentativen Messzeitpunkte für die nachfolgenden Untersuchungen fest: 8:00 Uhr morgens als Ausgangswert, 12:00 Uhr, entsprechend vier Stunden nach Einnahme und 17:00 Uhr, entsprechend neun Stunden nach Einnahme der Medikation.

Im nächsten Schritt untersuchten wir die Dosisabhängigkeit der Effekte von Misoprostol auf die Lymphozytenfunktion. Um die Auswirkungen der inter- und intraindividuellen Variabilität auf die Testergebnisse zu minimieren, wurden die Ausgangswerte jedes Probanden an jedem Untersuchungstag als 100% definiert. Die Veränderungen im Verlauf des jeweiligen Untersuchungstages wurden dann ins Verhältnis zum Ausgangswert (vom gleichen Untersuchungstag) gesetzt und in Prozent angegeben. Die so erhaltenen Werte vor und nach Einnahme verschiedener Misoprostol-Dosierungen an verschiedenen Untersuchungstagen wurden schließlich mit den gleichermaßen berechneten Werten des Kontrolltages (keine Einnahme) statistisch verglichen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen bestätigten die Ergebnisse unserer Voruntersuchungen. Vier Stunden nach Einnahme von Misoprostol kam es zu einem reversiblen Abfall der anti-CD3-stimulierten Lymphozytenproliferation. Der Effekt war dosisabhängig. Bereits bei Einnahme der geringsten Dosis Misoprostol (50 µg) war im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine signifikante Reduktion der Lymphozytenproliferation erkennbar. Der maximale Effekt trat vier Stunden nach Einnahme der maximalen Misoprostol-Dosis von 400 µg ein (Reduktion um 52% gegenüber dem Ausgangswert). Unabhängig von der Dosis erholte sich die Lymphozytenproliferation nach neun Stunden wieder.

Parallel zur Lymphozytenproliferation wurde der Einfluss verschiedener Misoprostol-Dosierungen auf die Zytokinexpression untersucht. Verglichen mit der unbehandelten Kontrolle beobachteten wir nach Einnahme von Misoprostol eine dosisabhängige Reduktion der anti-CD3-stimulierten Produktion von IL-2 und IFN- γ . Bemerkenswert war die erhebliche inter-individuelle Variabilität. Der Abfall der IL-2-Produktion variierte zwischen 0% (keine Inhibition) und 90% (fast komplette Inhibition), der Abfall der IFN- γ -Produktion zwischen 0% und 86%. Während bei der IL-2-Produktion kein geschlechtsspezifischer Unterschied nachweisbar war, wurde die IFN- γ -Produktion bei weiblichen Probanden stärker inhibiert als bei männlichen Probanden. Möglicherweise spielt hierbei der von Ambrogini *et al.* (2005) beschriebene hemmende Einfluss der Östrogene auf die IFN- γ -Produktion eine Rolle.

Bezüglich der Th₂-Zytokine beschränkten wir unsere Untersuchungen auf die Zytokine IL-4 und IL-10, da die Einnahme von Misoprostol in den vorangegangenen Untersuchungen keinen Einfluss auf die IL-6-Produktion gezeigt hatte. Verglichen mit der unbehandelten Kontrolle beobachteten wir keine Änderung der IL-4-Produktion nach Einnahme von Misoprostol. Bei geschlechterspezifischer Betrachtung der Ergebnisse fiel jedoch eine Zunahme der IL-4-Produktion bei Männern und ein Abfall der IL-4-Produktion bei Frauen auf (+32% vs. -22%). Bezüglich der IL-10-Produktion fiel auf, dass niedrige Misoprostol-Dosierungen (50 μ g und 100 μ g) sowohl bei Männern als auch bei Frauen eine signifikante Zunahme der IL-10-Produktion bewirkten (+51% und +26%), während höhere Dosierungen keinen Einfluss auf die IL-10-Produktion hatten. Der Unterschied im Vergleich zu den Kinetikuntersuchungen ist durch den gewählten Untersuchungszeitraum erklärbar. Der zuvor beobachtete Effekt einer erhöhten IL-10-Produktion trat erst 12 Stunden nach Einnahme von Misoprostol ein. In dieser Untersuchung wurde jedoch die letzte Messung neun Stunden nach Einnahme durchgeführt.

Zur weiteren Aufklärung der immunsuppressiven Effekte von PGE₁ auf zellulärer Ebene führten wir *in vitro*-Untersuchungen durch. Dabei wurden die Effekte von PGE₁ auf die anti-CD3-stimulierte Proliferation und Zytokin-Expression peripherer Lymphozyten gesunder Probanden (n=3) *ex vivo* mit den Effekten der etablierten Immunsuppressiva Cyclosporin A, Methylprednisolon und Mycophenolat verglichen. Die eingesetzten PGE₁-Konzentrationen (35 pg/ml – 35 μ g/ml, entsprechend 0,1 nM – 100 μ M) wurden

entsprechend der in vivo messbaren, therapeutischen PGE₁-Konzentrationen (5 ng/ml – 800 ng/ml, entsprechend 10 nM – 10 µM) ausgewählt (Cawallo *et al.*, 1995). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen unserer in vivo-Untersuchungen konnten wir zeigen, dass PGE₁ auch in vitro die Proliferation peripherer Lymphozyten inhibiert. Die Inkubation von Lymphozyten in Anwesenheit therapeutischer PGE₁-Konzentrationen führte konzentrationsabhängig zu einer Reduktion der Proliferation um 20% bis 70%. Eine darüber hinausgehende Inhibierung ließ sich auch durch weitere Steigerungen der PGE₁-Konzentration nicht erzielen. Dieses Ergebnis entspricht unseren in vivo erhobenen Daten mit einer ca. 52%igen Reduktion der Lymphozytenproliferation bei einer Dosis von 400 µg Misoprostol.

Zum Vergleich untersuchten wir den Effekt von CsA, dem Prototyp eines T-Zell-spezifischen Immunsuppressivums, auf die Lymphozytenproliferation. Die untersuchten CsA-Konzentrationen (12 pg/ml – 12 µg/ml, entsprechend 0,01 nM – 10 µM) wurden entsprechend des in vivo angestrebten therapeutischen Bereichs (100 – 1400 ng/ml, entsprechend 100 nM – 1 µM) ausgewählt (Oellerich *et al.*, 1995). Die Inkubation der Lymphozyten in Anwesenheit von CsA führte zu einer dosisabhängigen Hemmung der Proliferation um bis zu 99% (bei 1,2 µg/ml).

Glucokortikoide, wie beispielsweise MP, haben eine sehr starke und rasch einsetzende immunsuppressive Wirkung. Aus diesem Grund bilden sie auch heute, trotz ihrer Nebenwirkungen, einen unverzichtbaren Eckpfeiler der Prophylaxe und Therapie akuter Rejektionen. Die in vitro untersuchten MP-Konzentrationen (380 pg/ml – 38 µg/ml, entsprechend 1 nM – 100 µM) wurden entsprechend in vivo gemessener MP-Konzentrationen (50 ng/ml – 20 µg/ml, entsprechend 100 nM – 100 µM) ausgewählt (Rota *et al.*, 1992). Verglichen mit der unbehandelten Kontrolle führte die Inkubation von Lymphozyten in Anwesenheit von MP in therapeutischen Konzentrationen zu einer dosisabhängigen Hemmung der Proliferation um bis zu 98%.

MPA hemmt reversibel das Schlüsselenzym der Purinbiosynthese. Die Hemmung der DNA- und RNA-Synthese ist ursächlich für die Hemmung der Lymphozytenproliferation. Die in vitro untersuchten MPA-Konzentrationen (320 pg/ml – 320 µg/ml, entsprechend 1 nM – 1 mM) wurden entsprechend des in vivo angestrebten therapeutischen Bereichs (1 – 40 µg/ml, entsprechend 10 – 100 µM) ausgewählt (Shaw *et al.*, 2000). Bei Inkubation der Lymphozyten mit MPA konnten wir eine dosisabhängige Suppression der Proliferation beobachten. Bereits subtherapeutische MPA-Konzentrationen ließen

eine Reduktion der Proliferation um ca. 30% erkennen. Im therapeutischen Bereich betrug die Hemmung der Lymphozytenproliferation bis zu 70%.

Unsere in vitro-Untersuchungen zu den anti-proliferativen Effekten von PGE₁ im Vergleich zu etablierten Immunsuppressiva zeigen, dass durch Inkubation mit PGE₁ eine maximale Reduktion der Lymphozytenproliferation um ca. 70% erreicht werden kann. CsA wirkt in einem ähnlichen Konzentrationsbereich wie PGE₁, allerdings ist der anti-proliferative Effekt von CsA stärker ausgeprägt. Auch für MP wurde ein im Vergleich zu PGE₁ stärkerer anti-proliferativer Effekt nachgewiesen. Demgegenüber war der anti-proliferative Effekt von MPA mit PGE₁ vergleichbar. Zusammenfassend konnten wir für PGE₁ in vitro eine effektive Hemmung der Lymphozytenproliferation nachweisen, welche quantitativ mit dem Effekt von etablierten Immunsuppressiva durchaus vergleichbar ist.

Die Effekte von Kombinationen aus PGE₁ mit anderen Immunsuppressiva auf die Lymphozytenproliferation wurde in der vorgelegten Arbeit nicht untersucht. Die Beantwortung der Frage, ob derartige Kombinationen zu einer stärkeren Hemmung der Lymphozytenproliferation führen bzw. ob durch unterschiedliche Wirkmechanismen additive oder synergistische Effekte erzielt werden können, sollte allerdings Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Dies könnte die Möglichkeit eröffnen, eine Dosisreduktion einzelner Substanzen und dadurch eine Reduktion substanzspezifischer Nebenwirkungen zu erreichen.

Stellvertretend für den Einfluss von PGE₁, CsA, MP und MPA auf die Th₁-Immunantwort untersuchten wir die IL-2-Produktion peripherer Lymphozyten in vitro. Die Inkubation mit therapeutischen PGE₁-Konzentrationen führte zu einer leichten, jedoch nicht signifikanten Reduktion der IL-2-Produktion. Eine signifikante Hemmung der IL-2-Produktion von ca. 40% ließ sich erst bei Einsatz von PGE₁-Konzentrationen oberhalb des therapeutischen Bereichs erreichen. Bei den in vivo-Versuchen hatte die Behandlung mit Misoprostol zu einer dosisabhängigen Reduktion der anti-CD3-stimulierten Produktion von IL-2 und IFN-γ geführt. Bereits bei diesen Untersuchungen war jedoch eine erhebliche inter-individuelle Variabilität aufgefallen. Möglicherweise blieb der Effekt bei den in vitro-Versuchen deshalb nicht signifikant, weil die isolierten Lymphozyten von Probanden stammten, die retrospektiv betrachtet, auch in vivo auf die Behandlung mit Misoprostol nicht mit einer signifikanten Reduktion der IL-2-Produktion reagiert hatten. Die Ursache der inter-individuellen Variabilität scheint daher nicht nur im

multifaktoriellen Zusammenspiel des Gesamtorganismus sondern auch auf zellulärer Ebene begründet zu sein. Im Gegensatz dazu kam es bei Inkubation peripherer Lymphozyten mit CsA zu einer signifikanten Reduktion der IL-2-Produktion um bis zu 68% bei einer CsA-Konzentration von 1200 ng/ml, welche den gemessenen CsA-Spitzenpegeln zwei Stunden nach Einnahme (C2-Wert) entspricht. Von allen untersuchten Substanzen hatte MP den stärksten Effekt auf die IL-2-Produktion in vitro. Therapeutische MP-Konzentrationen inhibierten die IL-2-Produktion dosisabhängig um 70% bis 97%. Ebenso wie PGE₁ hatte MPA keinen signifikanten Einfluss auf die IL-2-Produktion peripherer Lymphozyten, lediglich bei Einsatz supratherapeutischer MPA-Konzentrationen kam es zu einer signifikanten Hemmung.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die untersuchten Substanzen bezüglich ihres Effektes auf die Th₁-Antwort erhebliche qualitative und quantitative Unterschiede aufwiesen. Die Hemmung der Th₁-Antwort, in Form einer Inhibierung der IL-2-Produktion, war am stärksten bei Einsatz therapeutischer Konzentrationen von MP, gefolgt von CsA. Demgegenüber hatten therapeutische Konzentrationen von PGE₁ und MPA keinen Einfluss auf die anti-CD3-stimulierte IL-2-Produktion in vitro.

Stellvertretend für die Th₂-Immunantwort wurde der Einfluss von PGE₁, CsA, MP und MPA auf die IL-10-Produktion untersucht. Wir konnten beobachten, dass niedrige PGE₁-Konzentrationen in vitro (3,5 – 35 ng/ml) zu einer signifikanten Steigerung der IL-10-Produktion führten (um 80% bzw. 125%). Geringere (35 – 350 pg/ml) oder höhere Konzentrationen (\geq 350 ng/ml) hatten im Gegensatz dazu keinen messbaren Einfluss auf die IL-10-Produktion. Im Gegensatz zu PGE₁ hemmte CsA dosisabhängig die IL-10-Produktion peripherer Lymphozyten. Subtherapeutische CsA-Konzentrationen (1,2 ng/ml) verursachten bereits eine signifikante Reduktion (um 49%). Im therapeutischen Bereich fiel die IL-10-Produktion um bis zu 77%. Diese Ergebnisse werden durch die Untersuchungen von Moed *et al.* (2004) bestätigt, die ebenfalls fanden, dass CsA sowohl die Th₁- als auch die Th₂-Zytokinproduktion inhibierte. Ebenso führte die Inkubation in Anwesenheit von MP zu einer deutlichen, dosisabhängigen Hemmung der IL-10-Produktion (um 73%). Beide Immunsuppressiva führten somit in vitro zu einer signifikanten Reduktion der Th₁- und der Th₂-Immunantwort. Auch die Inkubation in Anwesenheit von MPA führte zu einer signifikanten Hemmung der IL-10-Produktion in vitro (um 64%). Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit Daten von Jonsson und Carlsten (2001), die nachwiesen, dass

MPA *in vitro* die IL-10-Expression von Lymphozyten dosisabhängig inhibiert. Festzuhalten ist, dass PGE₁ – im Gegensatz zu den anderen untersuchten Immunsuppressiva – *in vitro* die Immunantwort zugunsten einer Th₂-Immunantwort verschob. Dies wurde durch unsere *in vivo*-Untersuchungen bestätigt. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen hatten Miles *et al.* (2003) für PGE_{1/2/3} *in vitro* eine dosisabhängige Reduktion der Th₁-Zytokinsekretion (IL-2 und IFN- γ) verbunden mit einer Steigerung der Th₂-Zytokinsekretion (IL-4) im ConA-stimulierten Vollblut gezeigt. Aus der veränderten Ratio folgerten die Autoren, dass PGE_{1/2/3} die Zytokinproduktion zugunsten einer Th₂-Antwort beeinflussen.

Die inter- und intra-individuelle Variabilität in Bezug auf die Suszeptibilität gegenüber den immunsuppressiven Effekten von Prostaglandinen ist bekannt. Diese scheint u.a. für zum Teil widersprüchliche Studienergebnisse verantwortlich zu sein. Dazu trägt auch der von mehreren Autoren nachgewiesene Einfluss der Sexualhormone auf das Immunsystem bei (Karalis *et al.*, 1995; daSilva, 1999). Darüber hinaus haben Sunder-Plassmann *et al.* (1991) und Waclavicek *et al.* (1998) eine substantielle Heterogenität peripherer Lymphozyten in Bezug auf deren Sensitivität auf die immunsuppressiven Wirkungen von Prostaglandinen beschrieben. Bei Nagetieren wurden auch in Bezug auf die Eicosanoidsynthese geschlechterspezifische Unterschiede nachgewiesen (Du *et al.*, 1984; Leslie *et al.*, 1987). Leslie und Dubey (1994) haben an humanen Monozyten gezeigt, dass die Produktion von PGE₂ östrogen- und zyklusabhängig ist. Die genannten Phänomene erklären die geschlechterspezifischen Unterschiede bis zu einem gewissen Grad. Abgesehen von den hier dargestellten Ergebnissen existieren bis heute jedoch keine relevanten Daten zu geschlechterspezifischen Effekten von Prostaglandinen, insbesondere von PGE₁, auf die von uns untersuchten Parameter.

Dominierende Th₂-Zytokinmuster wurden bei Patienten mit stabiler Transplantatfunktion nachgewiesen (Oliveira *et al.*, 1998). Somit scheint die Akzeptanz von Transplantaten an ein dominierendes Th₂-Zytokinmuster gebunden zu sein (Remuzzi *et al.*, 1995; Sayeh und Turka, 1995; Motoyama *et al.*, 1997; Onodera *et al.*, 1997). Allerdings konnten Untersuchungen von Steiger (1998) und Tarumi *et al.* (1999) am Tiermodell (Ratten) diese Hypothese nicht belegen. Darüber hinaus gibt es Hinweise (Hancock *et al.*, 1995), dass T-Zell-Infiltrate mit dominierender IL-4-Expression – im Sinne einer gesteigerten Th₂-Immunantwort – ursächlich für chronische Gefäßveränderungen, die

sogenannte chronische Transplantat-Vaskulopathie sein könnten. Folglich kann das Th₁/Th₂-Paradigma die Vorgänge von Rejektion und Toleranz nicht vollständig erklären. Einige Autoren (Strom *et al.*, 1996; Kunzendorf, 1998) vertreten daher die Ansicht, dass eine Hierarchie von T-Zell-Wachstumsfaktoren existiert, welche die Fähigkeit zur Toleranzentwicklung blockieren und Rejektionen induzieren kann.

In Zukunft sind weitere Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* erforderlich, um zu klären, ob PGE₁-Analoge in der Weiterentwicklung der immunsuppressiven Therapie nach Organtransplantation tatsächlich hilfreich sind. Unsere Untersuchungsergebnisse haben deutlich gemacht, dass viele der *in vitro* beobachteten Phänomene in das *in vivo*-System übertragbar sind. Die vorliegenden Ergebnisse haben potente biologische Wirkungen von PGE₁ auf entscheidende Lymphozytenfunktionen nachgewiesen und so auch die physiologische Bedeutung von PGE₁ als Modulator der Immunantwort belegt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

T-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation der Immunantwort nach Organtransplantation. Die Balance der Expression von Th₁- und Th₂-Zytokinen scheint für das Überleben eines Spenderorgans wesentlich zu sein. Das vermehrte Auftreten von Th₂-Zytokinen wie IL-4 und IL-10 in langfristig tolerierten Organen legt im Umkehrschluss nahe, dass Th₁-Zytokinen wie IL-2 und IFN- γ bei der Transplantat-Rejektion eine maßgebliche Funktion zukommt. Die Beeinflussung der Immunantwort zugunsten einer Th₂-Immunantwort sollte daher ein prognostisch günstiger Faktor für ein langfristiges Transplantatüberleben sein.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob der klinisch beobachteten immunsuppressiven Wirkung von Misoprostol / PGE₁ Änderungen in der Proliferation und Zytokinproduktion peripherer Lymphozyten zugrunde liegen. In Bezug auf die Zytokinproduktion stand insbesondere die Fragestellung, ob es zu einer qualitativen Veränderung der Zytokinexpression im Sinne einer überwiegenden Expression von Th₂-Zytokinen kommt, im Vordergrund. Die Effekte des oral verfügbaren PGE₁-Analoges Misoprostol auf Lymphozytenproliferation und Zytokinproduktion wurden daher an gesunden Probanden in vivo untersucht. Zusätzlich wurden die Effekte von PGE₁ in vitro an isolierten humanen Lymphozyten untersucht und mit etablierten Immunsuppressiva verglichen.

Die native Lymphozytenproliferation eines Kollektivs gesunder Probanden stellte sich normal verteilt dar. Geschlechterspezifische Unterschiede waren nicht nachweisbar. Relevante zirkadiane Schwankungen wurden nicht beobachtet. Die Behandlung mit oralem Misoprostol führte reversibel, zeit- und dosisabhängig sowie unabhängig vom Geschlecht zu einer signifikanten Reduktion der anti-CD3-stimulierten Lymphozytenproliferation. Darüber hinaus kam es nach Einnahme von Misoprostol zu einer interindividuell unterschiedlich stark ausgeprägten, zeit- und dosisabhängigen, reversiblen Reduktion der Produktion von Th₁-Zytokinen (IL-2 und IFN- γ) sowie einem zeit- und dosisabhängigen Anstieg von Th₂-Zytokinen (IL-4 und IL-10). Bezüglich der IL-4-Produktion ist anzumerken, dass hierbei geschlechtsspezifische Unterschiede auftraten, insofern als Misoprostol die IL-4-Produktion bei männlichen Probanden steigerte und bei weiblichen Probanden inhibierte. Darüber hinaus zeigte sich, dass Misoprostol auch

eine signifikante Reduktion der Produktion von TNF- α und GM-CSF bewirkt. Wie bei IL-4 waren auch bei der TNF- α -Produktion geschlechtsspezifische Unterschiede zu beobachten. Bei den weiblichen Probanden war die TNF- α -Produktion nach Einnahme von Misoprostol deutlich inhibiert, bei den männlichen Probanden blieb sie dagegen unverändert. Insgesamt ist festzuhalten, dass die Variabilität der Zytokinproduktion inter-individuell beträchtlich war.

Korrelierend mit den in vivo-Befunden zeigte sich in vitro, dass PGE₁ konzentrationsabhängig die Lymphozytenproliferation und die Produktion des Th₁-Zytokins IL-2 hemmt. Die inhibierenden Effekte von PGE₁ waren dabei durchaus auch quantitativ mit den Effekten der etablierten Immunsuppressiva Cyclosporin A, Methylprednisolon und Mycophenolat vergleichbar. Im Gegensatz zu diesen, hatte PGE₁ dosisabhängig einen stimulierenden Effekt auf die Produktion des Th₂-Zytokins IL-10.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Misoprostol / PGE₁ in Bezug auf die Lymphozytenproliferation und die Th₁-Zytokinproduktion durchaus über inhibierende Eigenschaften verfügt, welche mit etablierten Immunsuppressiva vergleichbar sind. Darüber hinaus und im Unterschied zu den etablierten Immunsuppressiva scheint es eine Stimulation der Th₂-Zytokinproduktion zu bewirken. Ob sich diese Eigenschaften im Hinblick auf die immunologische Situation nach Organtransplantation auch langfristig als vorteilhaft erweisen, müssen zukünftige Studien zeigen. Ganz allgemein tragen die Ergebnisse dieser Untersuchungen jedoch dazu bei, das immer noch unzureichende Verständnis für das immunsuppressive / immunmodulatorische Potential der Prostaglandine zu erweitern.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Alam R, DeJarnatt A, Stafford S, Forsythe PA und Kumar D. Misoprostol Inhibits the Cutaneous Late-Phase Allergic Response to Antigens. Results of a Double-Blind Placebo-Controlled Randomized Study. Am.J.Ther. 1995; 2: 749-754.

Ambrogini E, Toraldo G und Marcocci C. Post-menopausal osteoporosis: is it an autoimmune disease? J.Endocrinol.Invest 2005; 28: 43-47.

Bailey JM. New mechanisms for effects of anti-inflammatory glucocorticoids. Biofactors 1991; 3: 97-102.

Behnken LJ, Heicke B, Lohr G, Maier-Lenz H und Musil J. Detection of lymphocyte subpopulations in EDTA whole blood samples using flow cytometry. Stability and normal values. Arzneimittelforschung 1985; 35: 1311-1316.

Betz M und Fox BS. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. J.Immunol. 1991; 146: 108-113.

Bishop DK, Li W, Chan SY, Ensley RD, Shelby J und Eichwald EJ. Helper T lymphocyte unresponsiveness to cardiac allografts following transient depletion of CD4-positive cells. Implications for cellular and humoral responses. Transplantation 1994; 58: 576-584.

Blohme I und Larko O. Premalignant and malignant skin lesions in renal transplant patients. Transplantation 1984; 37: 165-167.

Bogdan C, Paik J, Vodovotz Y und Nathan C. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. J.Biol.Chem. 1992; 267: 23301-23308.

Bohman SO, Wilczek HE, Reinholt FP, Willebrand E. und Hayry P. Immunopathological patterns in long-term renal allografts. Transplantation 1991; 51: 610-613.

Bonta L und Ben-Efraim S. Interactions between inflammatory mediators in expression of antitumor cytostatic activity of macrophages. Immunol.Lett. 1990; 25: 295-301.

Brass EP und Vetter WH. Stimulation of Lipogenesis by Interleukin-6 and Misoprostol-Free Acid in Isolated Rat Hepatocytes. Am.J.Ther. 1995; 2: 706-710.

Braun DP, Siziopikou KP, Casey LC und Harris JE. The in vitro development of cytotoxicity in response to granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor or interferon gamma in the peripheral blood monocytes of patients with solid tumors: modulation by arachidonic acid metabolic inhibitors. Cancer Immunol.Immunother. 1990; 32: 55-61.

Budde K, Waiser J und Neumayer HH. The diagnostic value of GM-CSF and IL-6 determinations in patients after renal transplantation. Transpl.Int. 1994; 7: 97-101.

Budde K, Fritsche L, Geissler S, Hallebach G, Diekmann F, Bohler T, Waiser J und Neumayer HH. Steroid withdrawal in long-term cyclosporine A treated patients using mycophenolate mofetil: a prospective randomized pilot study. *Transplant.Proc.* 2001; 33: 3250-3252.

Carlsson LA und Eriksson F. Femoral artery infusion of PGE1 in severe peripheral vascular disease. *Lancet* 1973; 1: 155-156.

Cawello W, Leonhardt A, Schweer H, Seyberth HW, Bonn R und Lomeli AL. Dose proportional pharmacokinetics of alprostadil (prostaglandin E1) in healthy volunteers following intravenous infusion. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 1995; 40: 273-276.

Censini S, Bartalini M, Tagliabue A und Boraschi D. Interleukin 1 stimulates production of LTC4 and other eicosanoids by macrophages. *Lymphokine Res.* 1989; 8: 107-114.

Chavin KD, Qin L, Lin J, Woodward J, Baliga P, Bromberg J. Combination anti-CD2 and anti-CD3 monoclonal antibodies induce tolerance while altering interleukin-2, interleukin-4, tumor necrosis factor and transforming growth factor-beta production. *Ann. Surg.* 1993; 218: 492-501.

Cheon H, Rho YH, Choi SJ, Lee JH, Song GG, Sohn J, Won H und Ji JD. Prostaglandin E2 augments IL-10 signaling and function. *J.Immunol.* 2006; 177: 1092-1100.

Chevalier RL, Carey RM und Kaiser DL. Endogenous prostaglandins modulate autoregulation of renal blood flow in young rats. *Am.J.Physiol.* 1987; 253: 66-75.

Chiou WJ, Bonin PD und Singh JP. Obligatory action of polypeptide growth factors for the IL-1-mediated prostaglandin E2 production in fibroblasts. Potential role of growth factors in modulation of tissue response to IL-1. *J.Immunol.* 1990; 145: 2155-2160.

Cho WH, Kim WT, Sohn CY, Park CH, Park SB und Kim HC. Significance of IL-2, IL-2R, IL-6, and TNF-alpha as a diagnostic test of acute rejection after renal transplantation. *Transplant.Proc.* 1998; 30: 2967-2969.

Cominelli F, Nast CC, Dinarello CA, Gentilini P und Zipser RD. Regulation of eicosanoid production in rabbit colon by interleukin-1. *Gastroenterology* 1989; 97: 1400-1405.

Cornaby A, Simpson M, Vann RR, Dempsey R, Madras P, Jenkins R und Monaco A. Interleukin 2 levels and urine cytology distinguish between cyclosporine toxicity and rejection in renal and liver allograft recipients. *Transplant.Proc.* 1988; 20: 827-830.

Coyne DW und Morrison AR. Effect of the tyrosine kinase inhibitor, genistein, on interleukin-1 stimulated PGE2 production in mesangial cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1990; 173: 718-724.

DaSilva JA. Sex hormones and glucocorticoids: interactions with the immune system. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1999; 876: 102-117.

Dallman MJ, Porter AC, Larsen CP und Morris PJ. Lymphokine production in allografts - analysis of RNA by northern blotting. *Transplant.Proc.* 1989; 21: 296-298.

DerSimonian H, Pan L, Yatko C, Rodrigue-Way A, Johnson E, Edge ES. Human anti-porcine T cell response: blocking with anti-class I antibody leads to hyporesponsiveness and a switch in cytokine production. *J. Immunol.* 1999; 162: 6993-7001.

DSO. *Organspende und Transplantation in Deutschland. Der Jahresbericht 2007. DSO 2008, Neu-Isenburg, Deutschland.*

Du JT, Vennos E, Ramey E und Ramwell PW. Sex differences in arachidonate cyclo-oxygenase products in elicited rat peritoneal macrophages. *Biochim.Biophys.Acta* 1984; 794: 256-260.

Elion GB. The purine path to chemotherapy. *Science* 1989; 244: 41-47.

Endo H, Akahoshi T und Kashiwazaki S. Additive effects of IL-1 and TNF on induction of prostacyclin synthesis in human vascular endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1988; 156: 1007-1014.

Eppel GA, Ventura S und Evans RG. Regional vascular responses to ATP and ATP analogues in the rabbit kidney in vivo: roles for adenosine receptors and prostanoids. *Br.J.Pharmacol.* 2006; 149: 523-531.

Eugui EM, Almquist SJ, Muller CJ und Allison AC. Lymphocyte-selective cytostatic and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in vitro: role of deoxyguanosine nucleotide depletion. *Scand.J.Immunol.* 1991; 33: 161-173.

Farrar MA und Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu.Rev.Immunol.* 1993; 11: 571-611.

Felli MP, Moschella C, Farina AR, Alesse E, Screpanti I, Teti D, Frati L und Gulino A. Prostaglandin E2 inhibits the interleukin-2 promoter activity through down-regulation of the Oct-dependent transcription of the octamer motif. *Cell Immunol.* 1996; 172: 229-234.

Ferris ME, Gipson DS, Kimmel PS und Eggers PW. Trends in treatment and outcomes of survival of adolescents initiating end-stage renal disease care in the United States of America. *Pediatr.Nephrol.* 2006; 21: 1020-1026.

Fertsch D, Schoenberg DR, Germain RN, Tou JY und Vogel SN. Induction of macrophage Ia antigen expression by rIFN-gamma and down-regulation by IFN-alpha/beta and dexamethasone are mediated by changes in steady-state levels of Ia mRNA. *J.Immunol.* 1987; 139: 244-249.

Floege J, Topley N, Wessel K, Kaefer V, Radeke H, Hoppe J, Kishimoto T und Resch K. Monokines and platelet-derived growth factor modulate prostanoid production in growth arrested, human mesangial cells. *Kidney Int.* 1990; 37: 859-869.

Friteau L, Francesconi E, Lando D, Dugas B und Damais C. Opposite effect of Interferon-gamma on PGE2 release from Interleukin-1-stimulated human monocytes or fibroblasts. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1988; 157: 1197-1204.

Ganschow R, Broering DC, Nolkemper D, Albani J, Kemper MJ, Rogiers X und Burdelski M. Th2 cytokine profile in infants predisposes to improved graft acceptance after liver transplantation. *Transplantation* 2001; 72: 929-934.

Girndt M, Kohler H, Schiedhelm-Weick E, Schlaak JF, Meyer zum Buschenfelde KH und Fleischer B. Production of interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 in vitro correlates with the clinical immune defect in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1995; 47: 559-565.

Gold KN, Weyand CM und Goronzy JJ. Modulation of helper T cell function by prostaglandins. *Arthritis Rheum.* 1994; 37: 925-933.

Goodwin JS und Ceuppens J. Regulation of the immune response by prostaglandins. *J.Clin.Immunol.* 1983; 3: 295-315.

Goodwin JS. Are prostaglandins proinflammatory, antiinflammatory, both or neither? *J.Rheumatol.* 1991; 28: 26-29.

Goronzy JJ, Gold KN, Weyand CM. T-cell derived lymphokines as regulators of chronic inflammation: potential targets for immunomodulation? *Am. J. Ther.* 1996; 3: 109-114.

Gupta RK, Jain M und Sharma RK. Serum & urinary interleukin-2 levels as predictors in acute renal allograft rejection. *Indian J.Med.Res.* 2004 ; 119: 24-27.

Hall BM. Cells mediating allograft rejection. *Transplantation* 1991; 51: 1141-1151.

Halloran PF, Kung L und Noujaim J. Calcineurin and the biological effect of cyclosporine and tacrolimus. *Transplant.Proc.* 1998 ; 30: 2167-2170.

Han CW, Imamura M, Hashino S, Zhu X, Tanaka J, Imai K, Matsudaira T und Asano S. Differential effects of the immunosuppressants cyclosporin A, FK506 and KM2210 on cytokine gene expression. *Bone Marrow Transplant.* 1995; 15: 733-739.

Hancock WW, Lord RH, Colby AJ, Diamantstein J, Rickles FR und Tilney NL. Identification of IL 2R+ Tcells and macrophages within rejecting rat cardiac allografts. comparison of the effects of treatment with anti-IL 2R monoclonal antibody or cyclosporin. *J.Immunol.* 1987; 138: 164-170.

Hancock WW, Pleau ME und Kobzik L. Recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor down-regulates expression of IL-2 receptor on human mononuclear phagocytes by induction of prostaglandin E. *J.Immunol.* 1988; 140: 3021-3025.

Hancock WW, Shi C, Picard MH, Bianchi C und Russell ME. LEW-to-F344 carotid artery allografts: analysis of a rat model of posttransplant vascular injury involving cell-mediated and humoral responses. *Transplantation* 1995; 60: 1565-1572.

Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ und Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N.Engl.J.Med.* 2000; 342: 605-612.

Haynes DR, Whitehouse MW und Vernon-Roberts B. The prostaglandin E1 analogue, misoprostol, regulates inflammatory cytokines and immune functions in vitro like the natural prostaglandins E1, E2 and E3. *Immunology* 1992; 76: 251-257.

Heidenreich S, Gong JH, Renz H, Schmidt A, Nain M und Gemsa D. Temporally different stimulation of TNF-alpha and PGE2 release from GM-CSF-primed macrophages. *Lymphokine Res.* 1989; 8: 353-357.

Henry ML. Cyclosporine and tacrolimus (FK506): a comparison of efficacy and safety profiles. *Clin.Transplant.* 1999; 13: 209-220.

Imahara SD, Jelacic S, Junker CE und O'Keefe GE. The influence of gender on human innate immunity. *Surgery* 2005; 138: 275-282.

Isobe M, Suzuki J, Yamazaki S, Yazaki Y, Horie S, Okubo Y, Maemura K und Sekiguchi M. Regulation by differential development of Th1 and Th2 cells in peripheral tolerance to cardiac allograft induced by blocking ICAM-1/LFA-1 adhesion. *Circulation* 1997; 96: 2247-2253.

Johnson KW und Smith KA. cAMP regulation of IL-2 receptor expression. Selective modulation of the p75 subunit. *J.Immunol.* 1990; 145: 1144-1151.

Jones TR, Ha J, Williams MA, Adams AB, Durham MM, Rees PA, Cowan SR, Pearson TC und Larsen CP. The role of the IL-2 pathway in costimulation blockade-resistant rejection of allografts. *J.Immunol.* 2002; 168: 1123-1130.

Jonsson CA und Carlsten H. Inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) inhibition in vitro suppresses lymphocyte proliferation and the production of immunoglobulins, autoantibodies and cytokines in splenocytes from MRLlpr/lpr mice. *Clin.Exp.Immunol.* 2001; 124: 486-491.

Kammer GM. The adenylate cyclase-cAMP-protein kinase A pathway and regulation of the immune response. *Immunol.Today* 1988; 9: 222-229.

Karalis K, Mastorakos G, Sano H, Wilder RL und Chrousos GP. Somatostatin may participate in the antiinflammatory actions of glucocorticoids. *Endocrinology* 1995; 136: 4133-4138.

Kirschenbaum MA. The effect of prostaglandin inhibition on the natriuresis of drug-induced renal vasodilatation. *Prostaglandins* 1977; 13: 1103-1112.

Kishida M, Urakaze M, Takata M, Nobata Y, Yamamoto N, Temaru R, Sato A, Nakamura N und Kobayashi M. PGE1 inhibits the expression of PAI-1 mRNA induced by TNF-alpha in human mesangial cells. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* 2005; 113: 365-371.

Kopp JB und Klotman PE. Cellular and molecular mechanisms of cyclosporin nephrotoxicity. *J.Am.Soc.Nephrol.* 1990; 1: 162-179.

Korn JH, Downie E, Roth GJ und Ho SY. Synergy of interleukin 1 (IL-1) with arachidonic acid and A23187 in stimulating PGE synthesis in human fibroblasts: IL-1 stimulates fibroblast cyclooxygenase. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 1989; 50: 196-204.

Krause DS und Deutsch C. Cyclic AMP directly inhibits IL-2 receptor expression in human T cells: expression of both p55 and p75 subunits is affected. *J.Immunol.* 1991; 146: 2285-2296.

Kreis H. New strategies to reduce nephrotoxicity. *Transplantation* 2001; 72: 99-104.

Kunzendorf U, Hien Tran T und Bulfone-Paus S. The Th1-Th2 paradigm in 1998: law of nature or rule with exceptions. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1998; 13: 2445-2448.

Le JM und Vilcek J. Interleukin 6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response. *Lab. Invest.* 1989; 61: 588-602.

Lechler RI, Lombardi G, Batchelor JR, Reinsmoen N und Bach FH. The molecular basis of alloreactivity. *Immunol.Today* 1990; 11: 83-88.

Lee EN, Kim EY, Lee J, Lee HJ, Lee KW, Joh JW, Lee SK, Lee DS und Kim SJ. Changes in expression of T-cell activation-related molecules and cytokines during tolerance induction in an allogeneic skin transplantation murine model. *Transplant.Proc.* 2004; 36: 2425-2428.

Leslie CA, Gonnerman WA und Cathcart ES. Gender differences in eicosanoid production from macrophages of arthritis-susceptible mice. *J.Immunol.* 1987; 138: 413-416.

Leslie CA und Dubey DP. Increased PGE2 from human monocytes isolated in the luteal phase of the menstrual cycle. Implications for immunity? *Prostaglandins* 1994; 47: 41-54.

Levi FA, Canon C, Touitou Y, Sulon J, Mechkouri M, Ponsart ED, Touboul JP, Vannetzel JM, Mowzowicz lund Reinberg A. Circadian rhythms in circulating T lymphocyte subtypes and plasma testosterone, total and free cortisol in five healthy men. *Clin.Exp.Immunol.* 1988; 71: 329-335.

Lindl T und Bauer J. *Zell- und Gewebekultur, Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*, Stuttgart, Deutschland:Gustav Fischer Verlag, 1989.

Male D und Cooke A. *Advanced Immunology*, London, England: Mosby, 1996.

Mallory A und Kern F, Jr. Drug-induced pancreatitis: a critical review. *Gastroenterology* 1980; 78: 813-820.

Marcinkiewicz J. In vitro cytokine release by activated murine peritoneal macrophages: role of prostaglandins in the differential regulation of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1 and interleukin 6. *Cytokine* 1991; 3: 327-332.

Meier-Kriesche HU, Schold JD und Kaplan B. Long-term renal allograft survival: have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *Am.J.Transplant.* 2004; 4: 1289-1295.

Metcalf D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood* 1986; 67: 257-267.

Mihatsch MJ, Kyo M, Morozumi K, Yamaguchi Y, Nickeleit V und Ryffel B. The side-effects of ciclosporine-A and tacrolimus. *Clin.Nephrol.* 1998; 49: 356-363.

Mikamo S. A novel method for the purification of sheep red cell rosetting lymphocytes. *J.Immunol.Methods* 1988; 107: 189-196.

Miles EA, Aston L und Calder PC. In vitro effects of eicosanoids derived from different 20-carbon fatty acids on T helper type 1 and T helper type 2 cytokine production in human whole-blood cultures. *Clin.Exp.Allergy* 2003; 33: 624-632.

Mitchell MD, Dudley DJ, Edwin SS und Schiller SL. Interleukin-6 stimulates prostaglandin production by human amnion and decidual cells. *Eur.J.Pharmacol.* 1991; 192: 189-191.

Mnich SJ, Collins PW, Gasiiecki AF, Kramer SW, Gregory SA und Portanova JP. Evaluation of Misoprostol and Analogs as Inhibitors of T-Cell Activation. *Am.J.Ther.* 1995; 2: 648-659.

Moed H, Stoof TJ, Boorsma DM, von Blomberg BM, Gibbs S, Bruynzeel DP, Scheper RJ und Rustemeyer T. Identification of anti-inflammatory drugs according to their capacity to suppress type-1 and type-2 T cell profiles. *Clin.Exp.Allergy* 2004; 12: 1868-1875.

Moran M, Mozes MF, Maddux MS, Veremis S, Bartkus C, Ketel B, Pollak R, Wallemark C und Jonasson O. Prevention of acute graft rejection by the prostaglandin E1 analogue misoprostol in renal-transplant recipients treated with cyclosporine and prednisone. *N.Engl.J.Med.* 1990; 322: 1183-1188.

Morelon E, Mamzer-Bruneel MF, Peraldi MN und Kreis H. Sirolimus: a new promising immunosuppressive drug. Towards a rationale for its use in renal transplantation. *Nephrol.Dial.Transplant.* 2001; 16: 18-20.

Mosmann TR und Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu.Rev.Immunol.* 1989; 7: 145-173.

Motoyama K, Arima T, Lehmann M und Flye MW. Tolerance to heart and kidney grafts induced by nondepleting anti-CD4 monoclonal antibody (RIB 5/2) versus depleting anti-CD4 monoclonal antibody (OX-38) with donor antigen administration. *Surgery* 1997; 122: 213-219.

Mottram PL, Han WR, McKenzie IF und Hancock WW. Increased expression of IL-4 and IL-10 and decreased expression of IL-2 and interferon-gamma in long-surviving mouse heart allografts after brief CD4-monoclonal antibody therapy. *Transplantation* 1995; 59: 559-565.

Munoz E, Zubiaga AM, Merrow M, Sauter NP und Huber BT. Cholera toxin discriminates between T helper 1 and 2 cells in T cell receptor-mediated activation: role of cAMP in T cell proliferation. *J.Exp.Med.* 1990; 172: 95-103.

Nakano T, Ohara O, Teraoka H und Arita H. Glucocorticoids suppress group II phospholipase A2 production by blocking mRNA synthesis and post-transcriptional expression. *J.Biol.Chem.* 1990; 265: 12745-12748.

Nakazato Y, Simonson MS, Herman WH, Konieczkowski M und Sedor JR. Interleukin-1 alpha stimulates prostaglandin biosynthesis in serum-activated mesangial cells by induction of a non-pancreatic (type II) phospholipase A2. *J.Biol.Chem.* 1991; 266: 14119-14127.

Neumayer HH, Budde K, Waiser J. *Neue Medikamente in der Transplantationsmedizin*, 2. Auflage. UNI-MED Verlag, Bremen-London-Boston. 2008

Niguma T, Sakagami K, Kawamura T, Haisa M, Fujiwara T, Kusaka S, Uda M und Orita K. Expression of the interleukin 2 receptor beta chain (p75) in renal transplantation--applicability of anti-interleukin-2 receptor beta chain monoclonal antibody. *Transplantation* 1991; 52: 296-302.

Oberbauer R, Segoloni G, Campistol JM, Kreis H, Mota A, Brault Y und Neylan JF. Early cyclosporine withdrawal from a sirolimus-based regimen results in better renal allograft survival and renal function at 48 months after transplantation. *Transpl.Int.* 2005; 18: 22-28.

Oellerich M, Armstrong VW, Kahan B, Shaw L, Holt DW, Yatscoff R, Lindholm A, Halloran P, Gallicano K und Wonigeit K. Lake Louise Consensus Conference on cyclosporin monitoring in organ transplantation: report of the consensus panel. *Ther.Drug Monit.* 1995; 17: 642-654.

Oliveira G, Xavier P, Murphy B, Neto S, Mendes A, Sayegh MH und Guerra LE. Cytokine analysis of human renal allograft aspiration biopsy cultures supernatants predicts acute rejection. *Nephrol.Dial.Transplant.* 1998; 13: 417-422.

Onodera K, Hancock WW, Graser E, Lehmann M, Sayegh MH, Strom TB, Volk HD und Kupiec-Weglinski JW. Type 2 helper T cell-type cytokines and the development of "infectious" tolerance in rat cardiac allograft recipients. *J.Immunol.* 1997; 158: 1572-1581.

Opelz G. Influence of treatment with cyclosporine, azathioprine and steroids on chronic allograft failure. *The Collaborative Transplant Study. Kidney Int.* 1995; 52: 89-92.

Opelz G, Naujokat C, Daniel V, Terness P und Dohler B. Disassociation between risk of graft loss and risk of non-Hodgkin lymphoma with induction agents in renal transplant recipients. *Transplantation* 2006; 81: 1227-1233.

Paliard X, de Waal MR, Yssel H, Blanchard D, Chretien I, Abrams J, deVries J. und Spits H. Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones. *J.Immunol.* 1988; 141: 849-855.

Parhar RS, Yagel S und Lala PK. PGE2-mediated immunosuppression by first trimester human decidual cells blocks activation of maternal leukocytes in the decidua with potential anti-trophoblast activity. *Cell Immunol.* 1989; 120: 61-74.

Patke CL, Orson FM, Shearer WT. Cyclic AMP-mediated modulation of immunoglobulin production in B cells by prostaglandin E1. *Cell Immunol.* 1991; 137: 36-45.

Pfeilschifter J, Pignat W, Vosbeck K und Marki F. Interleukin 1 and tumor necrosis factor synergistically stimulate prostaglandin synthesis and phospholipase A2 release from rat renal mesangial cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1989; 159: 385-394.

Pharmacia Biotech Sweden. *Ficoll-Paque Resarch Grade Instructions*. 1998.

Pharmingen. *Cytokine Elisa protocol*. San Diego, CA, USA. 1996.

Phipps RP, Stein SH und Roper RL. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol.Today* 1991; 12: 349-352.

Pober JS und Cotran RS. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 1990; 50: 537-544.

Politis D, Sivo J, Driggers PH, Ozato K und Vogel SN. Modulation of interferon consensus sequence binding protein mRNA in murine macrophages. Induction by IFN-gamma and down-regulation by IFN-alpha, dexamethasone and protein kinase inhibitors. *J.Immunol.* 1992; 148: 801-807.

Rappaport RS und Dodge GR. Prostaglandin E inhibits the production of human interleukin 2. *J.Exp.Med.* 1982; 155: 943-948.

Remick DG, Larrick JW, Nguyen DT und Kunkel SL. Stimulation of prostaglandin E2 and thromboxane B2 production by human monocytes in response to interleukin-2. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1987; 147: 86-93.

Remuzzi G, Perico N, Carpenter CB und Sayegh MH. The thymic way to transplantation tolerance. *J.Am.Soc.Nephrol.* 1995; 5: 1639-1646.

Rincon M, Tugores A, Lopez-Rivas A, Silva A, Alonso M, de Landazuri MO und Lopez-Botet M. Prostaglandin E2 and the increase of intracellular cAMP inhibit the expression of interleukin 2 receptors in human T cells. *Eur.J.Immunol.* 1988; 18: 1791-1796.

Roper RL, Conrad DH, Brown DM, Warner GL und Phipps RP. Prostaglandin E2 promotes IL-4-induced IgE and IgG1 synthesis. *J.Immunol.* 1990; 145: 2644-2651.

Rota S, Rambaldi A, Gaspari F, Noris M, Daina E, Benigni A, Donadelli R, Remuzzi G und Garattini S. Methylprednisolone dosage effects on peripheral lymphocyte subpopulations and eicosanoid synthesis. *Kidney Int.* 1992; 42: 981-990.

Rowles JR, Foegh ML, Khirabadi BS und Ramwell PW. The synergistic effect of cyclosporine and iloprost on survival of rat cardiac allografts. *Transplantation* 1986; 42: 94-96.

Ruef C, Budde K, Lacy J, Northemann W, Baumann M, Sterzel RB und Coleman DL. Interleukin 6 is an autocrine growth factor for mesangial cells. *Kidney Int.* 1990; 38: 249-257.

Ruef C und Coleman DL. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: pleiotropic cytokine with potential clinical usefulness. *Rev.Infect.Dis.* 1990 ; 12: 41-62.

Santoli D und Zurier RB. Prostaglandin E precursor fatty acids inhibit human IL-2 production by a prostaglandin E-independent mechanism. *J.Immunol.* 1989; 143: 1303-1309.

Sayegh MH und Turka LA. T cell costimulatory pathways: promising novel targets for immunosuppression and tolerance induction. *J.Am.Soc.Nephrol.* 1995; 6: 1143-1150.

Schad VC und Phipps RP. Two signals are required for accessory cells to induce B cell unresponsiveness. *Tolerogenic Ig and prostaglandin.* *J.Immunol.* 1988; 141: 79-84.

Schoenhard G, Oppermann J und Kohn FE. Metabolism and pharmacokinetic studies of misoprostol. *Dig.Dis.Sci.* 1985; 30: 126-128.

Schulz S, Schagdarsurengin U, Muller-Werdan U, Werdan K und Glaser C. Relation between the tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression, and clinical, biochemical, and genetic markers: age, body mass index and uric acid are independent predictors for an elevated TNF-alpha plasma level in a complex risk model. *Eur.Cytokine Netw.* 2004; 15: 105-111.

Shaw LM, Kaplan B, DeNofrio D, Korecka M, Brayman KL. Pharmacokinetics and concentration-control investigations of mycophenolic acid in adults after transplantation. *Ther. Drug Monit.* 2000; 22: 14-19.

Shirahama M, Ishibashi H, Tsuchiya Y, Kurokawa S, Hayashida K, Okumura Y und Niho Y. Kupffer cells may autoregulate interleukin 1 production by producing interleukin 1 inhibitor and prostaglandin E2. *Scand.J.Immunol.* 1988; 28: 719-725.

Simpson MA, Madras PN, Cornaby AJ, Etienne T, Dempsey RA, Clowes GH und Monaco AP. Sequential determinations of urinary cytology and plasma and urinary lymphokines in the management of renal allograft recipients. *Transplantation* 1989; 4: 218-223.

Smith KA. Interleukin-2: inception, impact and implications. *Science* 1988; 240: 1169-1176.

Sparberg M, Simon N und delGreco F. Intrahepatic cholestasis due to azathioprine. *Gastroenterology* 1969; 57: 439-441.

Stahl RA, Thaiss F, Haberstroh U, Kahf S, Shaw A und Schoeppe W. Cyclooxygenase inhibition enhances rat interleukin 1 beta-induced growth of rat mesangial cells in culture. *Am.J.Physiol.* 1990; 259: 419-424.

Staines N und Brostoff J. *Immunologisches Grundwissen*, Stuttgart, Deutschland: Gustav Fischer Verlag, 1999.

Steiger JU. Transplantation immunology: is the manipulation of the cytokine network therapeutically justified? *Schweiz.Med.Wochenschr.* 1998; 128: 349-355.

Street NE und Mosmann TR. Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB J.* 1991; 5: 171-177.

Strom TB und Carpenter CB. Prostaglandin as an effective antirejection therapy in rat renal allograft recipients. *Transplantation* 1983 ; 35: 279-281.

Strom TB, Roy-Chaudhury P, Manfro R, Zheng XX, Nickerson PW, Wood K, Bushell A. The Th1/Th2 paradigm and the allograft response. *Curr. Opin. Immunol.* 1996; 8: 688-693.

Sun J, Matsumoto Y, McCaughan GW, Gallagher ND, Sheil AG und Bishop GA. Levels of cytokine expression in rat liver allograft rejection compared to allograft tolerance. *Transplant.Proc.* 1992; 24: 2309.

Sunder-Plassmann R, Majdic O, Knapp W und Holter W. In vitro and in vivo activated T cells display increased sensitivity to PGE2. *Cell Immunol.* 1991; 138: 289-299.

Suzuki J, Isobe M, Izawa A, Takahashi W, Yamazaki S, Okubo Y, Amano J und Sekiguchi M. Differential Th1 and Th2 cell regulation of murine cardiac allograft acceptance by blocking cell adhesion of ICAM-1/LFA-1 and VCAM-1/VLA-4. *Transpl.Immunol.* 1999; 7: 65-72.

Suzuki S, Toyabe S, Moroda T, Tada T, Tsukahara A, Iiai T, Minagawa M, Maruyama S, Hatakeyama K, Endoh K und Abo T. Circadian rhythm of leucocytes and lymphocytes subsets and its possible correlation with the function of the autonomic nervous system. *Clin.Exp.Immunol.* 1997; 110: 500-508.

Swinnen LJ, Costanzo-Nordin MR, Fisher SG, O'Sullivan EJ, Johnson MR, Heroux AL, Dizikes GJ, Pifarre R und Fisher RI. Increased incidence of lymphoproliferative disorder after immunosuppression with the monoclonal antibody OKT3 in cardiac-transplant recipients. *N.Engl.J.Med.* 1990; 323: 1723-1728.

Tamir A und Isakov N. Increased intracellular cyclic AMP levels block PKC-mediated T cell activation by inhibition of c-jun transcription. *Immunol.Lett.* 1991; 27: 95-99.

Tarumi K, Murakami M, Yagihashi A, Nakagawa I, Hirata K und Uede T. CTLA4IgG treatment induces long-term acceptance of rat small bowel allografts. *Transplantation* 1999; 67: 520-525.

Topley N, Floege J, Wessel K, Hass R, Radeke HH, Kaefer V und Resch K. Prostaglandin E2 production is synergistically increased in cultured human glomerular mesangial cells by combinations of IL-1 and tumor necrosis factor-alpha 1. *J.Immunol.* 1989; 143: 1989-1995.

Van SJ. Interleukin-6: an overview. *Annu.Rev.Immunol.* 1990; 8: 253-278.

Vandenbroecke C, Caillat-Zucman S, Legendre C, Noel LH, Kreis H, Woodrow D, Bach JF und Tovey MG. Differential in situ expression of cytokines in renal allograft rejection. *Transplantation* 1991; 51: 602-609.

Wacholtz MC, Minakuchi R und Lipsky PE. Characterization of the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate mediated regulation of IL2 production by T cells and Jurkat cells. *Cell Immunol.* 1991; 135: 285-298.

Waclavicek M, Majdic O, Stulnig T, Berger M, Sunder-Plassmann R, Zlabinger GJ, Baumruker T, Stockl J, Ebner C, Knapp W und Pickl WF. CD99 engagement on human peripheral blood T cells results in TCR/CD3-dependent cellular activation and allows for Th1-restricted cytokine production. *J.Immunol.* 1998; 161: 4671-4678.

Waiser J, Budde K, Katalinic A, Kuerzdorfer M, Riess R und Neumayer HH. Interleukin-6 expression after renal transplantation. *Nephrol.Dial.Transplant.* 1997; 12: 753-759.

Waiser J, Budde K, Schreiber M, Peibst O, Koch U, Böhler T, Hoffken B, Hauser I und Neumayer HH. The quality of life in end stage renal disease care. *Transpl.Int.* 1998; 11: 42-45.

Walker C, Kristensen F, Bettens F und deWeck AL. Lymphokine regulation of activated lymphocytes. Prostaglandin E2-induced inhibition of interleukin 2 production. *J.Immunol.* 1983; 130: 1770-1773.

Wang MH und Smith KA. The interleukin 2 receptor. Functional consequences of its bimolecular structure. *J.Exp.Med.* 1987; 166: 1055-1069.

Weiss A, Imboden J, Hardy K, Manger B, Terhorst C und Stobo J. The role of the T3/antigen receptor complex in T-cell activation. *Annu.Rev.Immunol.* 1986; 4: 593-619.

Widomski D, Fretland DJ, Gasiiecki AF und Collins PW. The prostaglandin analogs, misoprostol and SC-46275, potently inhibit cytokine release from activated human monocytes. *Immunopharmacol.Immunotoxicol.* 1997; 19: 165-174.

Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, Held PJ und Port FK. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N.Engl.J.Med.* 1999; 341: 1725-1730.

Zimmer T und Jones PP. Combined effects of tumor necrosis factor-alpha, prostaglandin E2 and corticosterone on induced Ia expression on murine macrophages. *J.Immunol.* 1990; 145: 1167-1175.

Zola H. Analysis of receptors for cytokines and growth factors in human disease. *Dis.Markers* 1996; 12: 225-240.

DANKSAGUNG

Ich möchte mich ausdrücklich bei Herrn Dr. med. Johannes Waiser für seine intensive Betreuung während meiner Promotionsarbeit bedanken. Ihm habe ich die Möglichkeit selbständigen experimentellen Arbeitens, sowie zahlreiche theoretische und praktische Anregungen zu verdanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. H.-H. Neumayer für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Institut anzufertigen.

Ein besonders herzliches Dankeschön geht an Dr. Torsten Böhler, Pia Hambach und Christine Lehmann aus dem Nephrologischen Forschungslabor. Ihre Kompetenz, Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft bei der praktischen Durchführung hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern und meinen Freunden bedanken. Während der mühseligen Zeit haben sie mich motiviert, dieses Projekt zu einem guten Abschluß zu bringen.

LEBENS LAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die Wirkung von Prostaglandin E₁ auf die Proliferation und Zytokinexpression peripherer mononukleärer Zellen“ selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Die Durchführung der experimentellen Arbeiten erfolgte studienbegleitend im Zeitraum Oktober 1996 bis Mai 2000 im Nephrologischen Forschungslabor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie der Charité Campus Mitte.

Berlin im September 2008

Juliane Stoll