

**Urologische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar**

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Hartung)

Beeinflussung der Regulatorfunktion mononukleärer
Zellen des peripheren Blutes (PBMC) *in vitro*

Ralf Schmidmaier

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. R. Hartung
2. Privatdozentin Dr. H. Bernhard

Die Dissertation wurde am 19.09.2001 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.02.2002
angenommen.

Meinen Eltern

*The enjoyment of the highest attainable standard of health
is one of the fundamental rights of every human being
without distinction of race, religion, political belief, economic or social condition.
The health of all peoples is fundamental to the attainment of peace and security
and is dependent upon the fullest co-operation of individuals and States.
(Constitution of the World Health Organization, July 22, 1946)*

Widmung	1
Inhaltsverzeichnis	2
Liste der verwendeten Abkürzungen	4
1. Problemstellung vor dem Hintergrund aktueller Erkenntnisse	5
1.1. Einleitung	5
1.2. Das Immunsystem des Menschen	6
1.2.1. Das angeborene (unspezifische) Immunsystem	6
1.2.2. Das erworbene (spezifische) Immunsystem	7
1.3. Die gemischte Leukozytenreaktion (MLR)	12
1.4. Lektine	13
1.5. Tumorummunologie	15
1.6. Immunsuppression - Immunpotenzierung - Kontrasuppression	17
1.7. Fragestellung dieser Arbeit	20
2. Material und Methoden	21
2.1. Materialien (alphabetisch)	21
2.2. Methoden	21
2.2.1. Zellkultur	21
2.2.2. Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität	24
2.2.3. Bestimmung der Zellproliferation	24
2.2.4. Bestimmung der zellvermittelten Zytotoxizität	25
2.2.5. Statistische Methoden	27
3. Eigene Ergebnisse	28
3.1. Etablierung des Testsystems	28
3.1.1. Einfluss der Spenderindividualität auf die Ergebnisse der MLR	28
3.1.2. Einfluss der Inkubationszeit der primären MLR auf Proliferation und zellvermittelte Zytotoxizität nach der sekundären MLR	31
3.1.3. Monitoring der Zellzahlkinetik in der primären MLR des Testsystems	31
3.1.4. Einfluss der Mitomycin-C-Konzentration auf die Überlebenszeit der PBMC	31
3.1.5. Einfluss der Inaktivierung der Regulatorzellen auf Proliferation und zellvermittelte Zytotoxizität in der sekundären MLR	33
3.2. Charakterisierung der Mitomycin-C-Wirkung auf Regulatorzellen	38
3.2.1. Reproduzierbarkeit, Antigen-spezifität und Konzentrationsabhängigkeit des beobachteten Effektes	38
3.2.2. MMC-Effekt: Deblockierung/Kontrasuppression oder Immunpotenzierung ?	38
(a) Crowding: Einfluss der Zelldichte auf die immunologische Funktion der PBMC	42
(b) Einfluss der Effektor-Stimulator-Ratio auf Proliferation und Zytotoxizität	42
(c) Einfluss von Pharmaka auf die durch Crowding bzw. Zellratio induzierte Immunsuppression	42

3.3. Testung von Immunmodulatoren im etablierten Testsystem	47
3.3.1. Mitomycin C: prä versus post Lektinstimulation	47
3.3.2. Testung von Pharmaka im Testsystem	47
(a) Testgruppe 1: Propranolol und Tolbutamid	49
(b) Testgruppe 2: Ranitidin, Cimetidin und Sulpirid	50
(c) Testgruppe 3: Indomethacin und Diclofenac	50
4. Diskussion	59
4.1. Diskussion der Methoden	59
4.2. Diskussion der Ergebnisse	60
4.2.1. Diskussion der methodischen Etablierung eines Testsystems zur Bestimmung immunmodulierender Eigenschaften von Pharmaka auf Regulatorzellen	60
<i>Immunmodulierende Wirkung von Mitomycin C (MMC): MMC-Behandlung der Regulatorzellen fördert die zellvermittelte Zytotoxizität der Effektorzellen einer gemischten Leukozytenreaktion (MLR).</i>	61
<i>Immunsuppression durch Crowding kann pharmakologisch beeinflusst werden.</i>	62
<i>Die Effektor-Target-Ratio in der MLR beeinflusst die immunologische Aktivität der PBMC.</i>	64
4.2.2. Diskussion der immunmodulatorischen Wirkung der getesteten Substanzen	65
<i>Propranolol wirkt auf Regulatorzellen immunstimulierend.</i>	65
<i>Antagonisten von H₂-histaminergen und D₂-dopaminergen Rezeptoren vermitteln eine Immunsuppression der Regulatorzellen im verwendeten Testsystem.</i>	66
<i>Der Arachidonsäurestoffwechsel ist nicht von entscheidender Bedeutung bei der Steuerung der immunologischen Funktion von Regulatorzellen.</i>	68
5. Zusammenfassung	70
6. Literaturverzeichnis	71
7. Abbildungs- und Tabellenübersicht	82
7.1. Abbildungsübersicht	82
7.2. Tabellenübersicht	83
8. Anhang	A1
8.1. Bezugsquellenverzeichnis	A1
8.2. Ergebnistabelle der Testsubstanzen	A2
Danksagung	

Liste der verwendeten Abkürzungen

Ag	Antigen
AK	Antikörper
APC	antigen presenting cell: antigenpräsentierende Zelle
CD	cluster of differentiation/cluster determinants: Leukozytendifferenzierungsantigene
Cim.	Cimetidin
CMC	cell mediated cytotoxicity: zellvermittelte Zytotoxizität
ConA	Concanavalin A
CTL	cytotoxic T lymphocyte: zytotoxischer T-Lymphozyt
DAG	Diacylglycerin
DC	dendritic cell: dendritische Zelle
Diclo.	Diclofenac
DTH	delayed type hypersensitivity: Immunreaktion vom verzögerten Typ
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GIF	glycosylation inhibiting factor
GM-CSF	granulocyte monocyte colony stimulating factor
HLA	humane Leukozytenantigene
ICAM-1	intracellular adhesion molecule-1
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Indo.	Indomethacin
IP3	Inositoltrisphosphat
KG	Körpergewicht
LAK	Lymphokinaktivierte Killerzellen
LFA-1	lymphocyte function associated antigen-1
MHC	major histocompatibility complex: Haupthistokompatibilitätskomplex
MHC-I	Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse I
MHC-II	Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse II
MLC	mixed leukocyte culture: gemischte Leukozytenkultur
MLR	mixed leukocyte reaction: gemischte Leukozytenreaktion
MMC	Mitomycin C
NK-Zellen	natural killer cells: natürliche Killerzellen
PBMC	peripheral blood mononuclear cells: mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PGE2	Prostaglandin E2
PHA	Phytohämagglutinin
PIP2	Phosphatidylinositolbisphosphat
Propr.	Propranolol
Ran.	Ranitidin
ROI	reactive oxygen intermediates: freie Sauerstoffradikale
Sul.	Sulpirid
TAA	Tumorasoziierte Antigene
TAP	transporter associated with antigen processing
TCR	T cell receptor: T-Zellrezeptor
Th	T-Helferzelle
Th0	naive Typ-0 T-Helferzelle
Th1	Typ 1 T-Helferzelle
Th2	Typ 2 T-Helferzelle
Thp	precursor T helper lymphocyte: Th-Vorläuferzelle
TIL	Tumorfiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
Tolb.	Tolbutamid
Ts	Antigenspezifische T-Suppressorzelle
TSA	Tumorspezifische Antigene
TsF	Antigenspezifischer Suppressorfaktor einer antigenspezifischen T-Suppressorzelle
WHO	World Health Organisation: Weltgesundheitsorganisation

1. Problemstellung vor dem Hintergrund aktueller Erkenntnisse

1.1 Einleitung

Die Freiheit von Krankheit ist laut WHO noch nicht die Definition von Gesundheit (40) und dennoch ist diese Immunitas vorrangiges Ziel vieler Kranker und auch derer, die den Kranken helfen wollen, den Ärzten. Die Immunologie als Lehre von den Erscheinungen der Immunität hat nicht mehr nur herausragende Bedeutung bezüglich der Nichtanfälligkeit gegenüber mikrobiologischen Krankheitserregern, sondern ist heute fester Bestandteil der allermeisten Fachdisziplinen der Medizin. Und dies nicht mehr nur als diagnostisches Verfahren oder als wissenschaftliche Methode zur ätiologischen Grundlagenforschung, sondern in immer stärkerem Ausmaß in der Therapie von Patienten. Besonders die Hoffnung von Tumorpatienten und Onkologen stützt sich auf den Gedanken, dass das körpereigene Immunsystem mit seiner einzigartigen Effektivität und Spezifität in der Lage sein müsste, entartete Zellen restlos zu zerstören und gesundes Gewebe dabei zu verschonen. Die theoretische und experimentelle Immunologie hat gezeigt, (a) dass sich Tumorzellen von normalen Körperzellen nicht nur funktionell, sondern auch phänotypisch unterscheiden, z.B. durch die Expression tumorspezifischer Antigene, (b) dass das Immunsystem über Instrumente verfügt, die spezifisch diese entarteten Zellen erkennen können, z.B. tumorantigenspezifische, tumorinfiltrierende Lymphozyten, und (c) dass kontinuierlich eine Immunüberwachung der Gewebe auf entartete Zellen stattfindet (33, 122). Die Existenz eines Tumors zeigt aber das Versagen dieses Systems an und die Ursachen dafür sind noch weitgehend unbekannt. Sehr aktuelle klinische Studien zeigen jedoch, dass es auch in vivo beim Menschen möglich ist, durch immunologische Therapiestrategien eine komplette Remission weit fortgeschrittener, mit konventionellen Therapien nicht mehr heilbarer Tumoren zu induzieren (38, 91, 105, 202). Dennoch reagiert ein Großteil der Patienten nicht oder nur schwach auf diese Immuntherapien. Eine der Ursachen ist, dass die Immunitätslage von Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen stark herabgesetzt ist. Durch generalisierte Immunsuppression, durch tumorspezifische Suppressorzellen oder durch Freisetzung immunsuppressiver Botenstoffe aus dem Tumor selbst. Ohne einen Rest intakter zellulärer Immunität scheint eine wirkungsvolle Immuntherapie wenig effektiv, was die aktuellen Studien belegen. Die Koexistenz eines lebensbedrohlichen Tumors, welcher tumorassoziierte Antigene exprimiert, und tumorantigenspezifischer Effektorzellen des Immunsystems, die nicht in der Lage sind, die Zielzellen zu zerstören, ist eines der Dilemma in der modernen Tumorimmunologie. Theoretische und experimentelle Grundlage der vorliegenden Arbeit sind Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, die sich mit der zellulären Intervention gegen Immundysregulation beschäftigen (107-114).

1.2 Das Immunsystem des Menschen

Das Immunsystem des Menschen unterscheidet angeborene (unspezifische) und erworbene (spezifische) Anteile (47, 48). Ersteres umfasst Fresszellen (Neutrophile, Monozyten, Makrophagen), Zellen, die Entzündungsmediatoren freisetzen (Basophile, Mastzellen, Eosinophile) und die sogenannten NK-Zellen (natürliche Killerzellen). Humorale Elemente sind Komplement, Akute-Phase-Proteine und Zytokine (z.B. Interferon). Das erworbene Immunsystem ist gekennzeichnet durch die Proliferation antigenspezifischer B- und T-Lymphozyten, die durch Bindung der Antigene an spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche ausgelöst wird. Dabei sind die zellulären Effektoren zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) und die humoralen Effektoren die Antikörper der Plasmazellen. Antigenpräsentierende Zellen (APC) vermögen Proteine zu prozessieren und den T-Lymphozyten Peptidantigene zu präsentieren. Bei der Abwehr von Pathogenen arbeiten angeborenes und erworbenes Immunsystem in aller Regel zusammen.

1.2.1 Das angeborene (unspezifische) Immunsystem

Charakteristisch ist das Fehlen eines immunologischen Gedächtnisses, d.h. die Abwehrreaktion ändert sich bei wiederholtem Antigenkontakt nicht. Makrophagen und Neutrophile besitzen Rezeptoren, welche Kohlenhydratgruppen erkennen, die auf Vertebratenzellen normalerweise nicht vorkommen und unterscheiden auf diese Weise zwischen "fremd" und "eigen". Zusätzlich haben sie aber auch Rezeptoren für Komplement und Antikörper, mit welchen sie opsonisierte Partikel und Zellen erkennen können. Apoptotische Körperzellen exprimieren Zelloberflächenmoleküle, wie z.B. Phosphatidylserin, die durch die Phagozyten erkannt werden. Alle erwähnten Signale induzieren Phagozytose, intrazelluläre Prozessierung und Präsentation von Peptidantigenen auf der Zelloberfläche von APC. Eine besondere Rolle spielen die dendritischen Zellen (DC), welche kontinuierlich extrazelluläre Antigene endozytieren. Die erwähnten Zellen und Mechanismen sind vor allem zur Erkennung extrazellulärer Antigene notwendig. NK-Zellen hingegen ermöglichen die Erkennung von viral infizierten und malignen Zellen. Zum einen besitzen NK-Zellen, wie viele andere Zellen, einen Fc-Rezeptor mit dem sie IgG-markierte Pathogene erkennen können. Charakteristisch jedoch ist der Mechanismus bestehend aus killeraktivierendem und killerinhibierendem Rezeptor. Der killeraktivierende Rezeptor erkennt eine Vielzahl von Molekülen, welche auch auf normalen Zellen vorkommen und eigentlich die NK-Zelle zur Tötung der Zielzelle durch Freisetzung von Perforin und Granzyme stimulieren. Gehemmt wird diese Reaktion, solange gleichzeitig der killerinhibierende Rezeptor ein MHC-I-Molekül bindet, welche auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden. Fehlt bei viral oder maligne transformierten Zellen das MHC-I-Molekül, erlischt der inhibitorische Effekt und die Zelle wird durch die NK-Zelle lysiert. Komplement ist ein humoraler Effektormechanismus zur Lyse von Zellen, welcher entweder

durch Antigen-Antikörper-Komplexe (klassischer Weg) oder durch Interaktion von Kohlenhydratketten von Mikroorganismen mit mannosebindenden Proteinen des Plasmas aktiviert wird.

1.2.2 Das erworbene (spezifische) Immunsystem

Antigenspezifität

Die B-Zellen sind die Produzenten der tetrameren Antikörper und tragen Antikörper - an der Zellmembran verankert durch eine zusätzliche hydrophobe Transmembrandomäne - als B-Zellrezeptor auf ihrer Zelloberfläche. Der heterodimere T-Zellrezeptor (TCR) hingegen wird nur als transmembranes Molekül produziert. Beide Rezeptortypen bestehen aus variablen Anteilen, die zur Antigenerkennung dienen, und aus konstanten Regionen, die die Funktion des Moleküls definieren. Der B-Zellrezeptor und der γ/δ -T-Zellrezeptor (159, 160) können Antigene direkt erkennen, der α/β -T-Zellrezeptor nur solche Peptidantigene, die zusammen mit einem MHC-Molekül präsentiert werden. Durch einen einzigartigen Rekombinationsprozess (104, 184) können aus weniger als 400 Genen für variable Regionen etwa 10^{15} unterschiedlich spezifische Antigenerkennungsregionen von Antikörpern und eine etwa gleich große Zahl von Antigenerkennungsregionen auf T-Zellrezeptoren (45) produziert werden. Jeder T- oder B-Zellklon exprimiert demnach nur Rezeptormoleküle identischer Antigenspezifität und proliferiert, wenn das spezifische Antigen gebunden wird. Dieser Prozess heißt klonale Selektion. Die meisten Antigene vermögen an Rezeptoren unterschiedlicher Spezifität zu binden, weil sie verschiedene Epitope besitzen, und stimulieren so die Proliferation verschiedener T- und B-Zellklone, führen also zu einer polyklonalen Reaktion. Im Gegensatz zu den T-Lymphozyten findet bei den B-Zellen während der klonalen Expansion ein weiterer genetischer Darwinismus zur Optimierung der Bindungsaffinität des Antikörpers an das Antigen statt. Der Prozess der klonalen Selektion, der Proliferation naiver Lymphozyten bei Erstkontakt mit dem Antigen und die Entwicklung zu Effektor- (CTL, Th, antikörpersezernierenden Plasmazellen) und B/T-Gedächtniszellen wird unter dem Begriff der primären Immunreaktion zusammengefaßt. Kommt es zu einem wiederholten Kontakt mit dem selben Antigen, ermöglichen die B- und T-Gedächtniszellen eine qualitativ und quantitativ stärkere und schnellere, sekundäre Immunreaktion mit Generierung einer größeren Zahl von Effektorzellen und einem höheren Antikörpertiter höherer Affinität. Gedächtniszellen sind CD4⁺/CD26⁺ T-Zellen, die ohne Antigenpräsentation durch APC lösliches Recallantigen erkennen können und daraufhin die antigenspezifischen B-Zellen zur Ig-Produktion und MHC-restringierte CTL stimulieren (179). Das Prinzip zur Induktion von Gedächtniszellen wird bei der klassischen Impfung mit harmlosen Pathogenen ausgenutzt. Im Gegensatz zu T-Zellen, welche lineare Peptidsequenzen erkennen, interagieren Antikörper/B-Zellrezeptoren mit der nativen Form eines Moleküls, also meist einem diskontinuierlichen Epitop. Mit

Ausnahme der sog. T-Zell-unabhängigen Antigene ist die Reifung von B-Zellen zu antikörpersezernierenden Plasmazellen von der Hilfe durch T-Helferzellen abhängig.

T-Zellentwicklung

Lebenslang wandern kontinuierlich Stammzellen in den Thymus und entwickeln sich zu T-Lymphozyten, trotz morphologischer Thymusdegeneration im Alter. Hauptaufgabe der α/β -T-Zellen (169) ist die Erkennung fremder Peptidantigene auf körpereigenen Zellen, welche intrazellulär prozessiert und auf der Zelloberfläche zusammen mit dem MHC-Molekül präsentiert werden. Im Thymus werden die α/β -T-Zellen durch Selektionsmechanismen geschult, den komplexen Sachverhalt der Kombination aus fremdem Peptidantigen und eigenem MHC-Molekül zu erkennen. Im Kortex des Thymus werden den α/β -T-Zellen durch Epithelzellen körpereigene MHC-Moleküle angeboten, und nur wenn es zur erfolgreichen Interaktion mit dem T-Zellrezeptor der α/β -T-Zelle kommt, wird die spontan ablaufende Apoptose in der Entwicklung der T-Lymphozyten verhindert (positive Selektion). In der Medulla des Thymus wird in allen α/β -T-Zellen, deren T-Zellrezeptor mit hoher Affinität an Makrophagen/dendritische Zellen bindet, welche körpereigene Peptide mit körpereigenem MHC präsentieren, Apoptose induziert (negative Selektion). Die unreifen T-Lymphozyten des Thymus exprimieren neben dem T-Zellrezeptor sowohl CD4, welches an die konstante Region des MHC-II bindet, als auch CD8, welches an die konstante Region des MHC-I bindet. Während der Reifung im Thymus verlieren die Zellen ihre Doppelpositivität und entwickeln sich zu CD8-T-Lymphozyten (meist zytotoxische T-Zellen, 1/3 der T-Zellen im peripheren Blut) und zu CD4-T-Lymphozyten (meist T-Helferzellen, 2/3 der T-Zellen). Als naive, einfach positive (CD4 oder CD8) T-Zellen verlassen sie den Thymus.

Toleranzmechanismen

Die negative Selektion nicht autoreaktiver T-Lymphozyten während der Schulung im Thymus ist der erste Mechanismus zur Toleranz gegenüber körpereigenem Gewebe (208). Ein entsprechender Prozess findet für autoreaktive B-Lymphozyten im Knochenmark statt (sogn. zentrale Toleranz). Jedoch werden bei weitem nicht alle Gewebeanigene im Thymus präsentiert. Der Hauptmechanismus der peripheren Toleranz beruht auf der durch Mangel an kostimulatorischen Signalen inkompletten Aktivierung der Lymphozyten, welche eine spezifische Anergie dieser Zellen bedingt. Anergie ist gekennzeichnet durch fehlende IL-2-Produktion und Proliferation bei Restimulation der T-Zelle (gilt für CD4+ und für CD8+ Zellen) durch Antigen und APC, jedoch erhaltener MHC-restringierter Zytotoxizität (63). Eine normale Körperzelle präsentiert laufend Autoantigene, exprimiert aber keine oder nur wenige kostimulatorische Moleküle. Eine autoreaktive T-Zelle wird demnach anerg, wenn sie ein solches Antigen mit ihrem TCR erkennt. Kommt es im Rahmen einer Entzündungsreaktion in eben diesem Gewebe zur Einwanderung von APC, dann

werden unter anderem Autoantigene zusammen mit potenten kostimulatorischen Molekülen präsentiert. Eine antigenspezifische, anerge, autoreaktive T-Zelle kann eine solche APC erkennen, lässt sich von ihr nicht zur IL-2-Produktion und Proliferation stimulieren, sondern kann diese MHC-restringiert lysieren und trägt dadurch zur Aufrechterhaltung der Autotoleranz bei (63). Es gibt unterschiedliche Stadien der peripheren Toleranz. Durch weitere negative Signale können tolerante T-Zellen weiter tolerisiert werden, andererseits können sie durch geeignete Stimuli auch wieder reaktiviert werden (175). Klinisch interessant ist die Induktion antigenspezifischer, peripherer Toleranz bei Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder multipler Sklerose (55), weil sie die nebenwirkungsreiche, unspezifische, Immunsuppression (Cyclosporin A, FK506, Rapamycin, Glukokortikoide, Methotrexat) ablösen könnte. Die unspezifische Therapie gegen aktivierte T-Zellen ist deshalb problematisch, weil viele aktivierte T-Zellen bei der endogenen Autotoleranz beteiligt sind. Erstaunlicherweise kann man spezifische Toleranz sowohl durch Applikation übergroßer Antigen/Tolerogen-Mengen (Hochdosistoleranz = immunologische Paralyse; experimentell bei etwa 10^{-4} mol Ag / kg KG), als auch durch suboptimale Dosen (Niedrigdosistoleranz; experimentell bei etwa 10^{-8} mol Ag/ kg KG) induzieren (42).

Antigenprozessierung und -präsentation

Die humanen Leukozytenantigene (HLA) können in zwei Klassen eingeteilt werden (98, 99). Die HLA-Gene der Klasse I kodieren für die α -Polypeptidkette des Haupthistokompatibilitätskomplexes I (Major Histocompatibility Complex = MHC-I). Es existieren etwa 20 Klasse-I-Gene in der HLA-Region, wobei die 3 Gene HLA-A, -B und -C die Hauptrolle spielen (klassische Ia-Gene). Die β -Kette des dimeren MHC-I wird durch das β 2-Mikroglobulin-Gen kodiert. Die HLA-Gene der Klasse II (HLA-D) kodieren für die α - und β -Polypeptidkette des MHC-II. Zusätzlich wird noch die Familie (M, O, P, Q oder R) und als drittes (A oder B, entspricht α bzw. β) die Kette benannt. Die unterschiedlichen Gene werden mit arabischen Ziffern bezeichnet (HLA-DRB1*0401 steht für Allel 0401 des Gens 1, welches für die beta-Kette des Klasse-II-Gens der R-Familie kodiert). Während Klasse-I-Gene auf fast allen somatischen Zellen exprimiert werden, ist dies für Klasse-II-Gene nur bei speziellen Immunzellen (B-Zellen, aktivierte T-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen, epitheliale Thymuszellen) der Fall. Die Funktion der MHC-Moleküle ist die Präsentation prozessierter Peptide auf der Zelloberfläche. Die Erkennung durch den TCR eines T-Lymphozyten ist MHC-restringiert (216). Im Zellstoffwechsel fallen laufend defekte, beschädigte oder unbrauchbare Proteine an. Diese werden durch Ubiquitin markiert, mit Hilfe von Chaperonen entfaltet und in den Proteasomen proteolytisch fragmentiert. Die Fragmente bzw. die vollständig verdauten Aminosäuren werden ins Zytosol freigesetzt. Sogenannte TAPs (transporters associated with antigen processing) fangen kontinuierlich zytosolische Peptide ein und bilden einen Tunnel durch die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER). Auf der

luminalen Seite der ER-Membran werden die Peptide von MHC-I gebunden (welche nach ihrer Synthese am Ribosom ins ER aufgenommen werden). Dieser Prozess der MHC-Dimerisierung und Polypeptidbindung wird durch eine Vielzahl von Chaperonen (Calnexin, Calreticulin, ER-p57, Tapasin und andere) überwacht. Der fertige Komplex wird zur äußeren Zellmembran transportiert und in einer Rinne des MHC-I das Polypeptidantigen anderen Zellen präsentiert. Extrazelluläre Proteine werden durch Einschnürung der Zellmembran in Zellen des Immunsystems aufgenommen und das primäre Endosom verschmilzt mit einem primären Lysosom. Analog erfolgt die Aufnahme bei Phagozytose im Phagosom (39). Im entstandenen Endosom/Phagosom findet ein proteolytischer Abbau statt zu Peptiden und Aminosäuren. Nach der Proteinbiosynthese der MHC-II werden diese in Membranvesikeln verpackt, welche wiederum mit den peptidantigenbeladenen Endosomen/Phagosomen verschmelzen. Das exogene Peptid bindet in der Rinne des MHC-II und der gesamte Komplex wird auf die Zelloberfläche exportiert. Interferon- γ bindet an Regulatorregionen verschiedener Gene, so auch des HLA-Klasse-II-Gens und eines Gens, das spezielle Proteasomuntereinheiten kodiert. Daraus resultiert eine gesteigerte MHC-II-Expression und die Bildung spezieller Immunoproteasome, welche noch effektiver MHC-I mit Peptiden beladen können. Mehrere hunderttausend peptidbeladene MHC werden pro Zelle präsentiert, wobei die meisten Peptide wohl in etwa hundertfacher Kopie vorliegen. T-Zellrezeptoren von T-Lymphozyten können an die antigenbindende Rinne des MHC-Moleküls binden, wenn diese mit dem spezifischen Antigen beladen ist. Die CD4-CD8-Korezeptoren der T-Lymphozyten binden dabei an nicht-peptidbindende Anteile des MHC, CD4 an MHC-II und CD8 an MHC-I (50, 138). Werden ein paar hundert der mehr als 10.000 TCR eines Lymphozyten mit einem Liganden besetzt, wird die Zelle aktiviert, proliferiert und differenziert zu einer Effektorzelle (CTL, wenn Aktivierung einer CD8-T-Zelle durch antigenbeladenen MHC-I, oder Th, wenn Aktivierung einer CD4-T-Zelle durch antigenbeladenen MHC-II).

Effektorfunktionen von T-Lymphozyten

CD4-T-Lymphozyten sind vorwiegend zytokinsezernierende T-Helferzellen (88, 129, 195). Die Precursor-Helferzellen (Thp) produzieren nur IL-2, die naiven Th0-Zellen vor allem IL-2, -4, -5, -10 sowie IFN γ (und in geringem Maße IL-3, -6 und GM-CSF. Typ-1-Helferzellen (Th1) sezernieren vor allem IL-2 und IFN- γ , weniger TNF α/β und GM-CSF, aber nicht IL-4,-5 oder -6. Stark simplifiziert kann man sagen, dass diese Zytokine die zelluläre Immunität stimulieren, so die Aktivierung von Makrophagen (welche notwendig ist zur Zerstörung intrazellulärer, phagozytierter Organismen), die Stimulierung von Phagozyten, die Immunreaktion vom verzögerten Typ (DTH delayed type hypersensitivity) und die zellvermittelte Zytotoxizität durch CTL. Stimuliert wird die Th1-Differenzierung durch IL-12 und IFN γ . IL-12 ist ein charakteristisches Produkt aller APC

(154). Type-2-Helferzellen (Th2) hingegen sezernieren Interleukin-4, -5, -6, -10, -13, in geringeren Mengen TNF α / β und GM-CSF, nicht aber IL-2 und IFN γ und stimulieren damit die humorale Immunität (IL-4), sowie Mastzellen und Eosinophile (IL-5). Gefördert werden Th2 durch IL-10 und IL-4. Die subkutane Injektion polyklonaler Th1-Zellen lockt Makrophagen, die von Th2-Zellen Neutrophile an (133). Phänotypisch lassen sich bis heute Th-Unterklassen nicht unterscheiden, jedoch können genotypisch Unterschiede gefunden werden, die vielleicht in Zukunft eine zusätzliche Typisierung erlauben (120, 215). CD8-Lymphozyten sind vorwiegend zytotoxische T-Lymphozyten (CTL), welche Zellen lysieren, die fremde Peptidantigene mit dem MHC-I präsentieren. NK-Zellen hingegen sind nicht-MHC-restringierte Killerzellen ohne immunologisches Gedächtnis. Wurde eine Zelle als fremd oder entartet durch die Immunüberwachung (33, 44, 122) erkannt, gibt es verschiedene Effektormechanismen, um die Zielzelle zu zerstören (178). Zum Ersten durch antikörpervermittelte Komplementaktivierung, die zur Bildung eines Membranangriffskomplexes führt (MAC). Zum Zweiten durch die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC). Dabei binden antigenspezifische Antikörper (IgG) an die Zielzelle und aktivieren über den Fc-Rezeptoren verschiedene Immunzellen (NK-Zellen, T-Zellen, Neutrophile, Makrophagen) zur Lyse der Zielzelle. Von speziellem Interesse ist jedoch die zellvermittelte, MHC-restringierte Zytotoxizität durch CTL (178). Durch Interaktion über Adhäsionsmoleküle nähern sich Zielzelle (ICAM-1) und CTL ("inaktiviertes", niedrigaffines LFA-1) an. Erkennt die CTL mit ihrem TCR das mit dem MHC-I präsentierte Antigenpeptid, dann stimuliert der TCR/CD3-Komplex die Phosphokinase C-Kaskade (Hydrolyse von PIP₂ zu IP₃, welches Kalzium mobilisiert, und zu DAG, welches die Proteinkinase C aktiviert). Die aktivierte Proteinkinase C aktiviert durch Phosphorylierung der β -Kette das LFA-1 zu seiner hochaffinen Form. Dadurch wird die Annäherungsfunktion der aktivierten CTL gesteigert. Mindestens drei Effektormechanismen der CTL sind heute bekannt: (a) Degranulierung mit Freisetzung des Porenbildners Perforin und der Serinprotease Granzyme, welche zytoplasmatische Proteine lysiert und Kaspasen, und damit die Apoptose, aktiviert. (b) Die Apoptoseinduktion durch Ligation des Fas-Rezeptors der Zielzelle und (c) durch Freisetzung von Toxinmediatoren (toxic mediators). Andererseits gibt es auch Helferzellen, sowohl Th1- als auch Th2-Zellen, die MHC-II-positive Zellen zu lysieren vermögen. Dabei ist der Lysemechanismus der Th2 dem der CTL ähnlich, der von Th1 davon verschieden, aber noch unbekannt. Diese Fähigkeit CD4+ T-Zellen zur MHC-II-restringierten Lyse spielt für die Beendigung einer Immunreaktion durch Eliminierung der APC eine wichtige Rolle (63).

Kooperation von T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen (APC)

Die Interaktion zwischen T-Zelle und APC gliedert sich in Adhäsion (z.B. LFA-1/ICAM-1), Erkennung (TCR/MHC) und Kostimulation (z.B. CD28/B7) (17, 39). Die Kostimulation gibt dabei quantitative und qualitative "Informationen" an die T-Zelle weiter. So interagieren B-Zellen über

CD40-L mit CD40 auf v.a. Th2-Zellen oder über B7 mit CD28/CTLA-4 v.a. auf Th0-Zellen. Makrophagen hingegen präsentieren v.a. an Th1-Zellen (177). Alternativ zu MHC-II können APC Antigene auch mit CD1 präsentieren. Für eine erfolgreiche Induktion von CTL ist die effektive Kooperation zwischen drei verschiedenen Zelltypen (Th, CTL und APC) nötig (73). Dabei spielen IL-2 und IFN γ eine wichtige Rolle auf humoraler Ebene. Entscheidend ist, dass die zytokinproduzierende T-Helferzelle und die antigenspezifische CTL gleichzeitig an der selben APC andocken, im Sinne einer "epitope linkage". Die Drei-Signale-Hypothese beschreibt, dass (a) die antigenspezifische, aktivierte T-Helferzelle IL-2 sezerniert, dass (b) die antigenspezifische, aktivierte CTL IFN γ -Rezeptoren exprimiert, und dass (c) das IL-2 der Th die Sekretion von IFN γ durch die CTL induziert. Dies führt zu einer autokrinen Aktivierung der antigenspezifischen CTL durch IFN γ .

1.3 Die gemischte Leukozytenreaktion (MLR: mixed leukocyte reaction)

Historisch war es ein wichtiger Schritt, als man 1960 entdeckte, dass periphere Leukozyten in Kultur durch Koinkubation mit Leukozyten eines anderen Spenders zur Mitose stimuliert werden können, und dass dieser Effekt bei monozygoten Zwillingen ausblieb (187). Fritz Bach und Kurt Hirschhorn beschrieben 1964 erstmals den Zweiweg-MLC zur Evaluation der Spenderkompatibilität vor Organspenden (10). Zwei Jahre später veröffentlichte Fritz Bach die Einweg-MLR mit Inaktivierung der Stimulatorzellen durch Mitomycin C (11). Wie sich später zeigte, waren es T-Zellen, die dort proliferierten, und das um so mehr, je verschiedener die MHC-Moleküle der beiden Spender waren. Wird die Zellteilung der einen Spenderzellen, z.B. durch Mitomycin C oder Bestrahlung gehemmt (Stimulatorzellen), dann können nur noch die Zellen des anderen Spenders proliferieren (sogn. Responderzellen) und die gemischte Leukozytenkultur wird unidirektional (Einweg-MLR). Das Maximum der Reaktion ist bei Verwendung niedriger Responderzellkonzentrationen (250.000/ml) am Tag 6 oder später, bei hohen Konzentrationen (1 Mio Zellen/ml) einige Tage früher erreicht. Ab etwa dem 7. Tag kommt es zu einer signifikanten Aktivität von Suppressorzellen (53). In der primären MLR werden nur solche Lymphozyten aktiviert, die den allogenen MHC als Antigen erkennen. Dies sind etwa 2-3% aller Lymphozyten in Kultur, was sehr hoch ist im Vergleich zur T-Zellprecursorfrequenz für nicht-MHC-Antigene (< 1:10000 für virale Antigene). Unterscheiden sich die beiden Spender nur im MHC der Klasse II, dann proliferieren v.a. CD4+ MHC-II-spezifische, zytokinproduzierende Zellen und nur wenige CD4+ MHC-II-spezifische CTL. Unterscheiden sie sich nur im MHC der Klasse I, dann proliferieren vorwiegend CD8+ MHC-I-spezifische CTL und nur wenige CD8+ MHC-I-spezifische Helferzellen (2). Die MHC-II-induzierte Immunreaktion ist stärker als die gegen MHC der Klasse I, weswegen früher die CD4+ T-Helferzellen als primärstimulierte Responder-T-Lymphozyten

bezeichnet wurden, weil sie eine sekundäre MLR auslösen, die heftiger und schneller abläuft (Proliferationsmaximum schon am 2.-3. Tag) als die primäre MLR. Auch bei Koinkubation autologer Leukozyten kommt es zu einer geringen Proliferation, deren Genese, inkomplette Autotoleranz versus Mediumartefakte, noch immer Gegenstand kontroverser Diskussionen ist. Kurz zusammengefasst, ist die MLR ein *in vitro* Modell der Erkennung fremder MHC-Genprodukte durch Lymphozyten (2). Die Proliferation der CD4⁺ Lymphozyten quantifiziert man dabei am günstigsten in der zweiten (sekundären), heftigeren MLR mit frischen Stimulatorzellen. Üblicherweise mit der ³H-Thymidineinbaumethode oder einem äquivalenten, nicht radioaktiven Test. Die Differenzierung der CD8⁺ Zellen zu zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) kann man durch Bestimmung der zellvermittelten Lyse von Zielzellen (B-Lymphozyten oder Lymphozyten nach Blastentransformation) quantifizieren. Blasten heißen die transformierten Lymphozyten, weil sie größer sind als unstimulierte Lymphozyten. Sie haben mehr Zytoplasma mit reichlich RNA und aufgelockertes Kernchromatin (43). Blastentransformation kann man durch Lektinmitogene (PHA, ConA), durch Superantigene (z.B. anti-CD3-Antikörper) oder APC-Präsentation von Antigenen erreichen (97).

1.4 Lektine

Lektine (legere: nehmen) (117, 180) sind Zellen agglutinierende Proteine nicht-immunologischer Herkunft, die mit hoher Spezifität und reversibel Mono- und Oligosaccharide binden, sowie Polysaccharide und Glykoproteine präzipitieren können. Die agglutinierenden und präzipitierenden Eigenschaften ähneln denen von Antikörpern. Wichtiger Unterschied zwischen Antikörpern und Lektinen ist, dass Lektine leicht durch Antagonisierung mit Zuckern wieder ablösbar sind, und die Zellen volle Funktion behalten. Zudem werden Lektine nicht nur durch menschliche und tierische, sondern durch Zellen von allen Klassen lebender Organismen produziert. Biologische Aufgaben der Lektine sind die Entfernung von Glykoproteinen aus der Zirkulation, die Adhäsion infektiöser Agentien, die Rekrutierung von Leukozyten und die Zell-Zell-Interaktion im Immunsystem. Lektine stimulieren etwa 70-80% der peripheren Lymphozyten unabhängig von der Antigenespezifität (Antigene stimulieren etwa 0,02%). Nach der Entdeckung der Lektine 1888 wurde das Hauptaugenmerk auf deren Fähigkeit zur Bindung und damit zur Klassifizierung von Blutgruppenantigenen gerichtet. 1960 berichtete Nowell (140) erstmals über die mitogenen Eigenschaften von PHA und zeigte, dass ruhende Lymphozyten keine enddifferenzierten Zellen, sondern sehr wohl proliferationsfähig sind. 1976 entdeckte Gallo Interleukin-2 im Kulturmedium PHA-stimulierter Lymphozyten (41). Sharon nutzte Lektinrezeptoren als Lymphozyten-Oberflächenmarker. Lektine sind oligomere Proteine. Die größte und am besten untersuchte Familie ist die der Leguminose-Lektine, zu der Concanavalin A (ConA; aus der Jackbean (*Canavalia*

ensiformis)), Phytohämagglutinin (PHA; aus der Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris*)), sowie Lektine der Sojabohne (SBA) und der Erdnuss (PNA) gehören. Leguminose-Lektine bestehen aus zwei oder vier identischen 25-30 kD-Untereinheiten, von denen jede eine eigene Kohlenhydratbindungsstelle identischer Spezifität besitzt. Prominente Ausnahme ist das PHA, welches aus fünf tetrameren Glykoproteinen besteht mit Zusammensetzung jedes Glykoproteins aus 2 verschiedenen Untereinheiten: E oder L. E4 (E-PHA) ist ein potentes Hämagglutinin, L4 (L-PHA) ein Leukoagglutinin mit mitogenen Eigenschaften. Die gemischten Formen (z.B. L2E2) sind weniger wirksam. PHA-P ist die Proteinform des Lektins vor Auftrennung in L- und E-Formen. Lektine werden nach ihrer Spezifität für verschiedene Kohlenhydrate klassifiziert: Mannose, Galaktose, N-Acetylglucosamin, L-Fucose, N-Acetyl-Neuraminsäure. Die Lektine innerhalb einer Gruppe können sich beträchtlich bezüglich ihrer Spezifität unterscheiden (verschiedene Zuckerderivate, Monosaccharide versus Di-, Tri-, Tetrasaccharide). Die Bindung zwischen den Lektin-Proteinen und den Zuckern erfolgt durch Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen, sowie wahrscheinlich über Koordination mit Metallionen. Innerhalb einer Familie sind die Bindungen strukturell einheitlich, so in der Leguminose-Familie (unabhängig von der Spezifität) durch drei Bindungsstellen, ein Aspartatrest, ein Asparaginrest und eine aromatische Aminosäure. Im Gegensatz zu PWN (pokeweed mitogen, das B- und T-Zellen stimuliert) gelten PHA und ConA als spezielle T-Zellstimulatoren. Mitogene Lektine sind polyklonale Aktivatoren, die Lymphozyten, inklusive Gedächtniszellen, unabhängig von der Antigen-spezifität stimulieren. Die T-Zellen proliferieren aber nur, wenn gleichzeitig Monozyten als akzessorische Zellen anwesend sind. B-Zellen proliferieren nicht (8, 41, 59). PHA bindet an einen Bestandteil des CD3-Komplex und an CD2 (Schafserythrozytenrezeptor). Weitere Bindungsstellen existieren, sind aber nicht bekannt. Wahrscheinlich ist es ein "cross-linking" zwischen CD3 und anderen T-Zellmarkern (CD2, CD4, CD8, CD11a/CD18, MHC-I), welcher für die Aktivierung speziell der T-Zellen verantwortlich ist. Die Rolle der notwendigen akzessorischen Zellen ist unklar. Einerseits könnte es zum "cross-link" zwischen Monozyt und T-Zelle kommen, wodurch die T-Zellen im Microenvironment des Makrophagen (IL-1, TNF α) wären. Andererseits ist anzunehmen, dass Mechanismen wie bei Antikörpern, nämlich die Bildung einer Art zellulären Matrix, eine Rolle spielen. In Anwesenheit mitogener Lektine sind CTL in der Lage, eine Großzahl antigenetisch unterschiedlicher Zielzellen zu lysieren, was als lektinabhängige Zytotoxizität bezeichnet wird (analog zur antigenabhängigen Zytotoxizität). Zu diesem Phänomen gehört auch die Tumorzell-Lyse durch Makrophagen (auch induzierbar durch Antikörper). ConA-aktivierte, nicht jedoch PHA-aktivierte, CD4⁺ T-Zellen supprimieren die Ig-Bildung durch B-Zellen (185), dies jedoch nicht direkt, sondern nur in Anwesenheit von CD8⁺ T-Zellen. Bei ConA-Aktivierung entstehen also CD4⁺ Suppressor-Inducer-Zellen, die CD8⁺ Suppressor-Effektor-Zellen induzieren können, welche wiederum die Ig-Bildung

autologer B-Zellen hemmen. Dennoch haben die ConA-aktivierten CD4⁺ T-Zellen auch potente Helferaktivität für autologe B-Lymphozyten. Somit findet man in der Population der ConA-aktivierten T-Zellen mindestens zwei Subpopulationen; die Suppressor-Inducer-Zellen und die Helfer-Inducer-Zellen, welche sich auch phänotypisch unterscheiden (CD45RA bzw. CDw29) (43). Hilfe und Suppression beziehen sich dabei auf die Fähigkeit zur Modulation einer B-Zellantwort. ConA stimuliert vorwiegend die CD45RA-Expression auf CD4-Lymphozyten und verschiebt damit das Gleichgewicht zwischen CD45RA- und CDw29-Expression zugunsten der Suppressor-Inducer-Zellen. Bei PHA hingegen kann man eine Abhängigkeit von der T-Zellkonzentration beobachten (155). Bei (zunächst) geringer Zelldichte in der Kultur zeigt sich bei PHA-Stimulation eine starke Helferfunktion. Bei hoher Zellkonzentration verlassen die meisten T-Zellen den proliferativen Zellzyklus und entwickeln Suppressorfunktion. Wahrscheinlich ist dies ein natürliches Prinzip, das essentiell für eine physiologische Regulation der Immunantwort und auf eine Großzahl verschiedener Immunreaktionen anwendbar ist. Hauptaufgabe der Lektine ist die Zellerkennung, sowie die Erkennung von Viren (Influenzavirus-Hämagglutinin spezifisch für N-Acetylneuraminsäure) und Bakterien. So kann es z.B. durch Bindung der Pathogene an Makrophagen und andere Immunzellen des Wirtes zur Initiierung einer Immunreaktion ohne klassische Opsonisierung kommen. In Anlehnung zur Opsonophagozytose nennt man diesen Prozeß Lektinophagozytose. Andererseits finden pathogene Mikroorganismen auf diesem Wege ihre Zielzellen. Auch konnte die Adhäsionsfunktion bei der Metastasierung menschlicher Tumoren nachgewiesen werden. Überdies gibt es lösliche Lektine, die - auf Mikroorganismen gebunden - Komplement aktivieren und damit die Lyse einleiten. Mehrere dieser "nicht-immunologischen" Abwehrstrategien gegen Mikroorganismen sind erforscht.

1.5. Tumormimmunologie

Drei wichtige Bedingungen stellt die theoretische Immunologie an onkologische Therapieverfahren mit Immunzellen: (a) Die Existenz von Effektorzellen, die eine Antitumorantwort vermitteln können, (b) die Antigenität und (c) die Immunogenität des Tumors. Sowohl nicht MHC-restringierte Effektorzellen, wie NK-Zellen oder LAK-Zellen, als auch MHC-restringierte CD4⁺ und CD8⁺ tumorreaktive T-Zellen können im Tierexperiment syngene Tumoren erkennen und zerstören (75, 78, 115, 132). Da jedoch die Anwendung der nicht MHC-restringierten Effektorzellen in der Klinik enttäuscht hat (148, 166, 196), liegt heute das Hauptaugenmerk auf der Verwendung MHC-restringierter T-Zellen. Zwar können CD8⁺ tumorspezifische CTLs via adoptiven Zelltransfer eine Tumoreradikation induzieren, doch ist für eine anhaltende Tumoreradikation die zusätzliche Gabe von CD4⁺ T-Zellen (oder IL-2) notwendig (76). Bei MHC-II-positiven Tumoren (Bsp. B-Zell-Lymphome) können CD4⁺ Zellen sogar direkt die Tumorzellen

lysieren (210). Tumorassoziierte Antigene (TAA) heißen tumorspezifische Antigene (TSA), wenn sie nur auf Tumorzellen vorkommen (44). Die Große Gruppe von TAA kann in verschiedene Gruppen eingeteilt werden (77): (A) Virale Genprodukte bei virusassoziierten Tumoren (Bsp. E6- und E7-Protein beim HPV-assoziierten Zervixkarzinom, LMP-1 und EBNA-1 beim EBV-assoziierten Hodgkin-Lymphom), (B) Produkte von Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen (Bsp. p21, ras, p53, bcr/abl bei verschiedenen Tumoren), (C) Überexpression normaler Genprodukte (Bsp. HER-2/neu bei verschiedenen Tumoren), (D) normale gewebespezifische Genprodukte (Bsp. melan A, gp100 beim malignen Melanom), (E) normale Genprodukte, die in normalen Geweben nicht mehr oder kaum mehr exprimiert werden (Bsp. MAGE-1, MAGE-3 beim malignen Melanom) oder (F) Idiotypen (Bsp. Bei B-Lymphomen). Da zumindest die unter (C)-(E) aufgeführten Genprodukte eigentlich Autoantigene sind, stellt sich die Frage, warum das Immunsystem diese Antigene dennoch erkennen kann. Zum einen beinhaltet das T-Zellrepertoire autoreaktive T-Zellen (57), die im Sinne der peripheren Toleranz durch spezifische Suppressorzellen kontrolliert werden. Auf der anderen Seite gibt es Hinweise, dass der Körper gegen eine Großzahl von Selbstantigenen gar nicht tolerant ist, und dass diese Selbstantigene dann angegriffen werden, wenn es zur Passage des Antigens durch Lymphknoten oder Milz kommt (217). Zudem beruht ein wichtiger Teil der Methoden zur Isolierung von Tumorantigenen auf der Selektion tumorreaktiver CTL aus Patientenlymphozyten (77). Ein Hauptgrund, warum tumorreaktive T-Zellen den antigentragenden Tumor nicht angreifen, ist die mangelnde Immunogenität durch Fehlen kostimulatorischer Moleküle auf dem Tumor. Dies führt zur tumorspezifischen Anergie des Immunsystems, eine fatale Situation (92, 131). Doch zeigen Experimente, dass man diese tumorspezifische Anergie durchbrechen kann. So kann man ex vivo die anergen Zellen mit IL-2 reaktivieren (81, 176) und, was noch von viel größerer Bedeutung ist, in vivo durch suffiziente Antigenpräsentation (z.B. durch Reinokulation gentransfizierter Tumorzellen, die Zytokine sezernieren oder kostimulatorische Moleküle exprimieren) eine systemische Antitumorantwort induzieren. Auch gegen im Körper diffus verteilte, insuffizient antigenpräsentierende Tumorzellen (37, 51, 64, 157, 201). Ein fatales Problem der Tumorimmunologie ist die malignomassoziierte, spezifische und unspezifische Immunsuppression (7). Zum einen haben immuninkompetente Patienten, z.B. bei therapeutischer Immunsuppression, primären Immundefizienzen oder beim AIDS, ein erhöhtes Malignomrisiko (152), interpretierbar als Permission nach Tumorinitiation und -promotion. Zum anderen scheinen eine Großzahl von Beobachtungen zu belegen, dass eine natürlich entstandene Krebserkrankung zur Immunsuppression führt (153). Diese ist abhängig von der Tumorentität und von der Tumormasse (156). Quantifizierbar sind erhöhte Serumspiegel von löslichem IL-2-R, löslichem CD8-Antigen, sowie erniedrigter Spiegel von IL-2, eine relative Lymphopenie und eine verminderte T4/T8-Ratio

durch Abfall der T-Helferzellen und Vermehrung der T-Suppressorzellen (16, 49, 124, 145, 168, 189). Erhöhung von Neopterin und IL-10 legen eine kausale Rolle von Makrophagen und Th2-Zellen nahe (118). Zusätzlich zur relativen Lymphopenie sind Zahl und Funktion von dendritischen Zellen (DCs) dramatisch vermindert und es kommt zur Akkumulation unreifer DCs im peripheren Blut (6, 119). Den Suppressormakrophagen mit verminderter HLA-DR-Expression und Zytokinsekretion sowie der gestiegenen Zahl unreifer DC im peripheren Blut schreibt man große Bedeutung zu, da beide Zelltypen in vitro Proliferationstests supprimieren können und nach ihrer Entfernung aus der peripheren Leukozytenpopulation die Suppression wieder aufgehoben wird (6, 87, 214). Tragischer Weise haben sich Patienten mit supprimierter, zellulärer Immunitätslage als schlechte Kandidaten für tumorimmunologische Therapieverfahren erwiesen (202). Auf der anderen Seite führt die Verbesserung der Immunitätslage zur Prognoseverbesserung (211). Eine effektive zelluläre Immuntherapie gegen Krebs muss sich demnach gegen den antigenen und immunogenen Tumor und gegen die tumorantigenspezifischen Suppressormechanismen/-zellen richten (42, 106, 174), sowie die vorhandenen tumorantigenspezifischen CTLs und T-Helferzellen immunopotenzieren.

1.6 Immunsuppression - Immunpotenzierung - Kontrasuppression

Geschichtliche Definitionen

Der Begriff der Immunsuppression wird heute in vielen Zusammenhängen benutzt, v.a. im Sinne der therapeutischen Immunsuppression bei Autoimmunerkrankungen und allogenen Organtransplantationen (30). Doch seit der Geburt der Immunologie sind auch die Phänomene bekannt, die Immunfunktionen unterdrücken, und diese Suppression ist ein wichtiger und essentieller Aspekt in der Homöostase des Immunsystems (209); im Sinne der Eigentoleranz gegen Autoantigene, im Sinne der Beendigung von Immunreaktionen oder krankhaft bei Immundefizienzen. Die Immunpotenzierung als Gegenteil dieser Immunsuppression beschäftigte seit je her die Immunologen. So sind heute viele Verfahren zur Immunpotenzierung bekannt (58); sowohl spezifische: aktiv (z.B. klassische Impfung), passiv (z.B. Antikörpertherapie), adoptiv (z.B. TIL); als auch unspezifische: aktiv (z.B. Zytokintherapie), passiv (z.B. Plasmapherese) oder adoptiv (z.B. LAK). Unter Kontrasuppression versteht man eine immunregulatorische Aktivität, die Immunantworten durch Interferenz mit den suppressiven Einflüssen erleichtert ohne direkte Verstärkung der Immunreaktion (74). Dabei wird diesen nur funktionell, nicht morphologisch definierten Zellen die Fähigkeit zugesprochen, eine bestehende antigenspezifische Toleranz zu durchbrechen. Obwohl die Phänomene der Immunsuppression und Kontrasuppression schon lang bekannt sind und deren funktionelle Existenz außer Frage steht, fällt bis heute eine genaue Zuordnung zu speziellen Zellen oder humoralen Faktoren schwer. Aus vielen Experimenten muss

man schließen, dass es neben den Suppressorzellen auch Suppressionsinduktionszellen gibt, die selbst nicht suppressiv sind, aber Suppressorzellen aktivieren können. Gleiches gilt für Kontrasuppressorzellen. Die Komponenten der zellulären und humoralen (Kontra-) Suppression muss man in unspezifische und spezifische unterteilen. So hemmen z.B. suppressive Zytokine antigenunspezifisch alle Zellen, die den entsprechenden Rezeptor tragen, und Suppressormakrophagen wirken antigenunspezifisch durch Mediatoren (z.B. NO, ROI, PG) supprimierend auf T-Zellen und DC (73).

Charakterisierung von Suppressorzellen

Ganz allgemein sind Suppressorzellen lymphatische Zellen, die die Immunreaktivität anderer Zellen - spezifisch oder unspezifisch - unterdrücken können (41). Trotz jahrzehntelanger Forschung müssen wir uns mit dieser allgemeinen Definition begnügen. Doch haben schon frühe Versuche gezeigt, dass die zellulären Träger der spezifischen Suppression v.a. T-Zellen sind (Ts: antigenspezifische T Suppressorzellen). In der Vergangenheit gab es viele Hinweise, dass es sich dabei um CD8+ Zellen handelt. Vor allem neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass auch die meisten Helferzellen Suppressorfunktionen entwickeln können. Wahrscheinlich sind Suppressor-T-Zellen nicht eine einzelne bestimmte Zellpopulation, sondern bestehen aus verschiedenen Lymphozyten, die die Immunantwort auf verschiedene Arten unterdrücken können (3). Gerade die Entdeckung der Diversität von Th1- und Th2-Zellen machte offensichtlich, wie verschiedene Subpopulationen unterschiedliche Sub-Immunreaktionen hemmen und andere aktivieren können (209). So weiß man heute, dass die durch kontinuierliche Exposition von Antigen induzierte Suppression chronisch aktivierter T-Zellen durch antigenspezifische CD4+ Th2-Zellen hervorgerufen wird (79). Wahrscheinlich führt jede Reaktivierung von Gedächtniszellen zunächst zur Aktivierung und Bildung von Th2-Zellen (46). Ebenfalls konnte für die orale Toleranzinduktion ein Th2-Shift nachgewiesen werden, der durch Anti-IL-4-Antikörper zu verhindern ist (90). Auch konnte das Th-Produkt TGF β als potenter Hemmer von B- und T-Zellproliferation identifiziert werden. Aus vielen Versuchen ist bekannt, dass durch starke Aktivierung von Lymphozyten, durch Mitogene (z.B. ConA) oder Alloantigene (in einer MLR), eine unspezifische Suppression induziert werden kann. Diese überaktivierten Zellen mit sehr hoher Rezeptordichte für proinflammatorische Signale können wahrscheinlich Wachstums- und Differenzierungsfaktoren aus dem Medium absorbieren. Zudem beobachtet man lösliche Zytokinrezeptoren die klassisch kompetitiv hemmen. Auch können zytotoxische T-Zellen (CD4+ oder CD8+) durch Lyse der fremdantigenpräsentierenden Zelle den Stimulus für die laufende Immunreaktion eliminieren. Weitere unspezifische Suppressoren sind Suppressormakrophagen und die sogenannten natürlichen Suppressorzellen, die wahrscheinlich aus der NK-Zelllinie stammen. Gerade aber für therapeutische Ansätze ist der modulierende Eingriff in die antigenspezifische Suppression/Immunopotenzenzierung

interessant, weil jede unspezifische Über- oder Unteraktivierung des Immunsystems den Organismus vital bedroht.

Antigenspezifische Suppressorzellen (Ts) und der lösliche Suppressorfaktor TsF

Gershon demonstrierte 1971 erstmals die Existenz antigenspezifischer Suppressor-T-Zellen (Ts). Ts können - wie B-Zellen - lösliche Antigene ohne Präsentation durch eine APC erkennen (209). Bei Mäusen konnte mittels Antikörper (984D4.6.2) eine CD8⁺ MHC-I-restringierte T-Zell-Subpopulation als Ts-Suppressorzelle identifiziert werden. Die antigenspezifische T-Zell-vermittelte Immunsuppression kann von einem Individuum auf ein anderes übertragen werden (a) durch Übertragung der Suppressorzellen oder (b) durch die von diesen Zellen sezernierten, löslichen Suppressorfaktoren (TsF). Diesem TsF widmeten sich viele Forscher in der folgenden Dekade (88). Nach Identifizierung des TCR auf Helfer- und zytotoxischen T-Zellen drängte sich die Frage nach dem Zusammenhang mit der Antigenpezifität der Ts auf. Aufgrund methodischer Probleme war diese Frage viele Jahre ungeklärt geblieben. Doch muss man heute davon ausgehen, dass Ts TCR exprimieren, und dass Ts TsF freisetzen, die identische Epitopspezifität und eine mit dem TCR gemeinsame Antigenkomponente besitzen. Die TsF sind höchstwahrscheinlich Derivate des TCR oder Konjugate des TCR mit einem Zytokin, wie zum Beispiel GIF (glycosylation inhibiting factor) (209). Wenn nun TsF ein TCR-Derivat ist, dann ist TsF spezifisch für das prozessierte, mit MHC assoziierte Antigenpeptid. Da bis heute kein kodierender Genort für TsF identifiziert werden konnte, muss man annehmen, dass TsF durch alternatives Splicing der TCR-Gene oder durch posttranslationale Modifikation der TCR-Kette(n) entsteht. Im Falle von 55-kD-GIF konnte alternatives Splicing ausgeschlossen werden. Heute geht man von folgendem Mechanismus der posttranslationalen Modifikation zur Bildung von TsF aus: Durch Antigenstimulation der Ts kommt es zur Translokation von zytosolischem GIF in das endoplasmatische Retikulum (ER) und dort bindet GIF die neu synthetisierte TCR- α -Kette. Dieses Konjugat verhindert die ER-Degradation der TCR- α -Kette und damit die Assoziation des CD3-Komplex mit dem TCR. Das Konjugat verbleibt also im ER und es kommt zur Sekretion des GIF-TCR-Konjugats durch den konstitutiven Sekretions-Pathway. Durch Modifikationen in ER/Golgi in Form des Konjugats wird GIF in seine bioaktive Form umgewandelt. Zusammengefasst sezernieren antigenstimulierte Ts antigenspezifische, bioaktive GIF als GIF-TCR-Konjugat. Durch GIF gelingt die Löslichkeit des TCR. Die Bindung von GIF an seinen hochaffinen Rezeptor auf antigengeprägten T- und B-Zellen werden die antigeninduzierte Differenzierung dieser B-Zellen zur IgG1/IgE-Synthese sowie Endozytose und Antigenprozessierung verhindert. Durch die Konjugation mit dem TCR wird diese Funktion selektiv für antigenspezifische Zellen. Die Bildung eines löslichen, antigenspezifischen Faktors durch die Ts ist nach heutigem Erkenntnisstand einzigartig. Zwar produzieren auch Th GIF, jedoch kann man experimentell weder die ER-Translokation noch

die Konjugatbildung zeigen. Transfiziert man Th mit Pro-CT-GIF cDNA zur ER-Translokation des Fusionsproteins, dann können auch Th TCR-GIF-Konjugate bilden. Es muss jedoch erwähnt werden, dass Th in Anwesenheit von bioaktivem GIF selbst die Fähigkeit erlangen, antigenspezifische GIF nach Antigenstimulation zu bilden. Da antigengeprägte Th einen hochaffinen GIF-Rezeptor exprimieren, muss man postulieren, dass die Bindung bioaktiven GIF an diesen GIF-Rezeptor die Translokation von zytosolischen GIF in subzelluläre Organellen zur posttranslationalen Modifikation und damit zur Überführung in die bioaktive Form bewirkt. Obwohl es nicht bewiesen ist, geht man heute davon aus, dass diese bioaktive GIF-Form ein GIF-TCR Konjugat ist. Ist dies der Fall, dann sind Ts ein spezieller Phänotyp von T-Helferzellen. Dies entspricht den Beobachtungen von Kuchroo (1990), dass es zwischen Ts1 und Th bezüglich Oberflächenmarkern und Interleukinproduktion keine Unterschiede gibt. Ebenfalls ginge es einher mit den Versuchen von Green (1987), der die Produktion von TsF1 durch den Th Zellklon D10G4.1 nach Stimulation mit antigengepulsten, UV-bestrahlten Makrophagen bewies (209).

1.7 Fragestellung dieser Arbeit

Adoptive, zelluläre Immuntherapien haben hohe Aktualität, insbesondere in der Onkologie. Spezifische und unspezifische Immunsuppression in vivo (im Patienten) und ex vivo (im Zellpräparat) erschweren den durchgreifenden Erfolg dieser Therapien erheblich. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe haben neue Wege zur zellulären Therapie als Intervention gegen Immundysregulation aufgezeigt. Anspruch der vorliegenden Arbeit ist es, in vitro eine experimentelle Methode zu etablieren, die es erlauben soll, immunmodulierende Substanzen auf deren potentielle Wirksamkeit in einem Vakzinesystem zu testen. Ziel war es, die immunologische Potenz als funktionelles Phänomen der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) zu erfassen. Als relevante, abhängige Variablen der Beobachtungseinheit wurden die Proliferationstendenz auf allogene und mitogene Stimulation sowie die zellvermittelte Zytotoxizität definiert. Durch pharmakologische Manipulation der Regulatorzellfunktion sollten in dem in vitro Modell durch adoptiven Transfer die Immunreaktion einer MLR positiv beeinflusst werden. Im ersten Abschnitt sollen methodische Einzelheiten des neuen Versuchssystems charakterisiert werden. Der zweite Abschnitt widmet sich der Testung verschiedener Substanzen in dem etablierten Versuchssystem, von denen bekannt oder anzunehmen ist, dass sie Immunreaktionen modulieren.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien (alphabetisch)

Ein detailliertes Bezugsquellenverzeichnis befindet sich im Anhang (8.1., Seite A1) dieser Arbeit.

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

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

Chemikalien: Antibiotic Antimycotic Solution (Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B, Sigma), Cimetidin (RBI), Concanavalin A (Sigma), Diclofenac (RBI), Dimethylsulfoxid (Merck), L-Glutamin (Biochrom), nichtessentielle Aminosäuren (Biochrom), DMPX (RBI), Gentamicin (Sigma), Indomethacin (RBI), Molsidomin (Sigma), Phytohämagglutinin (RBI), Propranolol (RBI), Pyruvat (Biochrom), Ranitidin (RBI), Reagenz für Proliferationstest (Cell Proliferation Reagent WST-1, Boehringer), Reagenz für Zytotoxizitätstest (Cytotoxicity Detection Kit LDH, Boehringer), RPMI 1640 (Sigma), RPMI 1640 ohne Phenolrot (Sigma), stabiles Glutamin (N-Ac-L-Ala-L-Gln, Biochrom), Tolbutamid (RBI), Sulpirid (RBI), Trennmedium zur Dichtezentrifugation (Accuspin-Histopaque®-1077, Sigma), Triton® X-100 (Sigma). Falls nicht anders durch den Hersteller vorgegeben, wurden die Chemikalien in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst, im Wasserbad auf 37°C erwärmt und mittels steriler Membranfilter (Porengröße 0,20 µm) steril filtriert (A2)

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

2.2. Methoden

2.2.1 Zellkultur

Suspensionskultur mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

Mittels Dichtezentrifugation in Ficoll-Histopaque-Technik wurden aus den Buffy Coats (Blutleukozyten) die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) verschiedener Spender

gewonnen (128, 183), zweifach mit Kulturmedium gewaschen und schließlich in Kulturmedium suspendiert (2×10^7 Zellen/ml). Die Anzahl vitaler Zellen pro Milliliter wurde nach Trypanblaufärbung der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer jeweils zweifach bestimmt (126, 150). In je ein Einfrier-Röhrchen wurden 1 ml der Zellsuspension und 1 ml der Gefrierlösung, bestehend aus 16 Teilen FKS, 5 Teilen Dimethylsulfoxid und 4 Teilen RPMI 1640, pipettiert, dann in Styropor verpackt möglichst langsam in einem -70°C -Gefrierschrank eingefroren (149), um den Bedingungen des kontrollierten Tieffrierens gerecht zu werden (198). Zum raschen Auftauen wurden die Röhrchen in ein Wasserbad (37°C) gebracht und sofort nach Verflüssigung die aufgetaute Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt, mit Medium verdünnt, zweimal gewaschen, um das toxische DMSO zu entfernen, und schließlich wieder in Kulturmedium (Tabelle 1) suspendiert. Dieses Standardmedium beinhaltet Phenolrot, welches eine Extinktion im Messbereich des Formazan bei 450 nm verursacht (Abb.1.a), sowie fötales Kälberserum (FKS), welches eine nicht definierte Laktatdehydrogenaseaktivität besitzt (Abb.1.b). Deshalb musste nach Ablauf der Inkubationszeit der gemischten Leukozytenkultur (MLR) und vor Quantifizierung der stattgehabten Proliferation und der zellvermittelten Zytotoxizität das Standardmedium gegen ein FKS- und Phenolrot-freies Medium ausgetauscht werden (Tabelle 1). Der Zusatz von Antibiotika entspricht internationalen Empfehlungen (198).

Tabelle 1. Pipettierschema zur Herstellung der verwendeten Kulturmedien. Hitzeinaktivierung des fötalen Kälberserums (FKS) im Wasserbad bei 56°C für 30 Minuten. Da RPMI 1640 ohne Phenolrot kein L-Glutamin enthält, wurde dieses in entsprechender Menge substituiert.

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

Die Inkubation der Zellkulturen erfolgte im Brutschrank bei 37°C mit 5% CO_2 . Nach Behandlung der mononukleären Zellen mit den Testsubstanzen mussten diese aus dem Überstand entfernt werden, die Zellen "gewaschen" werden. Hierzu wurden die Zellsuspensionen mit Hilfe einer Transferpipette in ein großes Zentrifugenröhrchen überführt, dieses ad 50 ml mit Medium gefüllt, bei 400g 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Röhrchen wieder ad 50 ml mit Medium gefüllt und die Zellen mittels Transferpipette vorsichtig resuspendiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt und anschließend die Zellkonzentration mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Falls

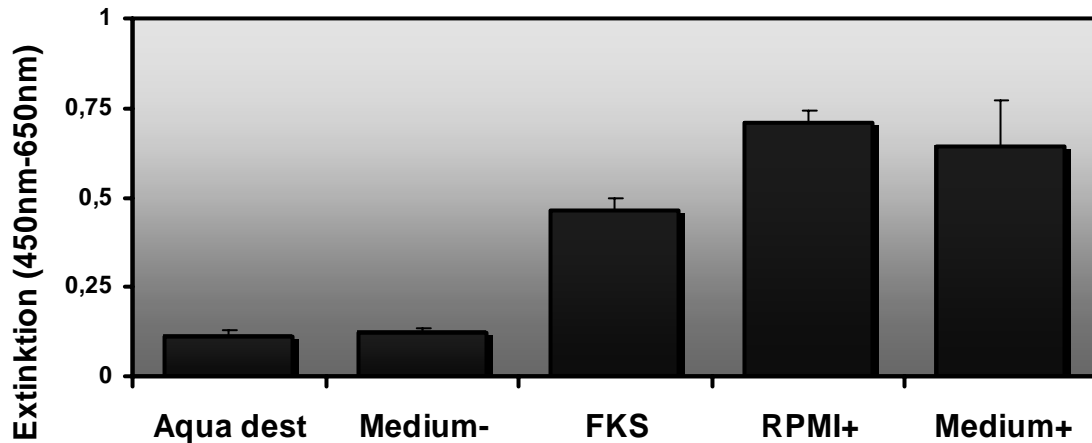


Abb.1a. Phenolrot und fetales Kälberserum absorbieren im Wellenlängenbereich des Formazan (WST-1-Test). Bestimmung der Extinktion bei 450 nm (gegen 650nm) von destilliertem Wasser (Aqua dest), Phenolrot-freiem Kulturmedium (Medium-), fötalem Kälberserum (FKS), RPMI-1640 mit Phenolrot (RPMI+) und Standardkulturmedium (Medium+). Grafisch dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 16 individuellen Proben. Die Unterschiede von FKS, Medium+ und RPMI+ gegenüber RPMI- und Aqua dest sind statistisch signifikant (Kruskal-Wallis-Test für unverbundene Stichproben, $P < 0,001$).

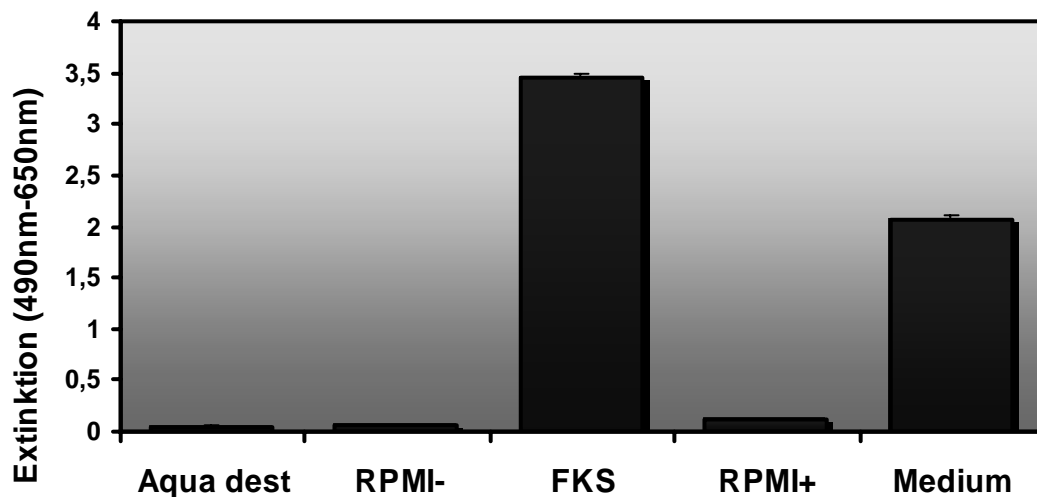


Abb.1b. Fetales Kälberserum besitzt eine nicht definierte Laktatdehydrogenaseaktivität. Bestimmung der Extinktion bei 490 nm (gegen 650nm) nach Inkubation von destilliertem Wasser (Aqua dest), Phenolrot-freiem RPMI-1640 (RPMI-), fötalem Kälberserum (FKS), RPMI-1640 mit Phenolrot (RPMI+) und Standardkulturmedium (Medium+) mit Testkit zur LDH-Bestimmung (Cytotoxicity Detection Kit). Grafisch dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 8 individuellen Proben. Die Unterschiede von FKS und Medium+ gegenüber RPMI+, RPMI- und Aqua dest sind statistisch signifikant (Kruskal-Wallis-Test für unverbundene Stichproben, $P < 0,001$).

nicht abweichend angegeben, wurde für alle Versuche eine Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml verwandt.

Die gemischte Leukozytenreaktion (MLR): Versuchsaufbau

Die Methode der gemischten Leukozytenreaktion (MLR) wurde modifiziert, aber in Grundzügen wie von Autoren bereits beschrieben (10, 11, 29, 198) durchgeführt. In einer primären Einweg-MLR sollten Effektorzellen generiert werden (Abb.2.). Die Responderzellen ($c=1 \times 10^6$ Zellen/ml) des Spenders A werden mit A, die mit Mitomycin C (MMC) inaktivierten Stimulatorzellen ($c=1 \times 10^6$ Zellen/ml) des Spenders B werden mit Bm bezeichnet (198). Die Inaktivierung der Stimulatorzellen erfolgte durch 20-minütige Inkubation der Zellen mit $40 \mu\text{g MMC} / \text{ml}$ Zellsuspension. 2 mg MMC wurden in 4,5 ml physiologischer NaCl-Lösung aufgelöst und steril filtriert. Diese Lösung wurde im Volumenverhältnis 1:10 mit der Zellsuspension 20 min lang inkubiert, anschließend die Zellen dreimal gewaschen und in Kulturmedium resuspendiert. Je nach Experiment wurden in der primären MLR modulierende Substanzen und/oder Mitogene zugesetzt. Die Inkubationsdauer der primären MLR betrug 9 Tage. Wie Vorversuche zeigen, sind nach dieser Zeit alle Stimulatorzellen abgestorben und es verbleiben nur die Effektorzellen des Spenders A in der Suspension. Diese Zellen wurden zweimal gewaschen, um die Testsubstanzen und Zelldetritus zu entfernen. Bei den meisten Versuchen wurden die Effektorzellen A1 mit MMC inaktiviert und als Regulatorzellen A1m in einer Einweg-MLR eingesetzt mit frischen Responderzellen A2 und frischen, inaktivierten Stimulatorzellen Bm. Nach einer Inkubationszeit von 9 Tagen verbleiben nur noch die Responderzellen A2 der MLR, d.h. nur die Effektoraktivität dieser Zellen wird in den quantitativen Bestimmungen von Proliferation und Zytotoxizität gemessen. Als relevante, abhängige Variablen der Beobachtungseinheit mononukleärer Zellen des peripheren Blutes wurden die Proliferationstendenz auf allogene und mitogene Stimulation, sowie die zellvermittelte, zytotoxische Aktivität definiert. Zahlreiche Modifikationen des oben beschriebenen Grundversuchs sollten die ablaufenden Reaktionen näher beleuchten und werden an gemäßer Stelle erwähnt.

2.2.2 Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität

Die Zellen wurden mit Trypanblau gefärbt und unmittelbar anschließend in einer Neubauer-Zählkammer die Anzahl vitaler und avitaler Zellen ausgezählt (151). Diese Bestimmung erfolgte stets doppelt und die Ergebnisse wurden gemittelt.

2.2.3 Bestimmung der Zellproliferation

Für die Proliferationsassays erfolge die Zellkultur in 96-Well-Rundbodenplatten in einem Gesamtvolumen von $200 \mu\text{l/well}$. Die Stimulation erfolgte einerseits als sekundäre MLR mit inaktivierten Stimulatorzellen (Bm) und andererseits mit dem Lektin Phytohämagglutinin (52),

wie in Tabelle 2 dargestellt. Die Wachstumsrate wurde durch quantitative Messung der Aktivität des mitochondrialen Atmungskettenenzym Succinat-Tetrazol-Reduktase, die direkt und linear mit der Zahl metabolisch aktiver Zellen korreliert (26), bestimmt. Bei dieser Reaktion wird das Tetrazolsalz WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzol-disulfonat) durch eine ringöffnende Dehydrierung in das bei einer Wellenlänge von 450 nm absorbierende Formazan umgewandelt. Um die Hintergrundabsorption des Kulturmediums rechnerisch zu eliminieren, wurde ein zellfreier Ansatz hergestellt, parallel zum Testansatz gemessen und automatisch mittels der verwendeten Software SOFTmaxPRO® (Molecular Devices) von den einzelnen Messwerten subtrahiert.

Versuchsordnung: Am Ende der Inkubationszeit der Proliferationstests (Tab.2) wurden zu den jeweils 200 µl Testansatz/well einer 96-Well-Mikrotiterplatte je 20 µl WST-1 pipettiert, der Ansatz im Brutschrank 4 Stunden lang inkubiert und schließlich im Spektrophotometer die Extinktion bei 450 nm gegen eine Referenzextinktion bei 650 nm gemessen. Mittelwert und Standardabweichung wurden aus 8 individuellen Bestimmungen berechnet, falls nicht abweichend angegeben.

Tabelle 2. Pipettierschema und Inkubationszeiten für die Proliferationstests MLR und PHA.

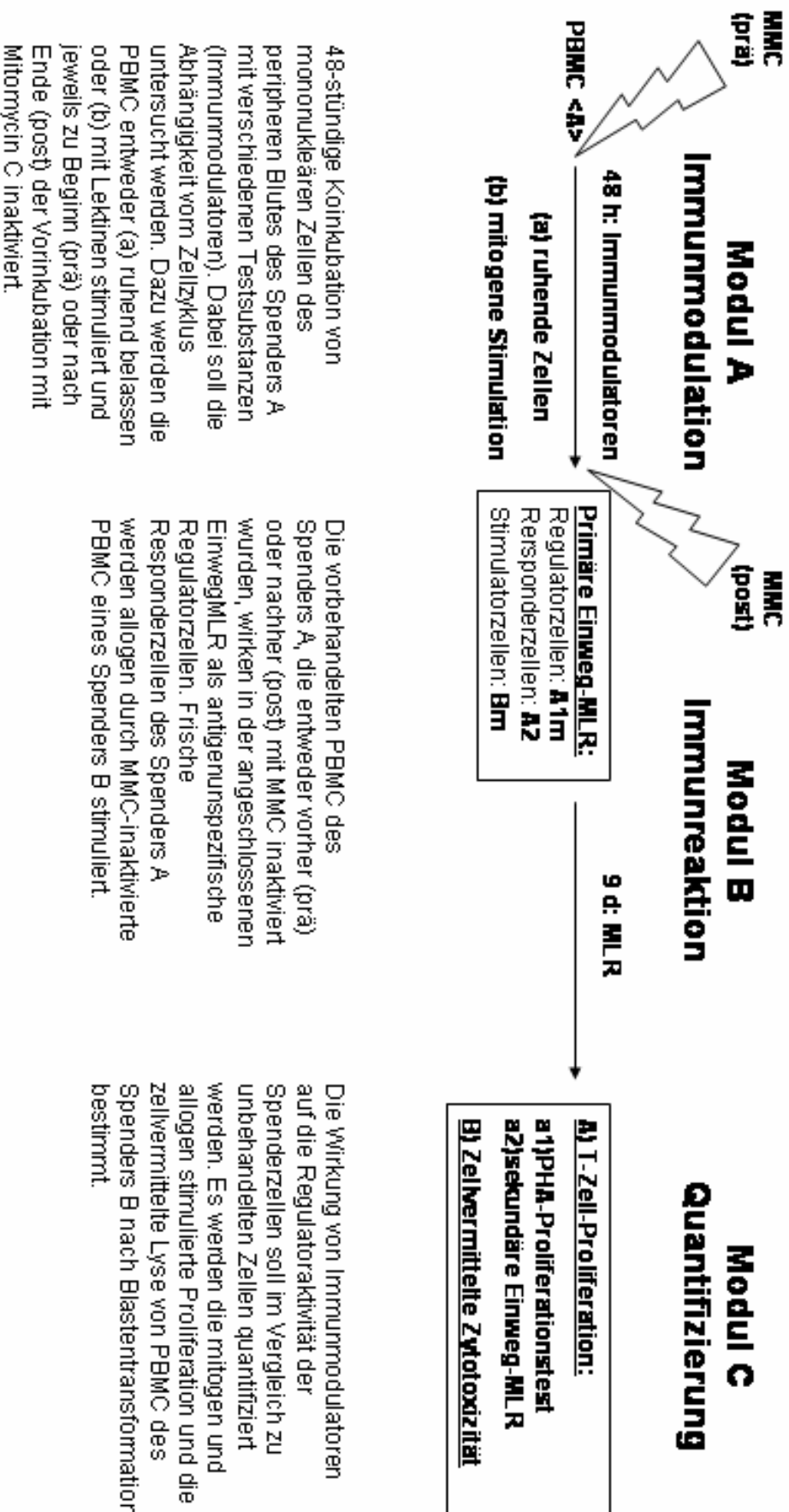
	allogene Stimulation Leukozytenmischkultur (MLR)	mitogene Stimulation Phytohämagglutinin (PHA)
1 Teil	Effektor-PBMC (2×10^6 Zellen/ml)	PBMC (2×10^6 Zellen/ml)
1 Teil	Stimulator-PBMC (2×10^6 Zellen/ml)	PHA (2×10^{-3} mg/ml)
1 Teil	PHA (4×10^{-4} mg/ml)	
1 Teil	Kulturmedium	
Summe	4 Teile	2 Teile
Inkubationszeit	9 Tage	3 Tage

2.2.4 Bestimmung der zellvermittelten Zytotoxizität

Nach Koinkubation der A2-Effektorzellen mit B-Targetzellen wurde aus der LDH-Aktivität im Überstand die zellvermittelte Lyse berechnet (27, 102, 125).

Versuchsordnung: Für die Herstellung von Zielzellen (Targets) wurden PBMC des Spenders B (= Spender der Stimulatorzellen Bm) 72 Stunden lang mit PHA ($c=1\mu\text{g/ml}$) vorinkubiert, weil dies die Sensitivität des Tests erhöht (116). Die Effektorzellen der sekundären MLR (127) wurden einmal gewaschen in FKS-/Phenolrot-freiem Kulturmedium resuspendiert (2×10^6 Zellen/ml) und 18 Stunden lang mit den Zielzellen (B-Targets) koinkubiert (Tabelle 3). Das Effektor-Target-Verhältnis wurde auf 10:1 festgelegt (34). Folgend wurden die Mikrotiterplatten 10 min bei 250 g zentrifugiert. Mit einer 8-Kanal-Mehrfachpipette wurden 100 µl des Überstandes auf eine neue,

Abbildung 2. Übersicht über das Testsystem zur Bestimmung des Einflusses auf die Regulatorfunktion. Mit Immunmodulatoren behandelte, MMC-inaktivierte Regulatorzellen werden einer primären MLR zugegeben. Die Fähigkeit der dadurch regulierten Responderzellen zur Proliferation und zellvermittelten Zytotoxizität wird gemessen.



sterile Mikrotiterplatte übertragen und mit jeweils 100 µl eines LDH-Substrat-Diaphorase-Gemisches (Cytotoxicity Detection Kit, Boehringer), bestehend aus $5,4 \times 10^{-2}$ M L-(+)-Laktat, $6,6 \times 10^{-4}$ M INT (2-p-iodophenyl-3-p-nitrophenyl-tetrazol), Diaphorase (Dihydroliponsäure-Dehydrogenase) und $1,3 \times 10^{-3}$ M Nikotinamiddinukleotid (NAD^+) in 0,2 M Tris Puffer (pH 8,2), für 30 min inkubiert. Dabei überträgt die aus den lysierten Zellen freigesetzte Laktatdehydrogenase H/H^+ des Laktat auf NAD^+ unter Bildung von Pyruvat und NADH/H^+ . In einem zweiten Schritt katalysiert die Diaphorase die NADH/H^+ -abhängige, ringöffnende Hydrierung des INT zu einem bei 490 nm absorbierenden Formazan. Mittels Spektrophotometer wurde die Extinktion bei 490 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen und von jedem Messwert die Hintergrundextinktion des Mediums (100 µl LDH-freies Medium plus 100 µl Test-Reagenz) subtrahiert.

Tabelle 3. Pipettierschema zur Quantifizierung der CTL-Antwort.

ET: Effektor-Targets-Mix; E: Effektoren; T: Targets; T_L : Targets lysiert.

		ET	E	T	T_L
Effektor-PBMC (2×10^6 Zellen/ml)	0,1 ml	X	X		
Target-PBMC (2×10^5 Zellen/ml)	0,1 ml	X		X	X
FKS-freies Medium	0,1 ml		X	X	
FKS-freies Medium mit 4 % TritonX-100	0,1 ml				X

Berechnung der prozentualen, zellvermittelten Zytotoxizität:

$$\%C = \frac{ET - E - T}{T_L - T}$$

ET: Effektor-Targets-Mix
 E: Effektor-Zellen
 T: Target-Zellen
 T_L : Target-Zellen lysiert

2.2.5 Statistische Methoden

Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mit dem Statistik-Programm SigmaStat for Windows Version 2.0 (Jandel Corporation), die deskriptive Auswertung mit Microsoft Excel. Die Daten wurden mit nichtparametrischen Tests für unverbundene Stichproben untersucht und bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P = < 0,05$ als signifikant und von $P = < 0,001$ als hoch signifikant beurteilt. Wenn nicht abweichend angegeben, wurden Mittelwert und Standardabweichung aus 8 individuellen Bestimmungen berechnet.

3. Eigene Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines Projekts zur zellulären Therapie von Immundysregulationen, die Krankheiten, so verschieden wie Malignome, Autoimmunkrankheiten, AIDS oder Atherosklerose, positiv beeinflussen soll. Unmittelbare Grundlage der eigenen Arbeit ist ein Mausmodell, mit dem es gelungen ist, tumortragende Mäuse durch zelluläre Elimination der tumorschützenden Immundysregulation dauerhaft zu heilen (106). Zur weiteren Verbesserung der Methode sollte ein in vitro Modell zur Austestung gebräuchlicher Pharmaka auf ihre Potenz zur Immunmodulation von Regulatorzellen entwickelt werden. Beobachtungseinheit sollten die Vakzinezellen sein, d.h. die Pharmaka sollten nicht während der eigentlichen Immunreaktion (in Analogie zum Rezipienten) anwesend sein, sondern die immunologische Funktion der Regulatorzellen (in Analogie zu den Donorzellen) verbessern. In einer 48-stündigen Vorinkubation wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) durch jene Substanzen pharmakologisch moduliert (Modul A) und anschließend als Regulatorzellen in eine gemischte Leukozytenreaktion (MLR) eingesetzt (Modul B). Die regulatorische Wirkung auf die MLR wurde durch die abhängigen Variablen (a) zellvermittelte Zytotoxizität (CMC), (b) Proliferation in der MLR und (c) Proliferation im PHA-Proliferationstest charakterisiert. Abbildung 2 auf Seite 26 zeigt das dazu entwickelte System. Die einzelnen Bausteine der Methode (CMC, MLR und PHA-Proliferationstest) sind in den Labors etabliert, so dass auf Vorversuche im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen wird. Um klinischen Vakzinetherapien zu entsprechen, sollten die Regulatorzellen inaktiviert werden. Die vielerorts übliche Inaktivierung der Vakzinezellen durch Bestrahlung wurde durch Behandlung mit Mitomycin C ersetzt. Deshalb war es nötig, den Einfluss von Mitomycin C auf die immunologische Aktivität von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC), sowie den Zeitpunkt der Inaktivierung, vor versus nach der Koinkubation mit den Testsubstanzen, zu untersuchen. Als Testsubstanzen dienten Rezeptorblocker der beta2-adrenergen (z.B. Propranolol), H2-histaminergen (z.B. Ranitidin, Cimetidin), sowie D2-dopaminergen Rezeptoren (z.B. Sulpirid), Hemmer des ATP-abhängigen Kaliumkanals (z.B. Tolbutamid) und Cyclooxygenasehemmstoffe (z.B. die Arylessigsäurederivate Indomethacin und Diclofenac). Die Abhängigkeit der immunmodulierenden Wirkung von Proliferation bzw. Proliferationsdruck wurde unter Bedingungen mit Lektinstimulation (Phytohämagglutinin, Concanavalin A bzw. deren Kombination) getestet.

3.1 Etablierung des Testsystems

3.1.1 Einfluss der Spenderindividualität auf die Ergebnisse der MLR

In einem Vorversuch sollte der Einfluss der Spenderindividualität untersucht werden, da anzunehmen war, dass sich die Spenderzellen in den HLA-Genen und in Aktivität sowie Anteil der

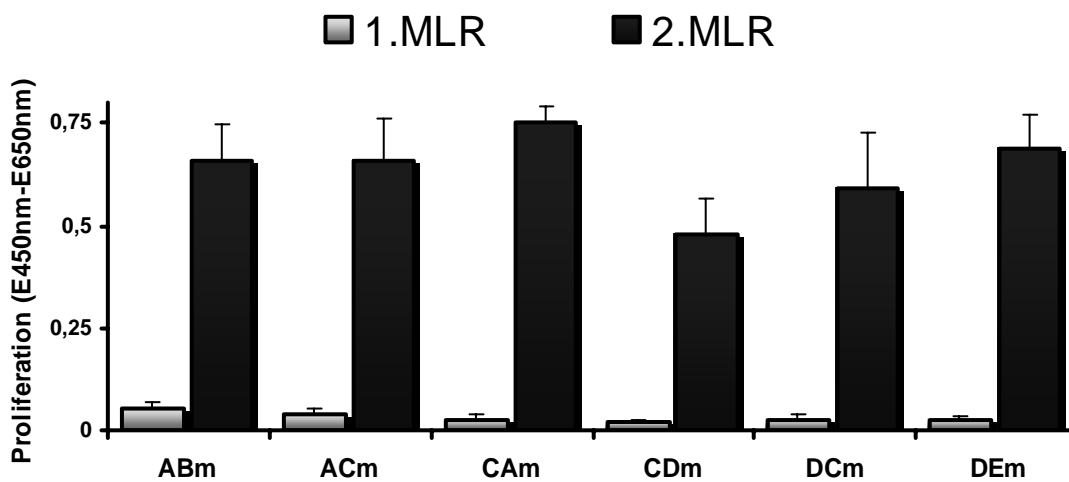


Abb.3.a. Interindividuelle Variabilität der Proliferation. Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) verschiedener Individuen wurden in verschiedenen Kombinationen als Stimulatorzellen (Suffix "m"; mit Mitomycin C inaktiviert) und Responderzellen in einer primären (1.MLR: 9 Tage) und einer sekundären gemischten Leukozytenkultur (2.MLR: 6 Tage) eingesetzt. Grafisch dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 8 individuellen Proben. Es zeigen sich deutliche interindividuelle Variabilitäten in der Proliferation, die Unterschiede zwischen primärer und sekundärer Immunreaktion bleiben in allen Fällen statistisch signifikant ($P < 0,001$; Kruskal-Wallis-Test für unverbundene Stichproben).

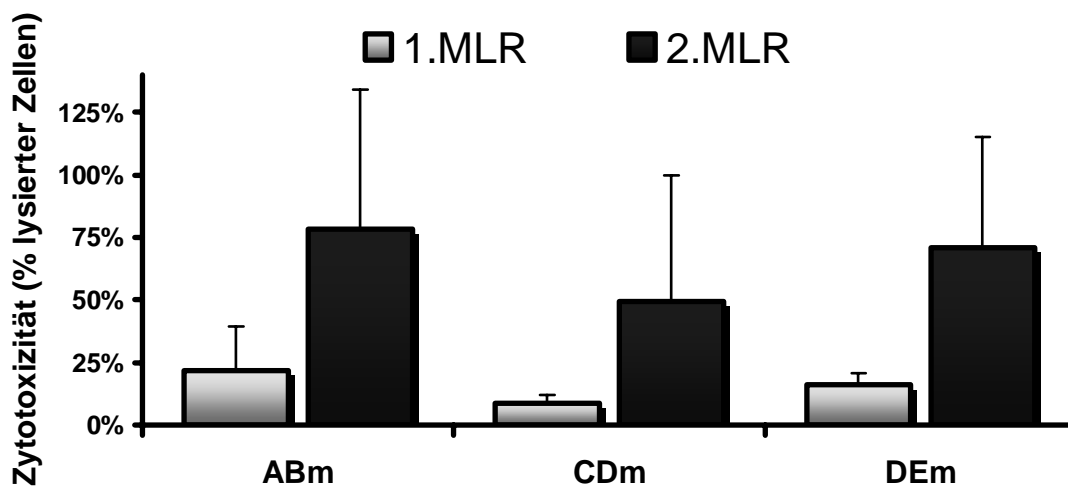


Abb.3.b. Interindividuelle Variabilität der zellvermittelten Zytotoxizität. Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) verschiedener Individuen wurden in verschiedenen Kombinationen als Stimulatorzellen (Suffix "m"; mit Mitomycin C inaktiviert) und Responderzellen in einer primären (1.MLR) und einer sekundären gemischten Leukozytenkultur (2.MLR) eingesetzt. Grafisch dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 5 individuellen Proben. Es zeigen sich deutliche interindividuelle Variabilitäten, die Unterschiede zwischen primärer und sekundärer Immunreaktion bleiben statistisch signifikant (Kruskal-Wallis-Test für unverbundene Stichproben, $P < 0,001$).

Lymphozytensubpopulationen unterscheiden. Die vorhandenen Abweichungen wurden für klein genug gehalten, um Evaluierungsversuche ohne Rücksicht auf die Spender durchzuführen, doch signifikant genug, um sich bei den Hauptversuchen zur Konstanthaltung der Versuchsbedingungen für Mehrfachspender zu entscheiden (Abb.3). Das heißt, es wurden von der Blutbank im Hause Buffy Coats von solchen Spendern bevorzugt, die mehrmals zur Spende erscheinen wollten. So konnten Stimulator- und Responderzellen über viele Versuchsreihen hinweg jeweils von identischen Individuen verwandt werden.

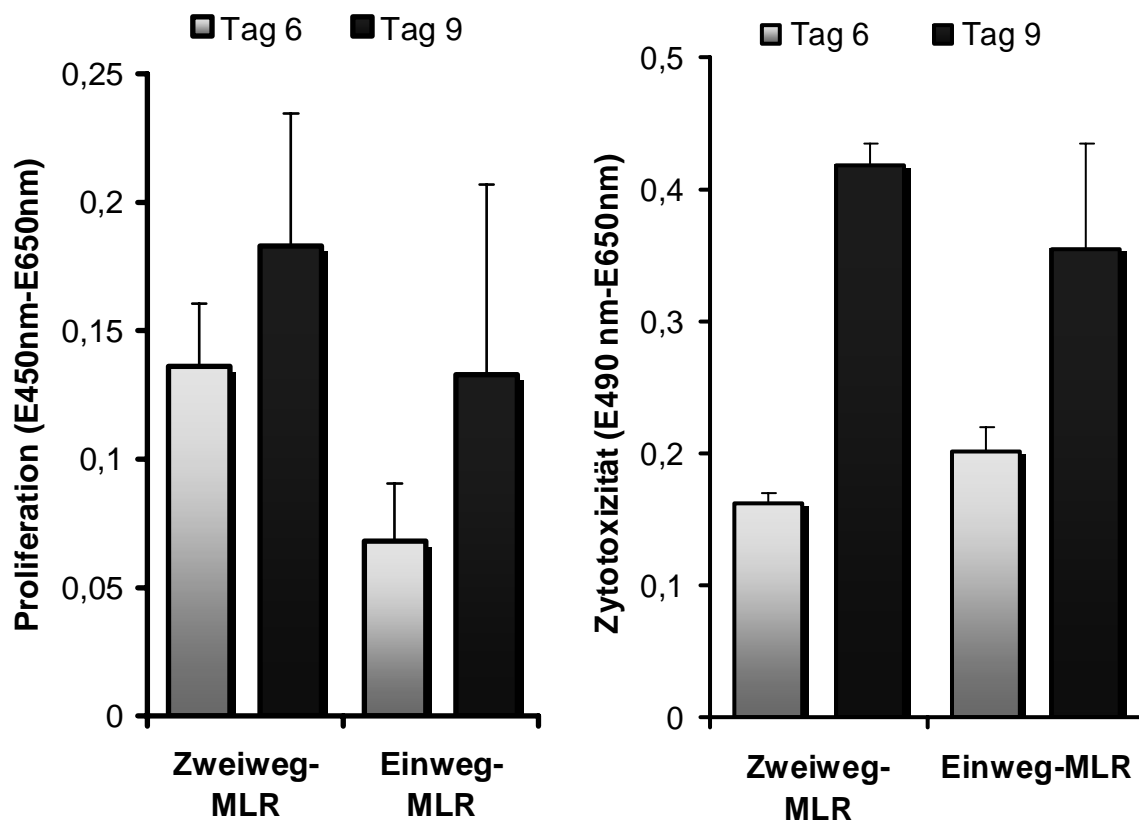


Abb.4. Einfluss der Dauer der 1.MLR auf Proliferation und zellvermittelte Zytotoxizität in der sekundären MLR. In einer 1.MLR wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) zweier Individuen als Einweg- bzw. Zweiweg-MLR 6 bzw. 9 Tage vorinkubiert, mit Mitomycin C (MMC) inaktiviert und in eine 2.MLR eingesetzt. Nach 9 Tagen wurden Proliferation und Zytotoxizität der Responderzellen der 2.MLR bestimmt. Grafisch dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 3 (Proliferation) bzw. 4 (Zytotoxizität) individuellen Proben. Sowohl in der Einweg-MLR als auch in der Zweiweg-MLR zeigt sich eine statistisch signifikante Steigerung der Zytotoxizität durch Verlängerung der Inkubationszeit in der 1.MLR von 6 auf 9 Tage (Kruskal-Wallis-Test für unverbundene Stichproben, $P < 0,001$). Eine Inkubationszeit von 9 Tagen für den 1.MLR wird deshalb für alle Hauptversuche verwandt.

3.1.2 Einfluss der Inkubationszeit der primären MLR auf Proliferation und zellvermittelte Zytotoxizität nach der sekundären MLR

Eine geeignete Inkubationszeit der primären MLR sollte evaluiert werden. Da die 9-tägige Inkubation der primären MLR stärkere Proliferation und zellvermittelte Zytotoxizität in der sekundären MLR verursacht als die kürzere Inkubation (hier 6 Tage), wurde diese Zeitspanne für alle weiteren Versuche als Standard festgesetzt (Abb.4).

3.1.3 Monitoring der Zellzahlkinetik in der primären MLR des Testsystems

Das gewählte Indikatorsystem enthält drei Variablen im Modul A (Immunmodulation): (a) Mitomycin C, (b) Mitogene (PHA, ConA) und (c) Testsubstanzen. In einem Probeversuch sollte der Einfluss dieser Parameter auf die Kinetik der Zellkonzentration in der primären MLR untersucht werden (Abb. 5). Dazu wurden PBMC des Donors A mit PHA, ConA oder PHA und ConA vorbehandelt, mit MMC inaktiviert und in eine MLR (A+Bm) als Regulatorzellen eingesetzt. Dieser MLR wurde alternierend Cimetidin beigegeben. Bei der nicht mit MMC-behandelten Referenz bleibt die Zellzahl über den Beobachtungszeitraum beinahe konstant. Die Proliferation der Responderzellen entspricht in etwa dem Absterben der MMC-inaktivierten Stimulatorzellen. Werden zusätzlich die Regulatorzellen MMC-behandelt und sterben ab, dann zeigt sich eine deutliche Zytoreduktion über die Zeit und erst am Tag 8 kann man eine Zunahme der Zellzahl beobachten. Durch Vorbehandlung der Regulatorzellen mit Mitogenen und/oder Zugabe von Cimetidin, kann diese Proliferation am Tag 8 statistisch signifikant gesteigert werden. In Zusammenschau mit Abb.4 sind es diese proliferierenden Responderzellen, die im Modul C quantifiziert werden. Die Versuche zeigen, dass durch Modulation der Regulatorzellfunktion die immunologische Aktivität der Responderzellen beeinflusst und gemessen werden kann. Zudem erweist sich der H₂-adrenerge Antagonist Cimetidin als Immunstimulans bei direkter Zugabe zur gemischten Leukozytenkultur.

3.1.4 Einfluss der Mitomycin-C-Konzentration auf die Überlebenszeit der PBMC

Ziel war es, eine geeignete Mitomycin C (MMC) - Konzentration zur Inaktivierung der Regulatorzellen zu finden. Dabei sollte die initiale Toxizität nicht zu hoch sein (<20%), um die Funktion dieser Zellen zu erhalten. Andererseits sollten diese Zellen keinen Einfluss auf das Modul C (Quantifizierung) nehmen, sollten also bereits abgestorben sein. Ruhende bzw. proliferierende, d.h. mitogen oder allogene stimulierte Zellen (PBMC) des Spenders A wurden 18 Stunden lang mit verschiedenen MMC-Konzentrationen inkubiert, danach zweimal gewaschen und an den folgenden Tagen die Vitalität der Zellen bestimmt. Die Konzentrationen 5 µg/ml, 10 µg/ml und 20 µg/ml (MMC-5, MMC-10, MMC-20) erfüllten die geforderten Bedingungen (Abb. 6).

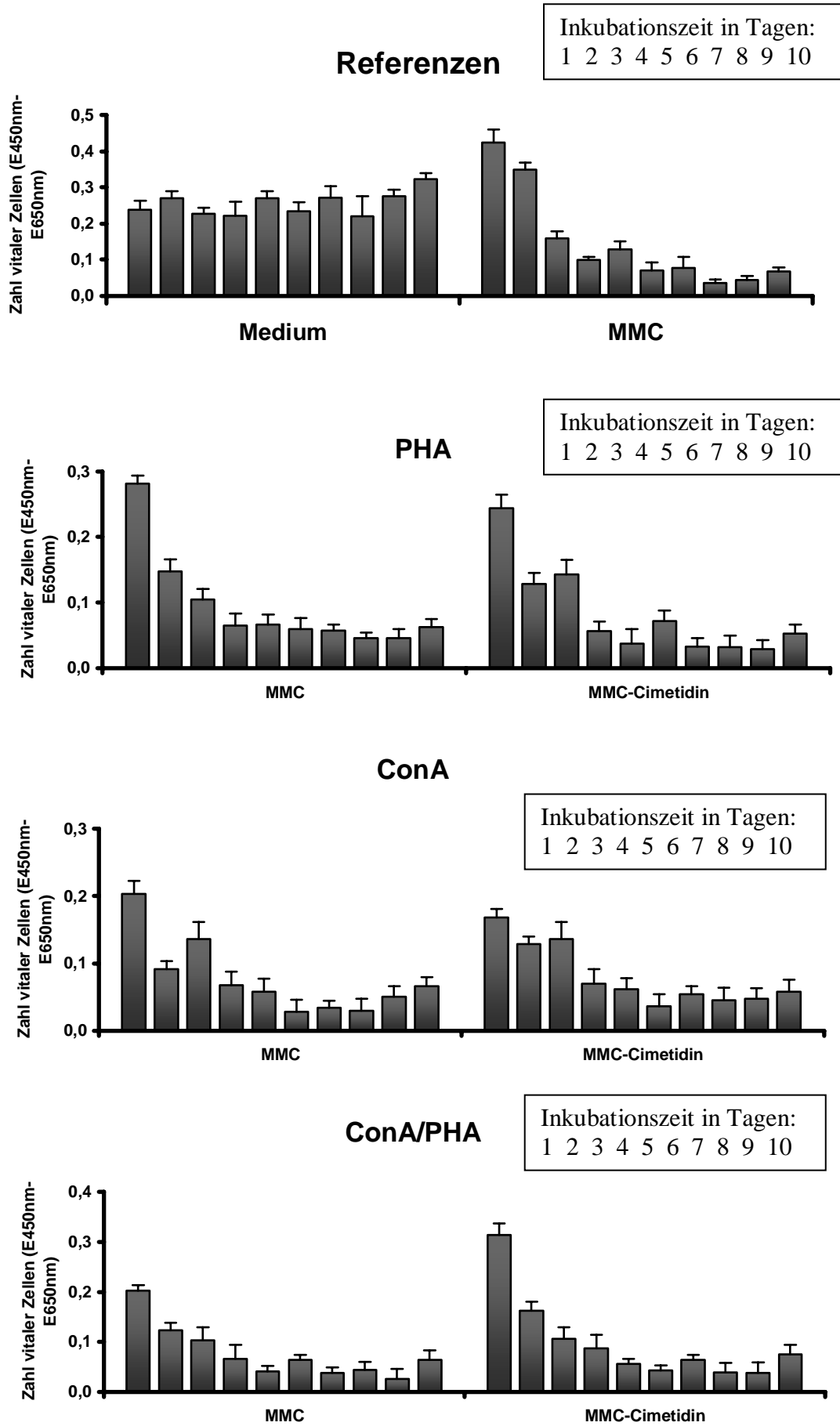


Abb.5. Zeitlicher Verlauf der Zellzahl in der 2. MLR. Legende Seite 33.

Abb.5. Zeitlicher Verlauf der Zellzahl in der sekundären MLR. Effektorzellen einer 1.MLR wurden mit Mitomycin C (MMC) behandelt und in einen 2.MLR mit inaktivierten Stimulatorzellen (MMC) und frischen Responderzellen eingesetzt und pro 24 Stunden die Zahl vitaler Zellen mittels WST-1 gemessen. Grafisch dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 6 individuellen Proben. **a.** Verglichen werden Effektorzellen der 1.MLR, die mit MMC behandelt wurden (MMC), mit dem Einsatz unbehandelter Effektorzellen (Medium). Bei "Medium" halten sich Proliferation der Responderzellen und Absterben der inaktivierten Stimulatorzellen die Waage. Bei "MMC" beobachtet man das Absterben der Regulatorzellen und Stimulatorzellen in den ersten 7 Tagen und erkennt dann die Proliferation der Responderzellen an den Tagen 8 und 9. **b.** In der 1.MLR zur Generierung der Regulatorzellen wurde Phytohämagglutinin (PHA) als Mitogen zugesetzt. Zusätzlich wurde in der 2.MLR Cimetidin versus Medium ohne Cimetidin verglichen. **c.** Wie b., nur an Stelle von PHA wurde Concanavalin A (ConA) eingesetzt. **d.** ConA und PHA. Die zusätzliche Behandlung der Regulatorzellen in der 1.MLR mit Mitogenen bzw. der Effektorzellen der 2.MLR mit Cimetidin bewirkt eine gesteigerte Proliferation der Responderzellen in der 2.MLR am Tag 9 (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks; $P < 0,001$; Tukey Test; statistisch signifikant: weiße Sternchen; getestet gegen Kontrolle: graues Sternchen).

3.1.5 Einfluss der Inaktivierung der Regulatorzellen auf Proliferation und Zytotoxizität in der sekundären MLR

Der direkte (Effektor-) Einfluss der Regulatorzellen auf die sekundäre MLR sollte untersucht werden. Da bei Inaktivierung der Regulatorzellen mit Mitomycin C diese nicht mehr direkten Einfluss auf die sekundäre MLR nehmen, sollten inaktivierte und nicht inaktivierte Regulatorzellen (die auch als Effektoren mitprolifrieren können) verglichen werden (Abb. 7). Wie zu erwarten war, nimmt die gemessene Zellaktivität durch Absterben der inaktivierten Regulatorzellen MMC-konzentrationsabhängig ab (Abb.7.a). Überraschenderweise nimmt jedoch die Zytotoxizität MMC-konzentrationsabhängig zu (Abb.7.c). Waren die MMC-inaktivierten Regulatorzellen zusätzlich mit PHA vorinkubiert, verdeutlicht sich diese Diversität. Insgesamt ist der zytotoxizitätsfördernde Effekt von MMC nicht zellzyklusabhängig (ruhende versus proliferierende Zellen). Durch eine wiederholte MMC-Behandlung am Ende des Modul C konnten beide Effekte noch weiter verstärkt werden (Abb.7.b und Abb.7.d). Da die stimulierende Wirkung von MMC auf die zytotoxische Aktivität der PBMC nicht zu erwarten war, sollten weitere Experimente den Effekt bestätigen und genauer charakterisieren.

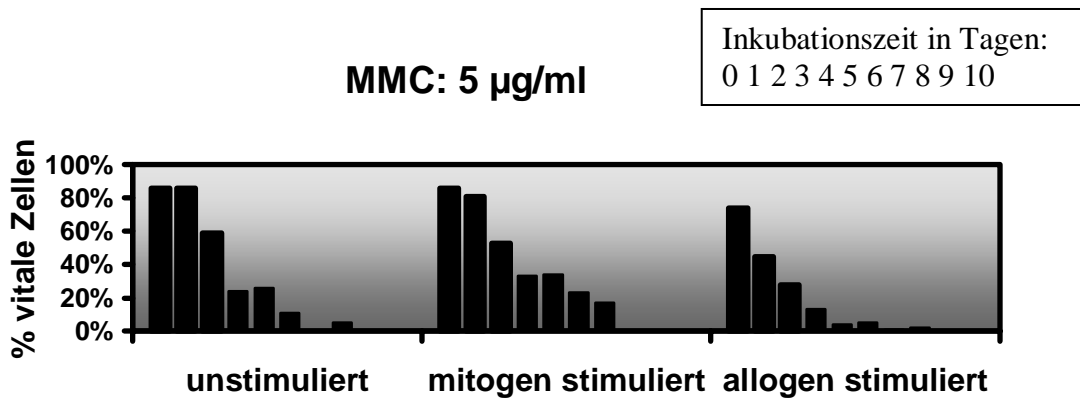
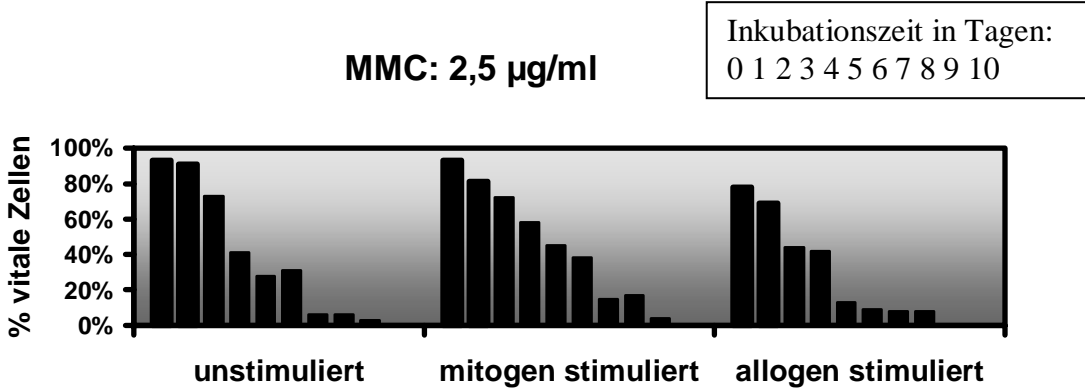
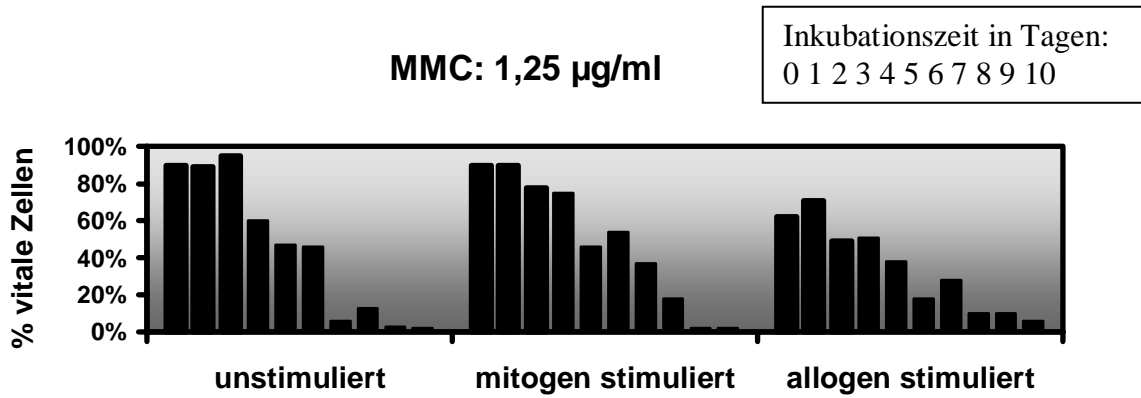
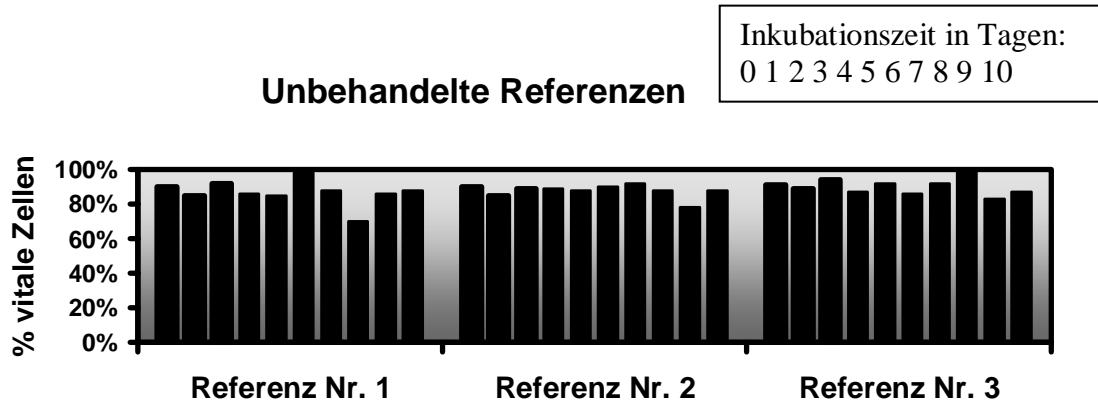


Abb.6. Dosisfindung MMC. Legende auf Seite 36.

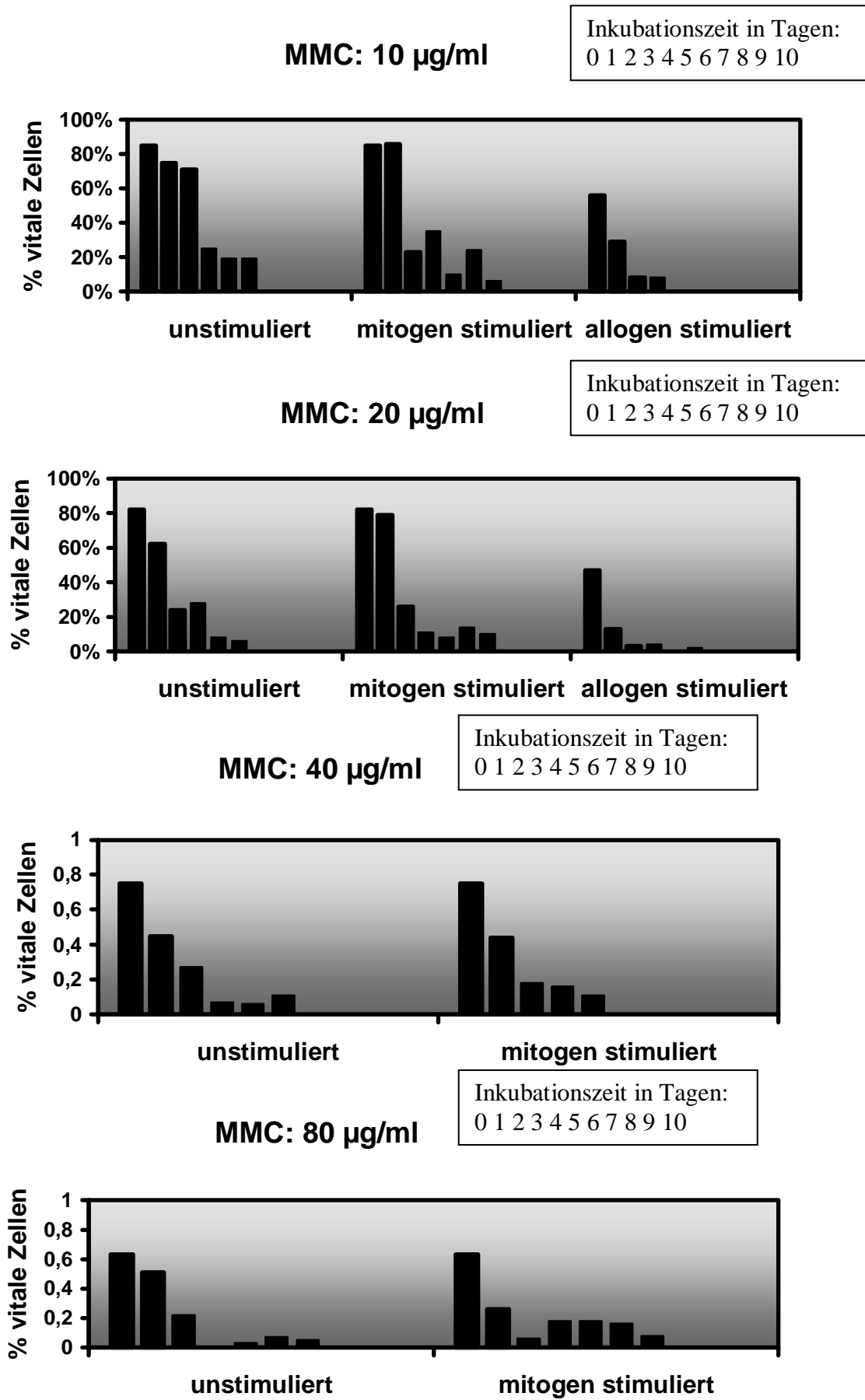


Abb.6. Dosisfindung MMC. Legende auf Seite 36.

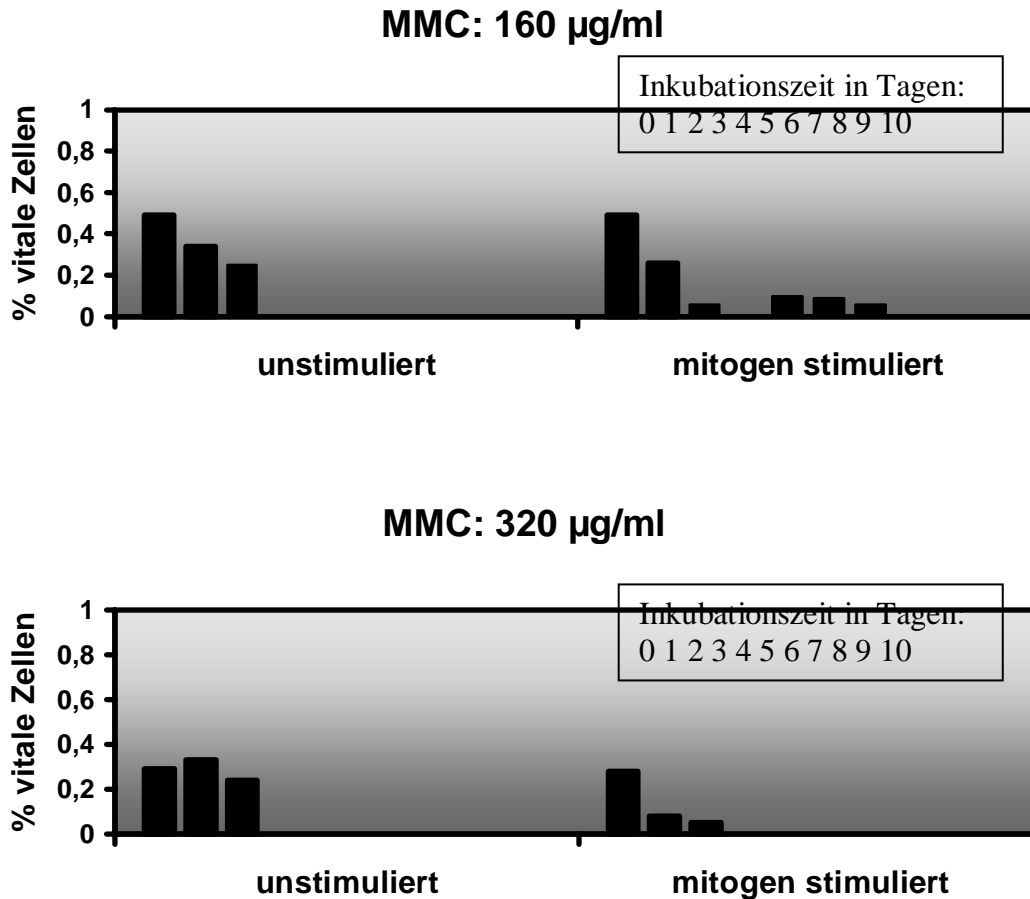


Abb.6. Dosisfindung Mitomycin C (MMC).

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden 18 Stunden lang mit unterschiedlichen Konzentration von Mitomycin C (in µg/ml) vorbehandelt. Getestet wurde die MMC-Wirkung auf ruhende PBMC (unstimuliert), auf allogene stimulierte PBMC (allogene, inaktivierte Stimulatorzellen) und auf mitogen stimulierte Zellen (1 µg/ml Phytohämagglutinin). Nach Trypanblaufärbung wurden die vitalen und avitalen Zellen in einer Neubauerzählkammer bestimmt. Grafisch dargestellt sind die Mittelwerte zweier Zählungen. Die MMC-behandelten Effektorzellen sollten am Tag der Auswertung der 2.MLR (Tag 9) abgestorben sein, damit nur die Regulatorfunktion auf die frischen PBMC der 2.MLR und nicht die direkte Effektorfunktion der PBMC aus der 1.MLR in die Auswertung eingeht. Auf der anderen Seite sollten mindestens 80% der PBMC die MMC-Behandlung überleben, um die Funktionsfähigkeit der nicht mehr proliferationsfähigen Zellen zu gewährleisten. Die Konzentrationen 5 µg/ml, 10 µg/ml und 20 µg/ml erfüllen diese Voraussetzungen und sollen in den folgenden Versuchen getestet werden.

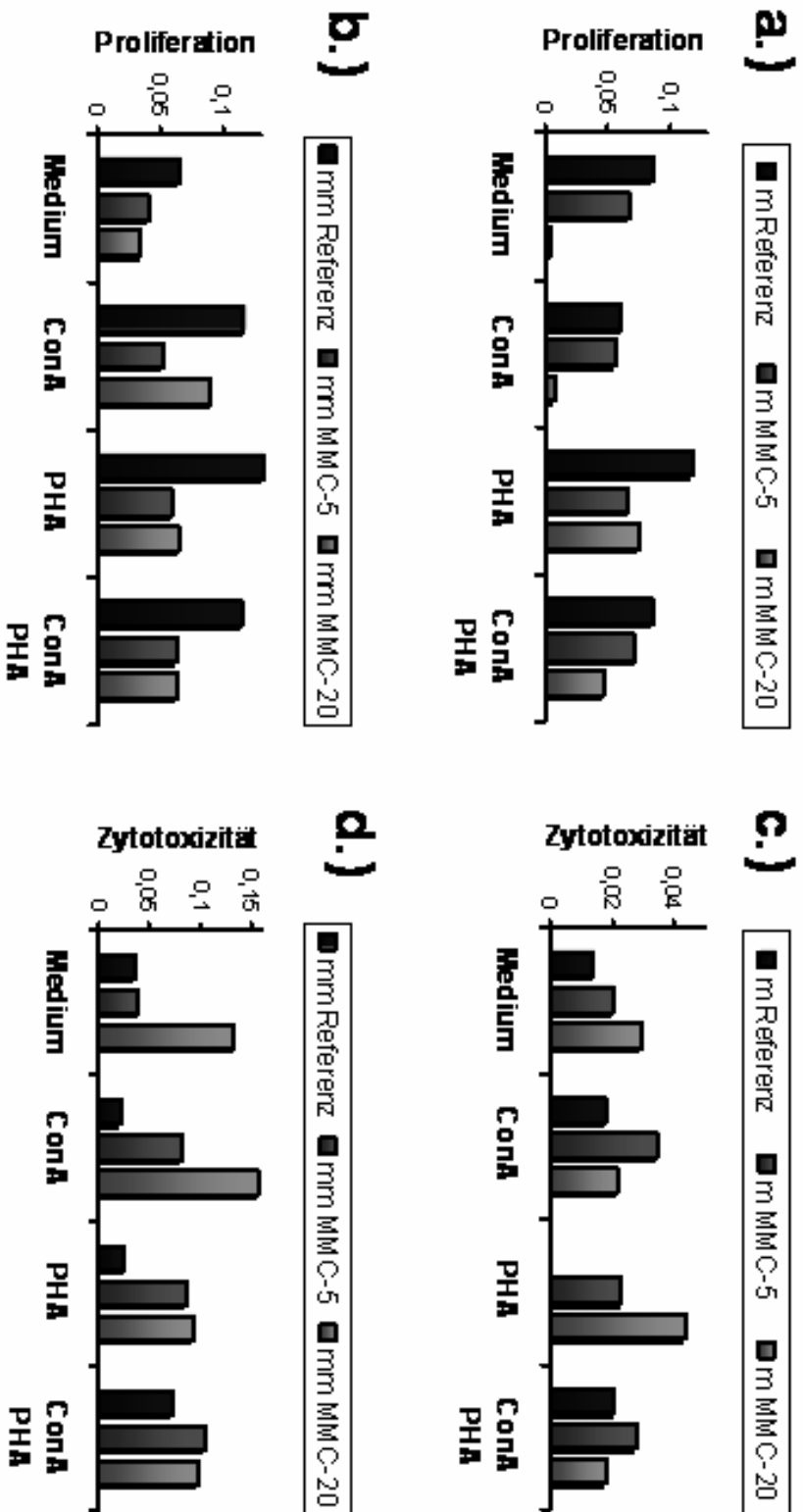


Abb. 7. Einfluss der Inaktivierung der Regulatorzellen auf Proliferation und zellvermittelte Zytotoxizität in der sekundären MLR. Untersucht wurde der Einfluss der Lektine ConA und PHA und von Mitomycin C (MMC) verschiedener Konzentrationen (5 µg/ml, 20 µg/ml) auf Proliferation (Abb. 7. a/b) und zellvermittelte Zytotoxizität (Abb. 7. c/d) in der sekundären MLR. Nach Vorinkubation mit Lektinen (48 Stunden) und Inaktivierung der Regulatorzellen mit MMC zeigt sich eine Steigerung der Zytotoxizität (Abb. 7. c), die durch eine zweite MMC-Behandlung im Anschluss an die MLR noch verstärkt werden kann (Abb. 7. d). Die Vorversuche wurden ohne Parallelen durchgeführt und sind daher nicht statistisch auswertbar. Eine genaue, statistisch auswertbare Evaluation erfolgt in weiteren Versuchen (siehe Abb. 8-10).

3.2 Charakterisierung der Mitomycin-C-Wirkung auf Regulatorzellen

3.2.1 Reproduzierbarkeit, Antigen-spezifität und Konzentrationsabhängigkeit des beobachteten MMC-Effekts

Zugabe von Regulatorzellen steigert Proliferation und Zytotoxizität in den angeschlossenen Testsystemen (Abb.8). Die Vorbehandlung mit MMC vermindert statistisch signifikant die Zellaktivität am Zeitpunkt der Auswertung (Absterben der Regulatorzellen), steigert aber signifikant die Zytotoxizität (Abb.8). Dies bestätigt die Ergebnisse aus den Vorversuchen zur Methodik (siehe Abschnitt 3.1.5., Abb.7).

Die in den Vorversuchen ermittelten MMC-Konzentrationen (MMC-5: 5 µg/ml; MMC-10: 10 µg/ml; MMC-20: 20 µg/ml; Inkubationszeit jeweils 18 Stunden und anschließend zweimaliges Auswaschen des MMC) sollten mit einer MMC-Kurzinkubation (MMC-40kurz: 40 µg/ml; Inkubationszeit 20 min) und der unbehandelten Kontrolle (MMC-0) verglichen werden (Abb.9). Die in den vorangegangenen Experimenten beobachtete Suppression der Proliferation und die Steigerung der Zytotoxizität konnte in allen MMC-behandelten Ansätzen beobachtet werden. Eine Konzentrationsabhängigkeit konnte nicht gezeigt werden.

Weiterhin sollte die Antigen-spezifität dieser Reaktion geprüft werden. So wurden im Modul C (Quantifizierung) neben den Zielzellen des Spenders B (Donor der Stimulatorzellen) auch autologe Zellen (Spender A) und allogene Zellen eines dritten Spenders (C) verwendet (Abb. 10). Unter gleichen Bedingungen, aber unter Verwendung anderer Spenderindividuen zur Gewinnung der PBMC wurde der Versuch wiederholt (Messung 2). Die bekannten Effekte wurden bestätigt, zusätzlich auch gegen allogene Zellen des Spenders C und gegen autologe Zellen (A). Der beobachtete antiproliferative und zytotoxizitätsstimulierende Effekt von Mitomycin C ist also gut reproduzierbar und nicht antigen-spezifisch.

3.2.2 MMC-Effekt: Deblockierung/Kontrasuppression oder Immunpotenzierung ?

Die zytotoxizitätsfördernde Wirkung des MMC kann auf einer Aktivierung von CTL-Inducer-Zellen und/oder einer Eliminierung/Inaktivierung von Suppressorzellen beruhen. Die Hemmung der Proliferation von (v.a. CD4+) T-Zellen legt die Entfernung oder Blockierung von Suppressor-Helfer-Zellen nahe. Demnach würden in der vom peripheren Blut des Spenders A stammenden Lymphozytenpopulation immunpotenzierende und immunsupprimierende Lymphozyten koexistieren. Es wäre also eine Art Homöostase zwischen Suppressoren und Potenzierern anzunehmen, die aus dem Gleichgewicht käme. Dazu sollte die Frage geklärt werden, ob in einer unbehandelten Lymphozytenkultur verschiedene Grade der Suppression zu ermitteln sind, kurz ob die Lymphozyten vor MMC-Behandlung zumindest zum Teil supprimiert waren.

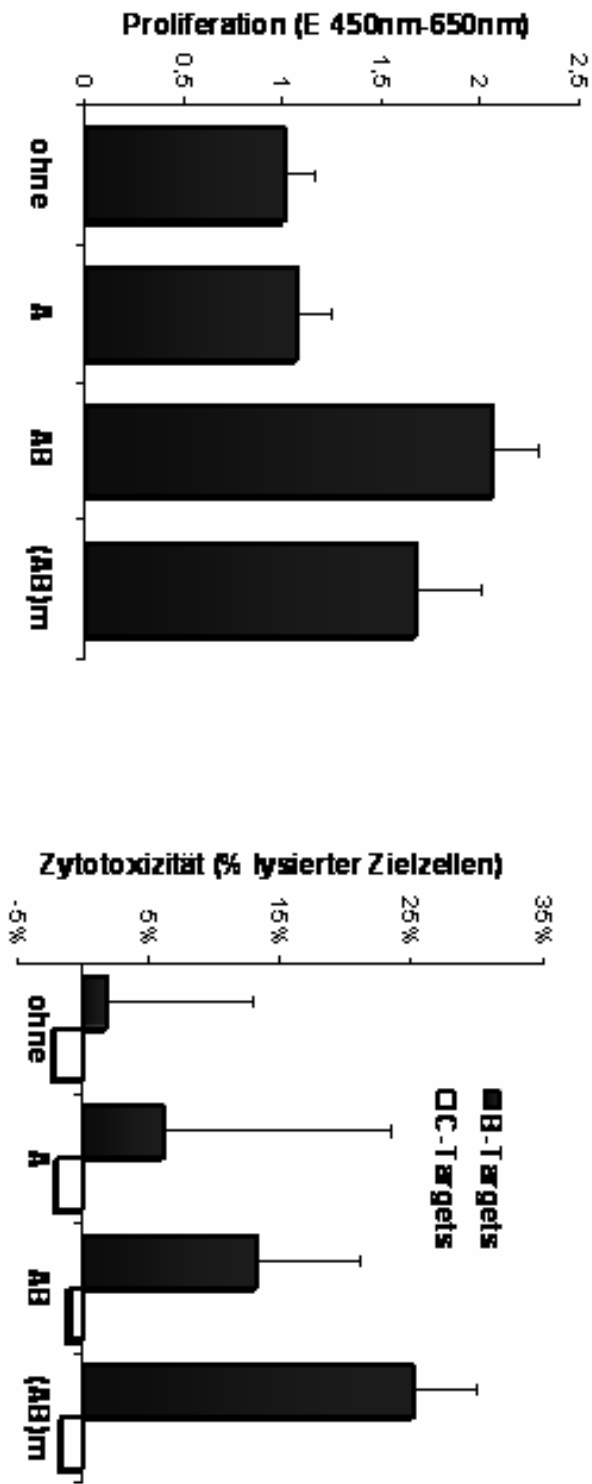


Abb. 8. Mitomycin C-Behandlung der Regulatorzellen verstärkt die zellvermittelte Zytotoxizität in der gemischten Leukozytenreaktion (MLR). Zu einer gemischten Leukozytenreaktion (AB; 9 Tage) wurden Medium ("ohne"), Regulatorzellen ("A"), MMC-inaktivierte Regulator- und Stimulatorzellen ("(AB)m") oder unbehandelte Regulator- und Stimulatorzellen ("AB") zugegeben. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung von Proliferation und Zytotoxizität von 4 bzw. 8 individuellen Proben. Die zellvermittelte Zytotoxizität ist allospezifisch, da nur B-T-Targets (Donor der Stimulatorzellen) und nicht C-T-Targets (dritter Donor) lysiert werden. Die Inaktivierung der Regulatorzellen stimuliert die zellvermittelte Zytotoxizität. Das Absterben der MMC-behandelten Regulatorzellen resultiert in verminderten Extinktionswerten im Proliferationsstest. Die dargestellten Ergebnisse des Proliferationsstests sind statistisch signifikant gegenüber den Kontrollwerten "ohne" und "A" (Kruskal-Wallis-Test für unverbundene Stichproben; $P < 0,001$).

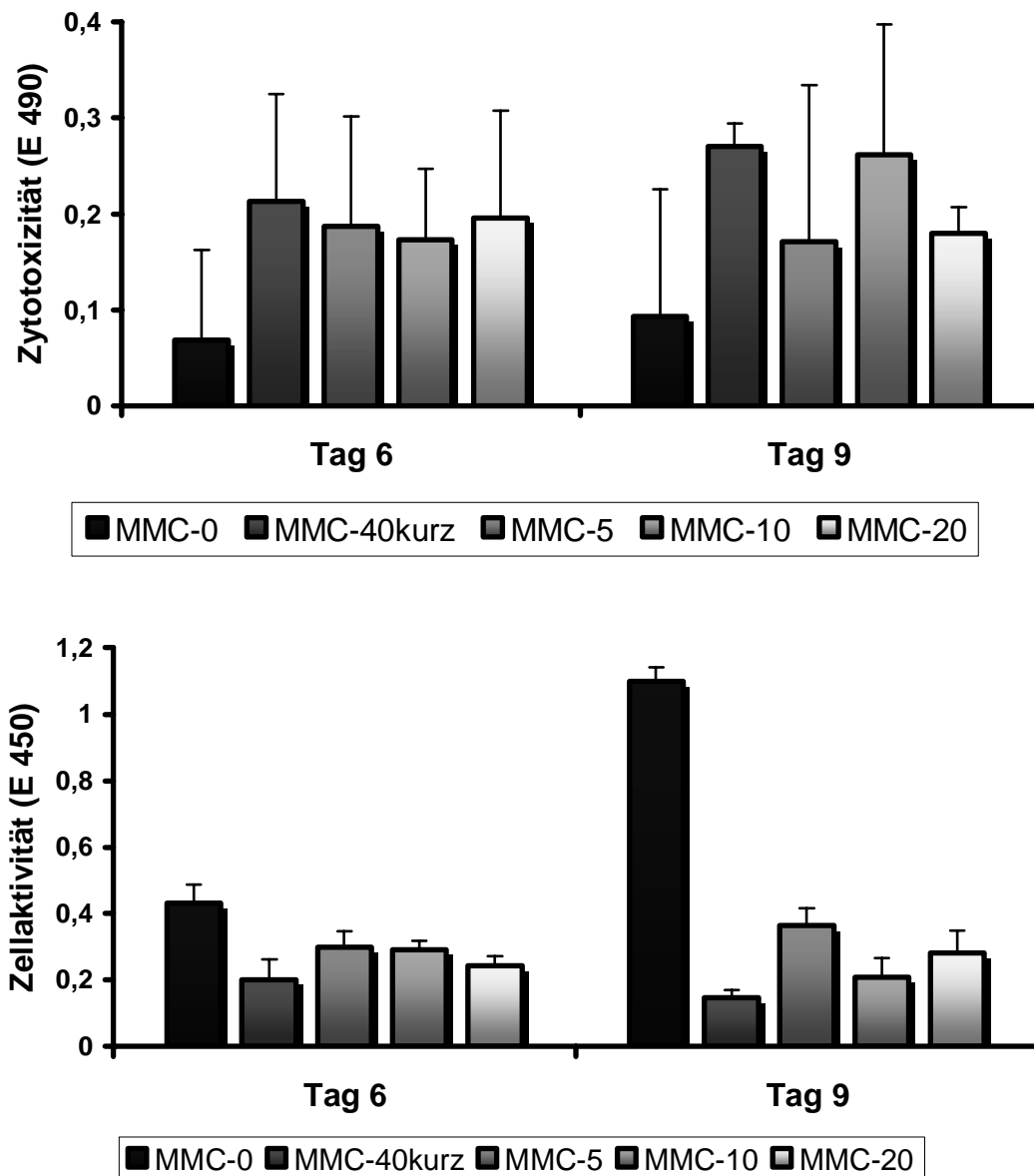


Abb.9. Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit des MMC-Effektes auf Regulatorzellen und der Abhängigkeit von der Dauer der sekundären MLR. PBMC wurden mit den in den Vorversuchen ermittelten Konzentrationsoptima für MMC (5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml x 18 h bzw. 40 µg/ml x 20 min) inaktiviert und als Regualtorzellen in eine sekundäre MLR eingesetzt, deren Dauer zwischen 6 und 9 Tagen variiert wurde. Ermittelt wurde der Einfluss auf die Proliferation in der MLR und der zellvermittelten Zytotoxizität gegen Zielzellen des Spenders B. Grafisch dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung von jeweils 4 individuellen Proben. Durch Inaktivierung der zugegebenen Zellen nimmt die Proliferation in der MLR statistisch signifikant gegenüber der unbehandelten Kontrolle ab ($P < 0,001$; Kruskal-Wallis-Test für unverbundene Stichproben), die zellvermittelte Zytotoxizität dagegen zu. Die Überlegenheit der längeren Inkubationsdauer (Abb.4.) wird durch diese Ergebnisse bestätigt. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Versuch mehrerer Einzelmessungen.

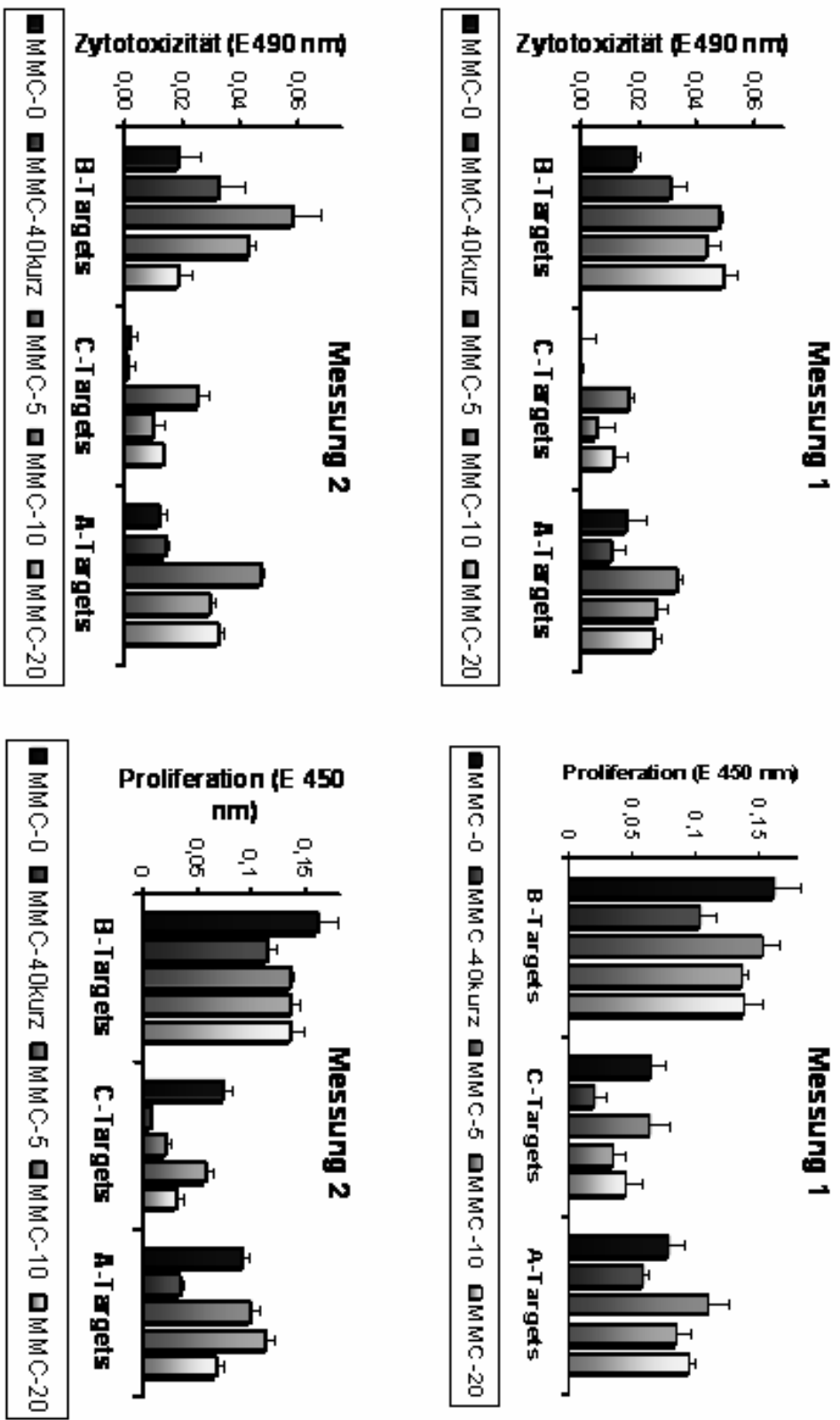


Abb. 10. Untersuchung der Antigen-spezifität der Mitomycin-C-Wirkung auf Regulatorzellen. Vergleich von autologen (A-Targets) und allogenen Zielzellen einer primären Immunreaktion (C-Targets) und einer sekundären Restimulation (B-Targets). Konzentrationen: MMC-0: Kontrolle Medium; MMC-40kurz: 20 min x 40 µg/ml; MMC-5: 18h x 5 µg/ml; MMC-10: 18h x 10 µg/ml; MMC-20: 18h x 20 µg/ml. Grafsch dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 6 individuellen Proben. Mit identischem Versuchsansatz aber anderen Spendern für A-, B-, und C-Targets wurde das Experiment wiederholt (Messung 2). Der MMC-Effekt auf die immunologische Funktion der Regulatorzellen ist nicht antigenspezifisch.

(a) Crowding: Einfluss der Zelldichte auf die immunologische Funktionen von PBMC

In einer primären MLR wurde die Zellkonzentration variiert und in einer sekundären MLR (mit üblicher, einheitlicher Zellkonzentration) die durch hohe Zelldichte induzierte Suppression gemessen (Abb. 11). Sowohl Proliferation, als auch zellvermittelte Zytotoxizität, werden konzentrationsabhängig gehemmt. Um den Effekt der Substratkonkurrenz in der 1. MLR zu minimieren, wurde in einem weiteren Versuch zur Steigerung der Zelldichte nicht die Zellkonzentration erhöht, sondern die Zellen mit unterschiedlichen Gravitationen zentrifugiert (Abb. 12). Es zeigte sich die von anderen Autoren beschriebene Immunpotenzierung bei Zentrifugation mit 80 g, jedoch eine statistisch signifikante Suppression bei 400 g und 1000 g, sowohl der Proliferation, als auch der zellvermittelten Zytotoxizität.

(b) Einfluss der Effektor-Stimulator-Ratio auf Proliferation und Zytotoxizität

Als weitere Einflussgröße auf die "spontane" Immunsuppression sollte die Effektor-Stimulator-Ratio untersucht werden (Abb. 13). Es zeigt sich eine Suppression der Proliferation und Zytotoxizität bei einer Effektor-Stimulator-Ratio von 1 in der primären und sekundären MLR bzw. eine Aktivierung der Zellen bei Wahl eines ungleichen Zellverhältnisses. Diese Aktivierung ist übertragbar auf eine sekundäre MLR, bei der die Ratio wieder 1 ist. Der Effekt ist nicht antigenspezifisch (Abb. 13.a).

(c) Einfluss von Pharmaka auf die durch Crowding bzw. Zellratio induzierte Immunsuppression

Unter der Annahme, Crowding und Zellratio wären zwei Faktoren der "spontanen" Immunsuppression, die durch MMC deblockiert werden könne, war es interessant darzustellen, ob diese Art der Immunsuppression überhaupt durch Intervention beeinflussbar ist. Dazu wurden die unter 3.2.2.(a) und 3.2.2.(b) beschriebenen Versuche unter Zugabe verschiedener Substanzen wiederholt und mit einer parallel bestimmten Referenz verglichen (Abb. 14). Beim Crowding durch Zentrifugation (Abb. 13a) wird durch Zugabe von Cimetidin oder Tolbutamid die Suppression aufgehoben, durch Propranolol oder DMPX die Zellen sogar über den Wert der unbehandelten Referenz stimuliert. Molsidomin und Methylprednisolon als Negativreferenzen verminderten die Zellaktivität. Die durch hohe Zellkonzentrationen induzierte Crowding-Suppression war nur durch Tolbutamid positiv zu beeinflussen (Abb. 14.c). Die durch die Zellratio induzierte Immunsuppression war durch Cimetidin, Propranolol, ASS, DMPX und Tolbutamid positiv zu beeinflussen, jedoch in keinem Fall vollständig zu beheben (Abb. 14.b).

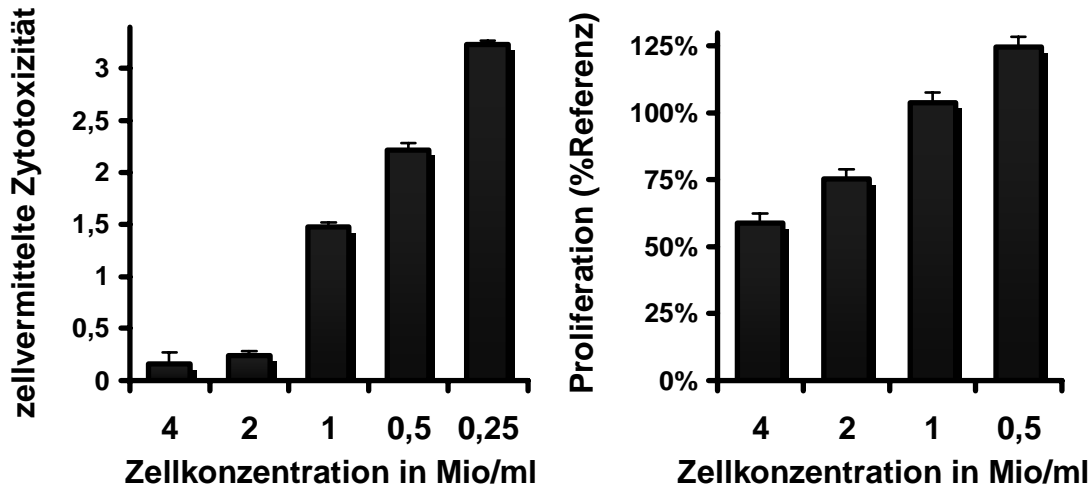


Abb. 11. Einfluss des Zell-Zell-Abstandes in einer gemischten Leuko-zytenkultur (6 Tage) auf Proliferation und zellvermittelte Zytotoxizität. Grafisch dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 8 individuellen Proben. Durch Zellkonzentrationen höher als 1 Mio/ml kann eine statistisch signifikante Suppression der zellvermittelten Zytotoxizität ($P < 0,001$; Kruskal-Wallis-Test für unverbundene Stichproben) und der Proliferation ($P < 0,001$; Kruskal-Wallis-Test für unverbundene Stichproben) induziert werden. Der WST-1-Test zur Messung der Proliferation liefert bei Konzentrationen weniger 500.000 Zellen/ml keine auswertbaren Extinktionen mehr.

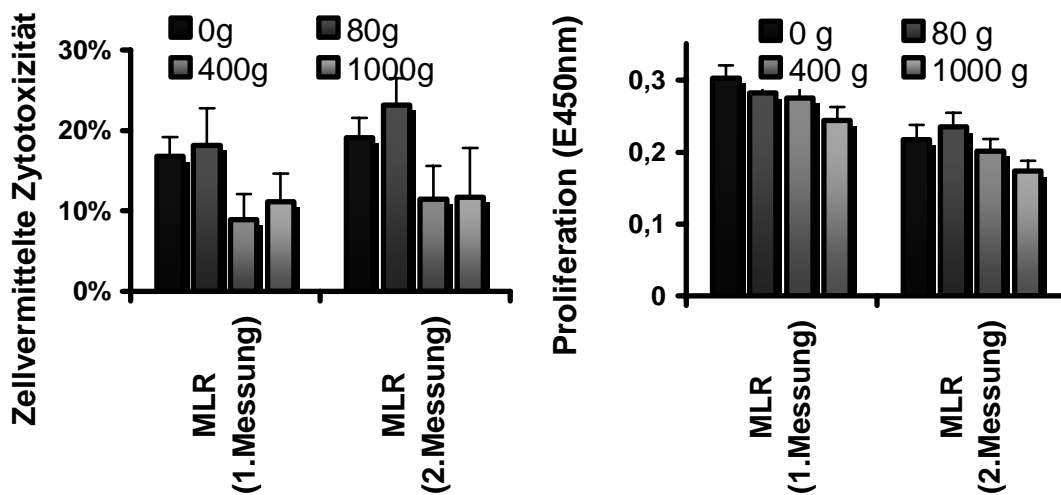


Abb. 12. Einfluss der Zellannäherung durch Zentrifugation in einer gemischten Leukozytenkultur (6 Tage) auf Proliferation und zellvermittelte Zytotoxizität. Die Mikrotiterplatten der MLR wurden vor Inkubation mit ansteigender Gravitation zentrifugiert. Grafisch dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 8 individuellen Proben. Leichte Annäherung erhöht die zellvermittelte Zytotoxizität (80g gegenüber 0g in der 2. Messung statistisch signifikant; $P < 0,001$). Bei starker Annäherung zeigt sich eine statistisch signifikante Suppression von zellvermittelter Zytotoxizität (400g und 1000g gegenüber 0g; $P < 0,001$) und Proliferation (1000g gegenüber 0g; $P < 0,001$; Kruskal-Wallis-Test für unverbundene Stichproben).

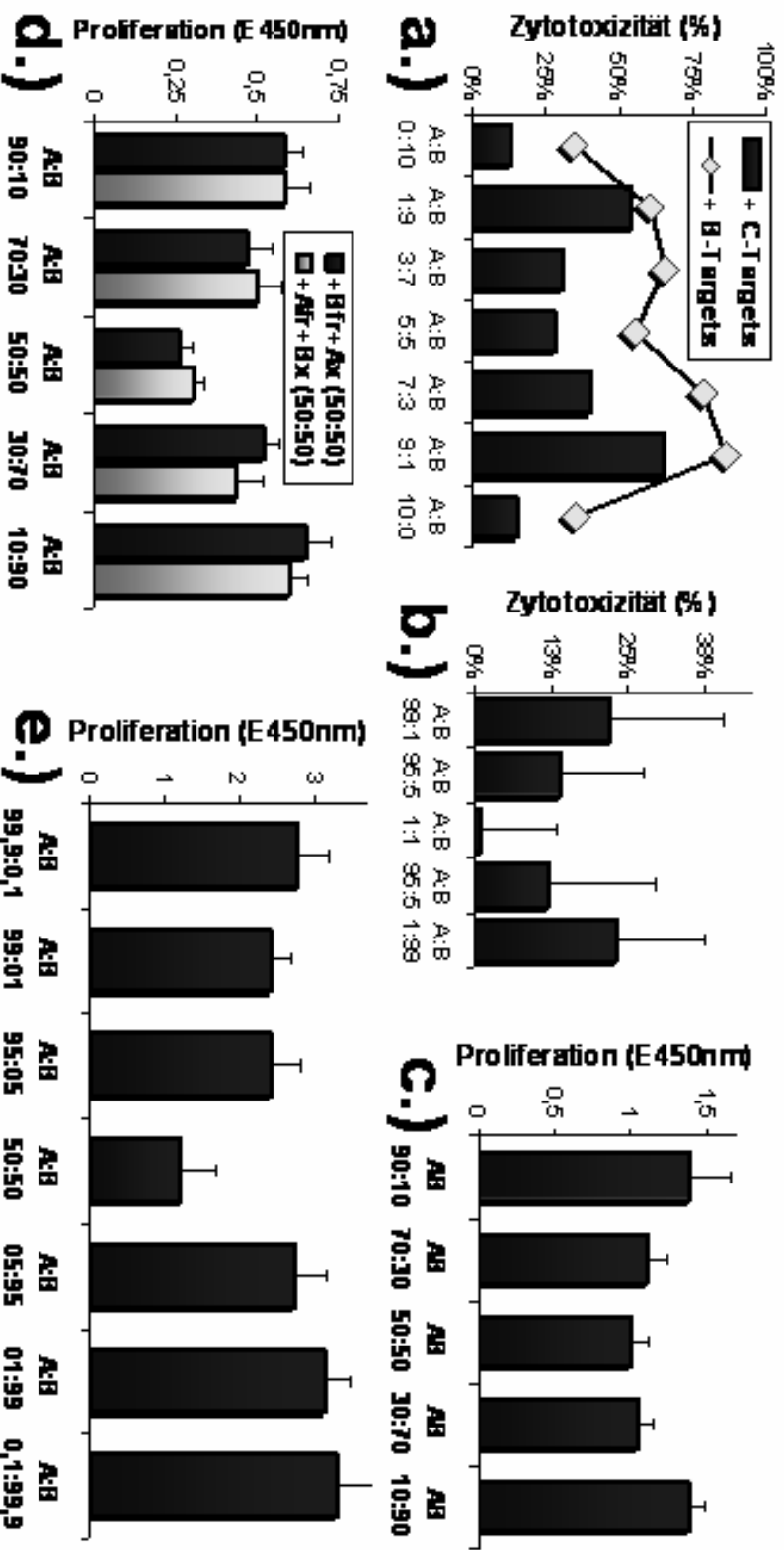


Abb. 13. Einfluss der Responder-Stimulator-Zellratio auf Proliferation und zellvermittelte Zytotoxizität in einer MLR. PBMC zweier Individuen (A und B) wurden in verschiedenen Verhältnissen in eine MLR (9 Tage) eingesetzt (Zellkonzentration konstant 1 Mio Zellen/ml). Grafisch dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 4 (Zytotoxizität) bzw. 8 (Proliferation) individuellen Proben. Abb. 13.a. Prüfung der Antigen-spezifität der Suppression. Abb. 13.b. zeigt die Ausweitung der Ratio bis auf 99:1. Abb. 13.c. zeigt die Suppression der Proliferation bei einer Ratio von 1. Abb. 13.d. beschreibt die Übertragung der Suppressorzellen auf eine frische MLR. Abb. 13.e. zeigt die Proliferation bei Ratio nahe Null. Die dargestellte Suppression der Proliferation bei einer Ratio von 50:50 ist in allen Fällen statistisch signifikant ($P < 0,001$; Kruskal-Wallis-Test).

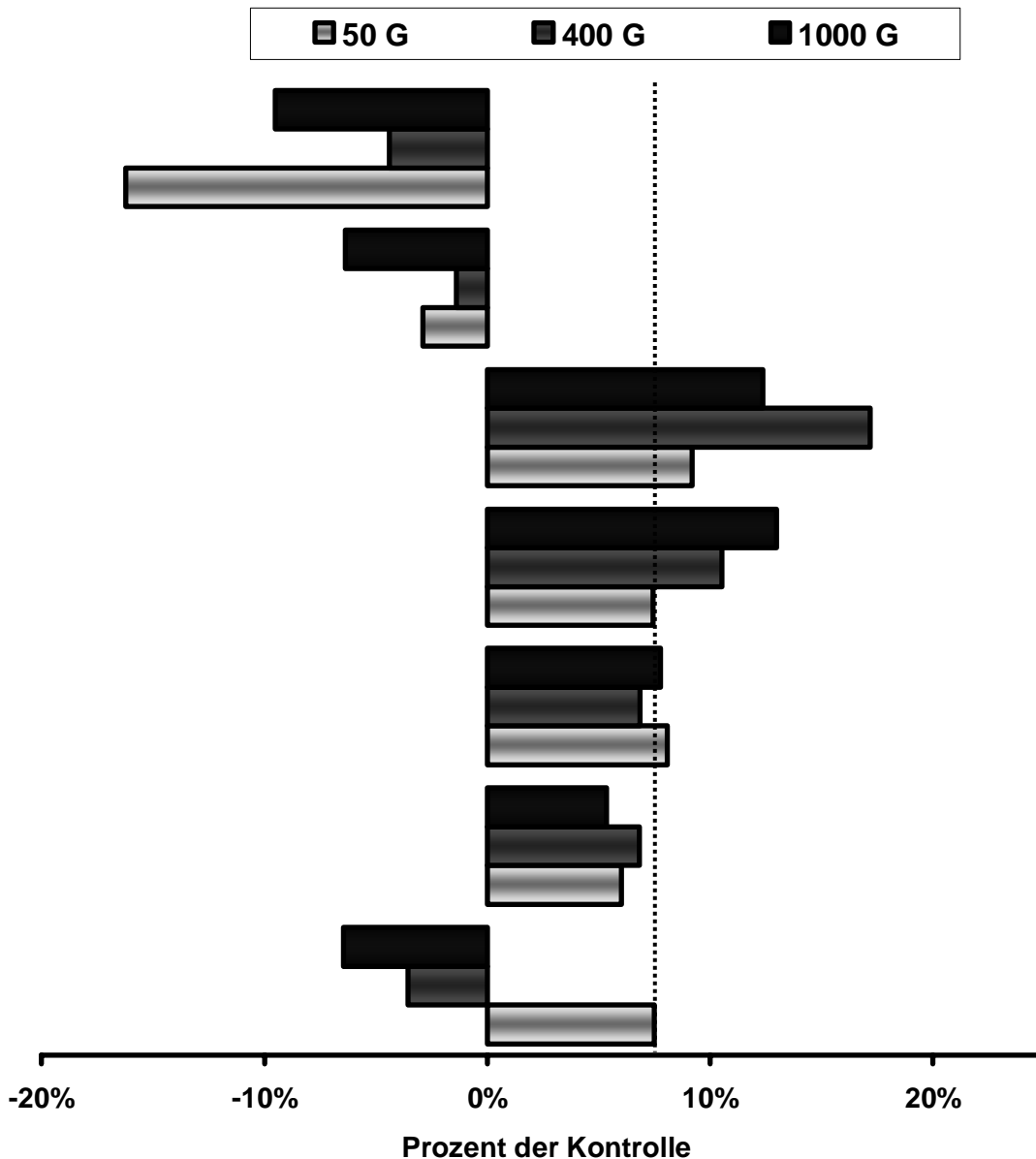


Abb.14.a. Einfluss immunmodulierender Substanzen auf die durch Zentrifugation bedingte Zellannäherung induzierte Suppression. Nach dem Zusatz der Testsubstanzen wurden die PBMC mit den angegebenen Gravitationen zentrifugiert und 48 Stunden lang inkubiert. Anschließend wurden die Substanzen ausgewaschen, die Zellen inaktiviert und als Regulatorzellen in eine 6-tägige MLR eingesetzt. Dargestellt ist die prozentuale Veränderung der Zellaktivität gegenüber der nicht zentrifugierten Kontrolle. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus jeweils 6 individuellen Proben ermittelt. Wie in den Vorversuchen zeigt sich bei der unbehandelten Referenz eine Steigerung der Zellaktivität bei leichter Annäherung und dann eine von der Gravitation abhängige Suppression. Diese Suppression kann durch Cimetidin und Tolbutamid verhindert werden. Propranolol und DMPX vermögen überdies die Aktivität noch weiter zu steigern. Als Negativreferenzen dienen Molsidomin und Methylprednisolon.

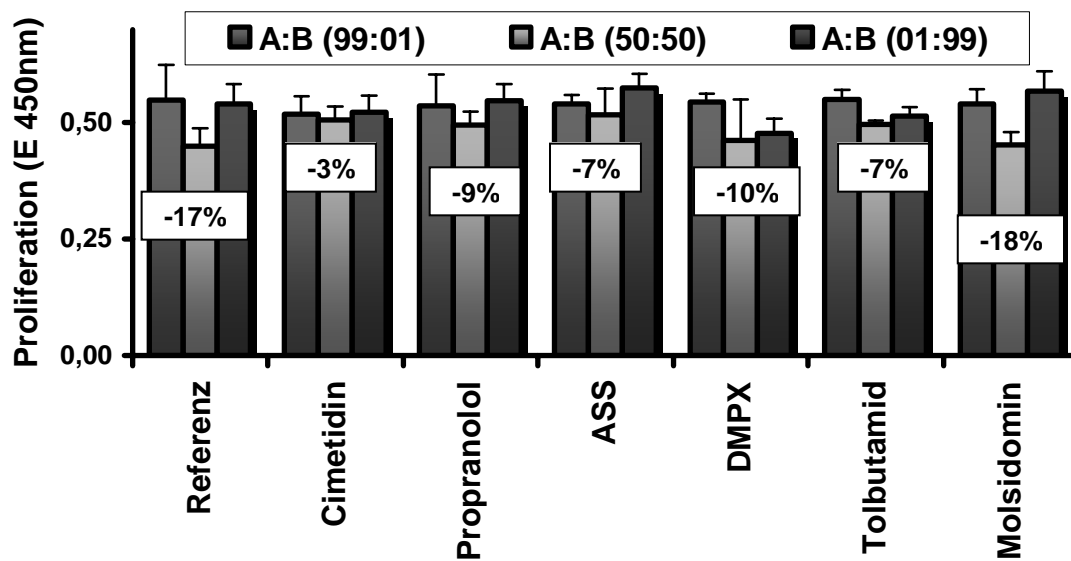


Abb.14.b. Einfluss immunmodulierender Substanzen auf die durch äquales Zellverhältnis induzierte Suppression. Den MLR mit angegebener Zellratio wurden 48 h lang Testsubstanzen zugesetzt. Nach Auswaschen und Inaktivieren wurden die Regulatorzellen in eine frische 6-tägige MLR eingesetzt. Grafisch dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 6 individuellen Proben. Die Suppression in der Referenzgruppe ist statistisch signifikant ($P=0,001$). Die Mittelwerte bei 50:50 unter Zusatz von Cimetidin oder Tolbutamid sind statistisch signifikant gegenüber der unbehandelten Referenz erhöht und nicht mehr statistisch signifikant von den jeweiligen 99:1/1:99-Referenzen verschieden ($P<0,001$; Kruskal-Wallis-Test).

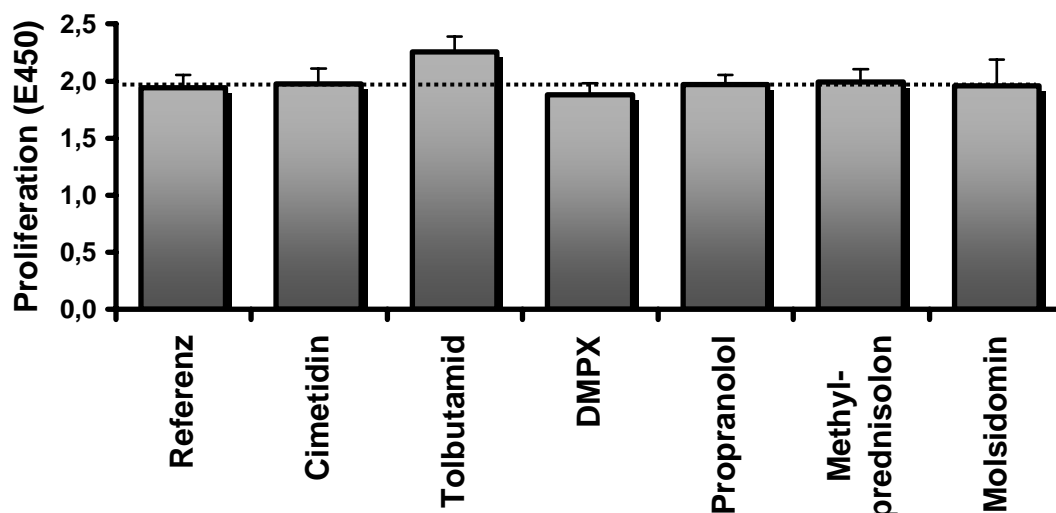


Abb.14.c. Einfluss immunmodulierender Substanzen auf die durch hohe Zellkonzentration induzierte Suppression. Dargestellt ist die Proliferation nach einer 6-tägigen MLR bei einer Zellkonzentration von 4 Mio Zellen / ml. Im Vergleich zum in Abb.13a. dargestellten Versuch bleibt der enge Zell-Zell-Kontakt während der MLR erhalten. Nur Tolbutamid kann die Suppression statistisch signifikant gegenüber der unbehandelten Referenz aufheben ($P=0,002$; Kruskal-Wallis-Test für unverbundene Stichproben).

3.3. Testung von Immunmodulatoren im etablierten Testsystem

Nach methodischer Etablierung sollten im Indikatorsystem verschiedene Substanzen getestet werden. Eine tabellarische Übersicht über die Ergebnisse und die statistische Auswertung befindet sich im Anhang (S. A2-3).

3.3.1 Mitomycin C: prä versus post Lektinstimulation

Zunächst sollte nochmals der Effekt von MMC im etablierten Indikatorsystem beschrieben werden. Abb.15.a zeigt die deblockierende Wirkung von MMC bezüglich der zellvermittelten Zytotoxizität. Die Unterschiede von Prae und Post jeweils gegenüber der Referenz sind statistisch signifikant ($P < 0,001$), Prae und Post dagegen zeigen keinen statistisch signifikanten Unterschied. Der zytotoxizitätsfördernde Effekt von MMC ist demnach sowohl sofort nach dem Auftauen, als auch nach 48 Stunden Erholungszeit reproduzierbar. Abb.15.a zeigt zudem, dass sich durch Zusatz von Concanavalin A im Modul A gleiche Ergebnisse reproduzieren lassen ($P < 0,001$). PHA in der Vorinkubation, als Einzelsubstanz oder in Kombination mit ConA (Abb.15.b), fördert die zellvermittelte Zytotoxizität noch stärker, wenn die PBMC nach (Post) der Proliferation mit MMC inaktiviert werden. Werden die PBMC zuerst (Prae) mit MMC behandelt und dann dem Proliferationsreiz ausgesetzt, beobachtet man eine Suppression der zellvermittelten Zytotoxizität (Abb.15.b). Fast identische Ergebnisse zeigen sich bezüglich der Proliferation in der MLR (Vgl. Abb.14.a und Abb. 14.b.). Im PHA-Proliferationstest (Abb.14.c) sind dagegen mehrere bemerkenswerte Ergebnisse zu beschreiben. Erstens ist die prozentuale Steigerung der Proliferation gegenüber der Referenz durch Vorinkubation mit Lektinen wesentlich stärker ausgeprägt als bei MLR und CMC. Zweitens beobachtet man eine deutliche Überlegenheit der Vorinkubation mit PHA gegenüber ConA. Drittens bewirkt die MMC-Inaktivierung der PBMC vor (Prae) Lektinstimulation eine deutlich stärkere Proliferation im PHA-Proliferationstest als die post-mitogene MMC-Behandlung.

3.3.2. Testung von Pharmaka im Testsystem

Als Basis für weitere Versuchsreihen wurden exemplarisch verschiedene Pharmaka in das Testsystem eingesetzt und die immunologische Wirkung gemessen. Tabelle 4 zeigt die Mittelwerte der 8-fach bestimmten Einzelwerte als Übersicht.

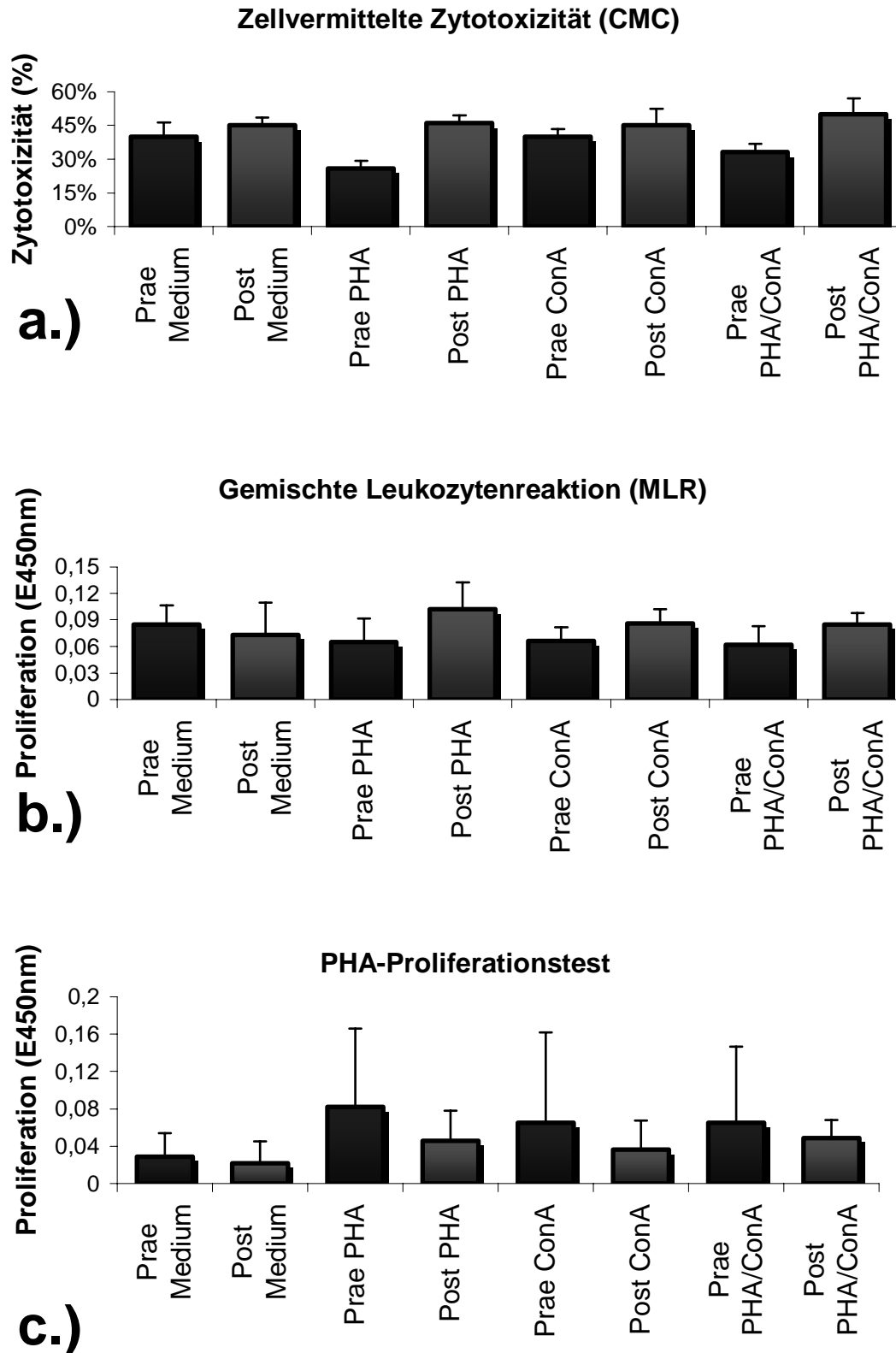


Abb.15. Abhängigkeit der Regulatorzellfunktion von Proliferationsfähigkeit und Lektinstimulation während der Vorinkubation. Der Versuchsaufbau ist in Abb.2 illustriert. Grafisch dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 8 individuellen Proben. Die Abnahme der zellvermittelten Zytotoxizität gegenüber der unbehandelten Referenz bei Koinkubation mit PHA nach vorheriger MMC-Inaktivierung ist statistisch signifikant ($P < 0,001$, Kruskal-Wallis-Test für unverbundene Stichproben).

a) Testgruppe 1: Propranolol und Tolbutamid (Abb.17 und Abb.18)

Die erste Testsubstanz war Propranolol, weil es (a) ein sehr weit verbreitetes Medikament ist, und (b) in vielen Vorversuchen des eigenen Labors positive immunologische Wirkungen bewiesen hatte. Propranolol steigert die zellvermittelte Zytotoxizität durch direkte Einwirkung auf die Regulatorzellen ohne Proliferation statistisch signifikant gegenüber der Referenz (Abb.17.a1). Bei ruhenden Regulatorzellen spielt der Zeitpunkt der MMC-Behandlung, Prae oder Post, keine Rolle. Werden die Zellen mit Lektinen stimuliert, kommt es nur zur Steigerung der Zytotoxizität, wenn die Proliferation der Zellen durch vorherige MMC-Inaktivierung verhindert wird. Propranolol wirkt demnach nur auf nicht proliferierende Regulatorzellen zytotoxizitätsfördernd. Durch MMC kann bei mitogener Stimulation die durch Proliferation induzierte Suppression verhindert werden (Abb. 17.a1-2 und Abb.18.a1-2). Auch in der gemischten Leukozytenreaktion und im PHA-Proliferationstest zeigt sich ein immunstimulierender Effekt von Propranolol auf ruhende Regulatorzellen unabhängig vom Zeitpunkt der MMC-Inaktivierung (Abb. 17.b1/c1). Im Gegensatz zur zellvermittelten Zytotoxizität kommt es jedoch bei mitogener Stimulation der Regulatorzellen mit anschließender MMC-Inaktivierung (Post) zu einer Stimulation der Proliferation. Umgekehrt führt eine vorherige MMC-Behandlung (Prae) zur Suppression (Abb. 17.b2/c2, Abb.18.b1-2/c1-2). Die Blockade der beta-adrenergen Rezeptoren der Lymphozyten bewirkt bei ruhenden Zellen die Potenzierung von zellvermittelter Zytotoxizität und Proliferation auf spezifische und unspezifische Stimulation. Stimuliert man die Zellen zur Proliferation während der Rezeptorblockade, kommt es zur Suppression der regulierten Zytotoxizität und zur Stimulation der regulierten Proliferation. Verhindert man die mitogen induzierte Proliferation durch MMC, dann potenziert sich die regulierte Zytotoxizität, und die regulierte Proliferation wird supprimiert. Tolbutamid als Vertreter der Blocker ATP-sensitiver Kaliumkanäle zeigte sich in den Vorversuchen potent in der Verhinderung der durch Zellverhältnis oder Zentrifugation induzierten Suppression, so dass die Wirkung im etablierten Testsystem genauer charakterisiert werden sollte. Tolbutamid ist ohne statistisch signifikante Wirkung auf ruhende PBMC (Abb.17.a1). Wie erwähnt, führt die mitogene Stimulation MMC-inaktivierter Zellen mit Lektinen zur Suppression der zellvermittelten Zytotoxizität. Zugabe des Kaliumkanalblockers Tolbutamid verhindert diese Suppression und kann darüber hinaus die zytotoxische Aktivität auf Werte entsprechend Propranolol steigern (Abb.17.a2, Abb.18.a1-2). Auf proliferierende Zellen wirkt Tolbutamid dagegen suppressiv. Generell keinen Einfluss hat Tolbutamid auf die Proliferationstendenz der regulierten Zellen, weder in der MLR, noch im PHA-Proliferationstest (Abb.17.b1-2/c1-2, Abb.18.b1-2/c1-2). Die Kombination von Propranolol und Tolbutamid zeigte zwar ebenfalls statistisch signifikante immunpotenzierende Effekte in allen drei Testsystemen (Abb.17.a1, Abb.17.b1., Abb.17.c1), die jedoch kaum stärker als die Einzelsubstanzen waren und deshalb nicht weiter charakterisiert wurden.

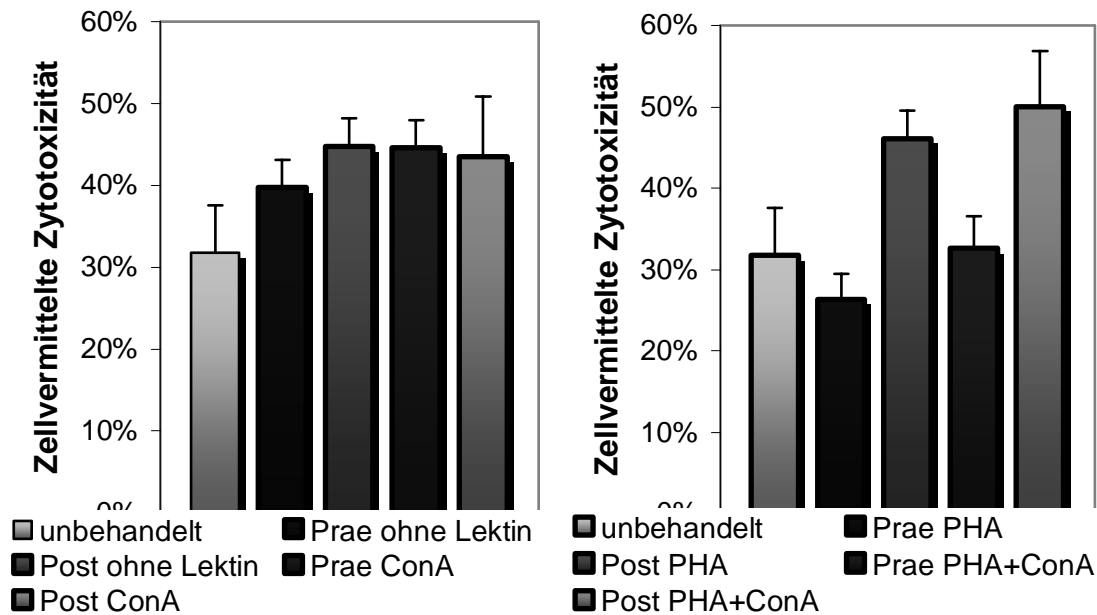


Abb.16. Abhängigkeit des deblockierenden Effektes von Mitomycin C (MMC) auf Regulatorzellen von der lektinstimulierten Proliferation. Regulatorzellen wurden vor (Prae) bzw. nach (Post) einer 48-stündigen Vorinkubation mit MMC inaktiviert und in eine MLR eingesetzt. Der Zusatz von Lektinen (Concanavalin A, Phytohämagglutinin) zur Vorinkubation sollte evaluiert werden. Die zellvermittelte Zytolyse von Zielzellen wurde bestimmt. Grafisch dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 8 individuellen Proben. Abb.15a. zeigt die immunstimulierende Wirkung von MMC auf ruhende PBMC (unbehandelt) und auf ConA-stimulierte, proliferierende Zellen. Abb.15b. zeigt die Stimulation der Zytotoxizität unter PHA- bzw. PHA/ConA-Stimulation nur bei proliferationsfähigen Zellen. Die dargestellte Immunstimulation gegenüber der unbehandelten Referenz ist statistisch signifikant ($P < 0,001$; Kruskal-Wallis-Test für unverbundene Stichproben).

b) Testgruppe 2: Ranitidin/Cimetidin und Sulpirid (Abb.19)

Ranitidin, Cimetidin und Sulpirid führen als Einzelsubstanzen und als Kombination zu einer statistisch signifikanten Suppression der zytotoxischen Aktivität (Abb.19.a1-3). Auch die Zugabe von Tolbutamid konnte diese Wirkung nicht aufheben. Statistisch ohne Wirkung bzw. ebenfalls suppressiv beeinflussten die Substanzen die Proliferation in der MLR und im PHA-Proliferationstest. Dabei zeigt sich eine besonders starke Induktion suppressiver Zellen bei anschließend mit MMC behandelten Zellen (Post).

c) Testgruppe 3: Indomethacin/Diclofenac (Abb.20)

Indomethacin führt zu einer statistisch signifikanten Steigerung der Zytotoxizität bei Stimulation mit PHA oder ConA mit anschließender MMC-Inaktivierung. Diclofenac ist ohne statistisch signifikante Wirkung in diesen Ansätzen. (Abb.20.a1,2). In den Proliferationstests zeigten sich keine immunpotenzierenden Wirkungen.

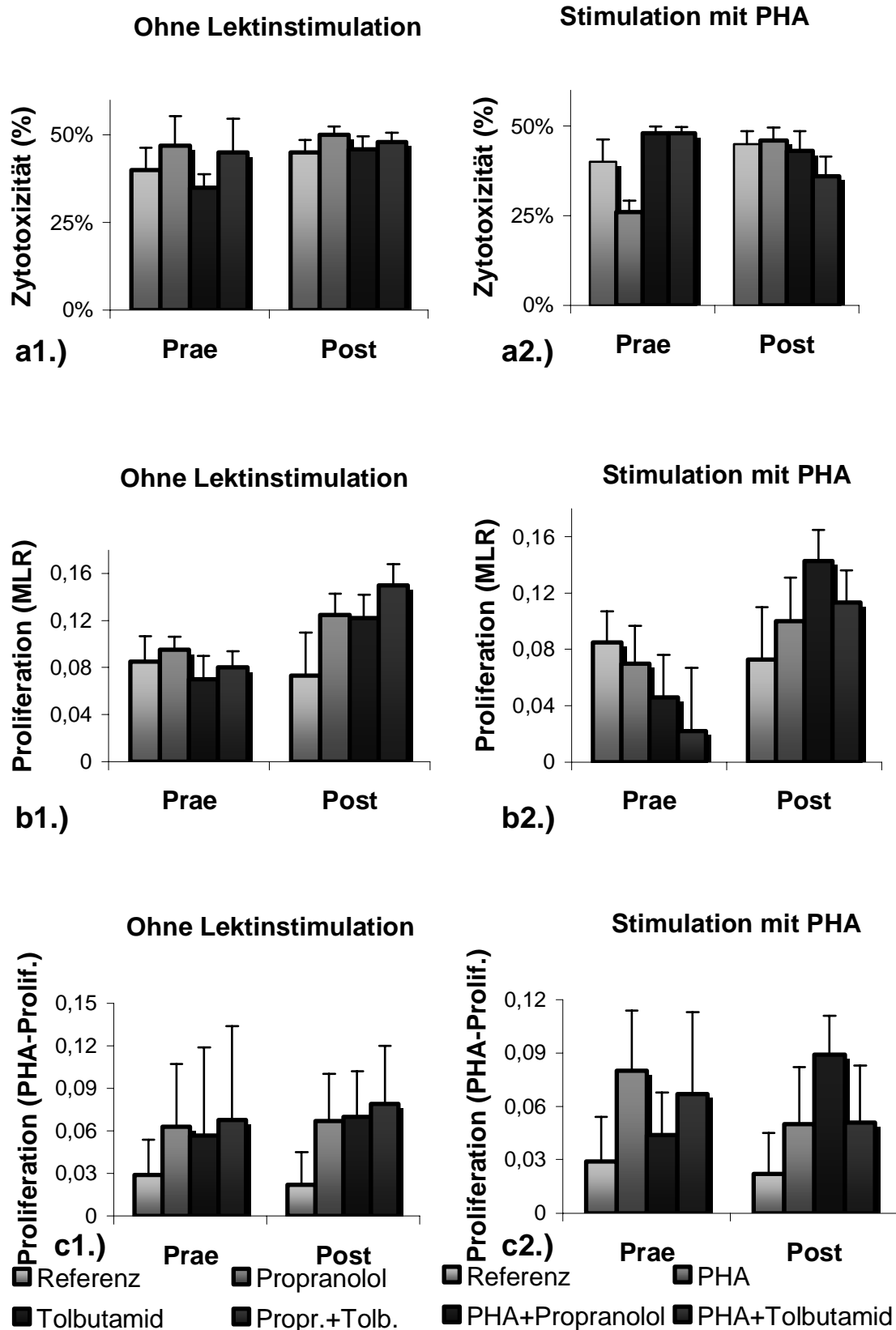


Abb.17. Immunmodulierende Wirkung von Propranolol und Tolbutamid. Abhängigkeit von PHA-Stimulation der Regulatorzellen. Versuchsaufbau wie in Abb.2 beschrieben. Auswertung von zellvermittelter Zytotoxizität (Abb.17.a1-2.) und Proliferation in der MLR (Abb.17.b1-2.) sowie im PHA-Proliferationstest (Abb.17.c1-2.). Grafisch dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 8 individuellen Proben. Die statistische Auswertung der Ergebnisse beschreibt Tabelle 4.

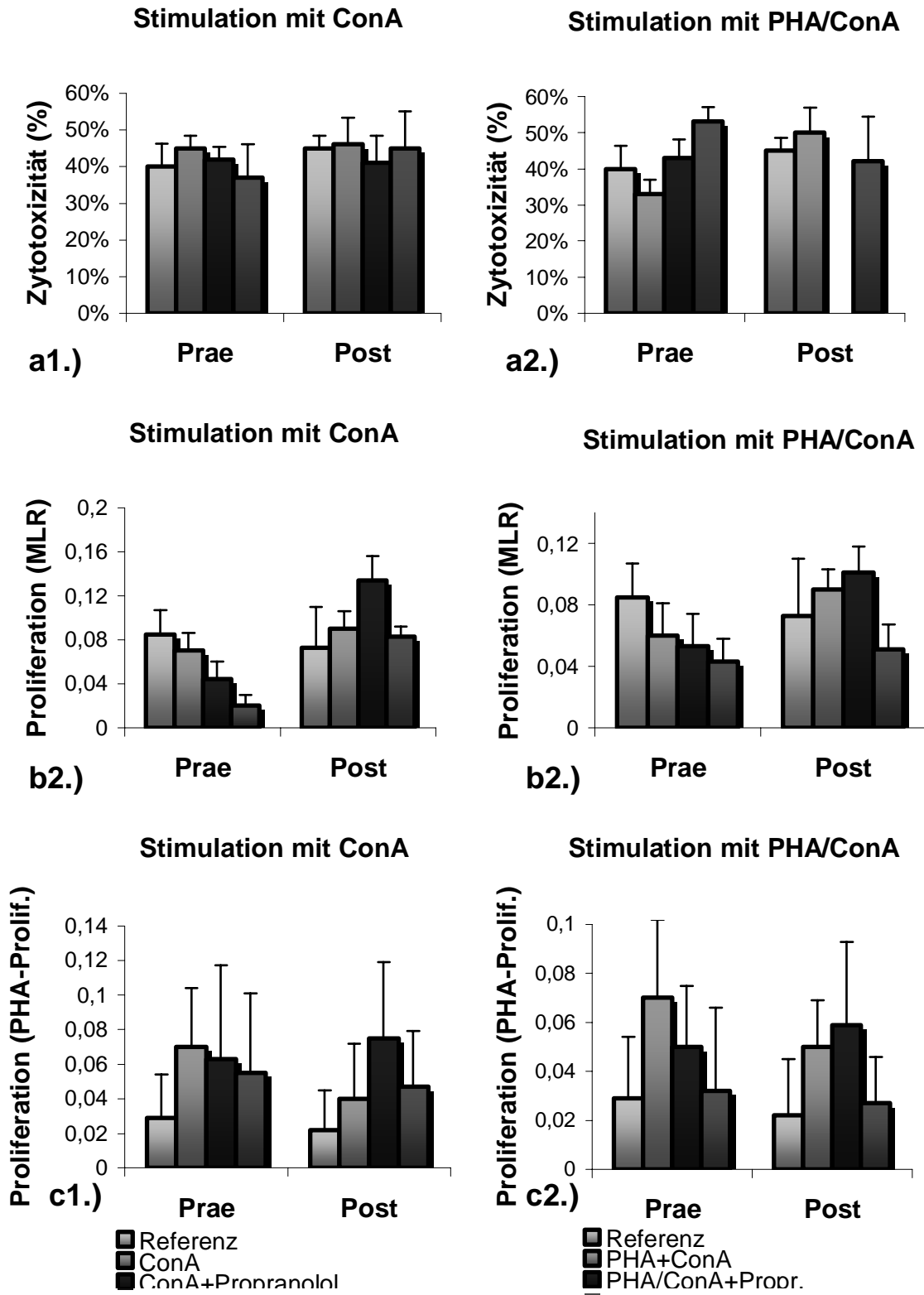


Abb.18. Immunmodulierende Wirkung von Propranolol und Tolbutamid. Abhängigkeit von PHA- und/oder ConA-Stimulation der Regulatorzellen. Versuchsaufbau wie in Abb.2 beschrieben. Auswertung von zellvermittelter Zytotoxizität (Abb.18.a1-2.) und Proliferation in der MLR (Abb.18.b1-2.) sowie im PHA-Proliferationstest (Abb.18.c1-2.). Grafisch dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 8 individuellen Proben. Die statistische Auswertung der Ergebnisse beschreibt Tabelle 4.

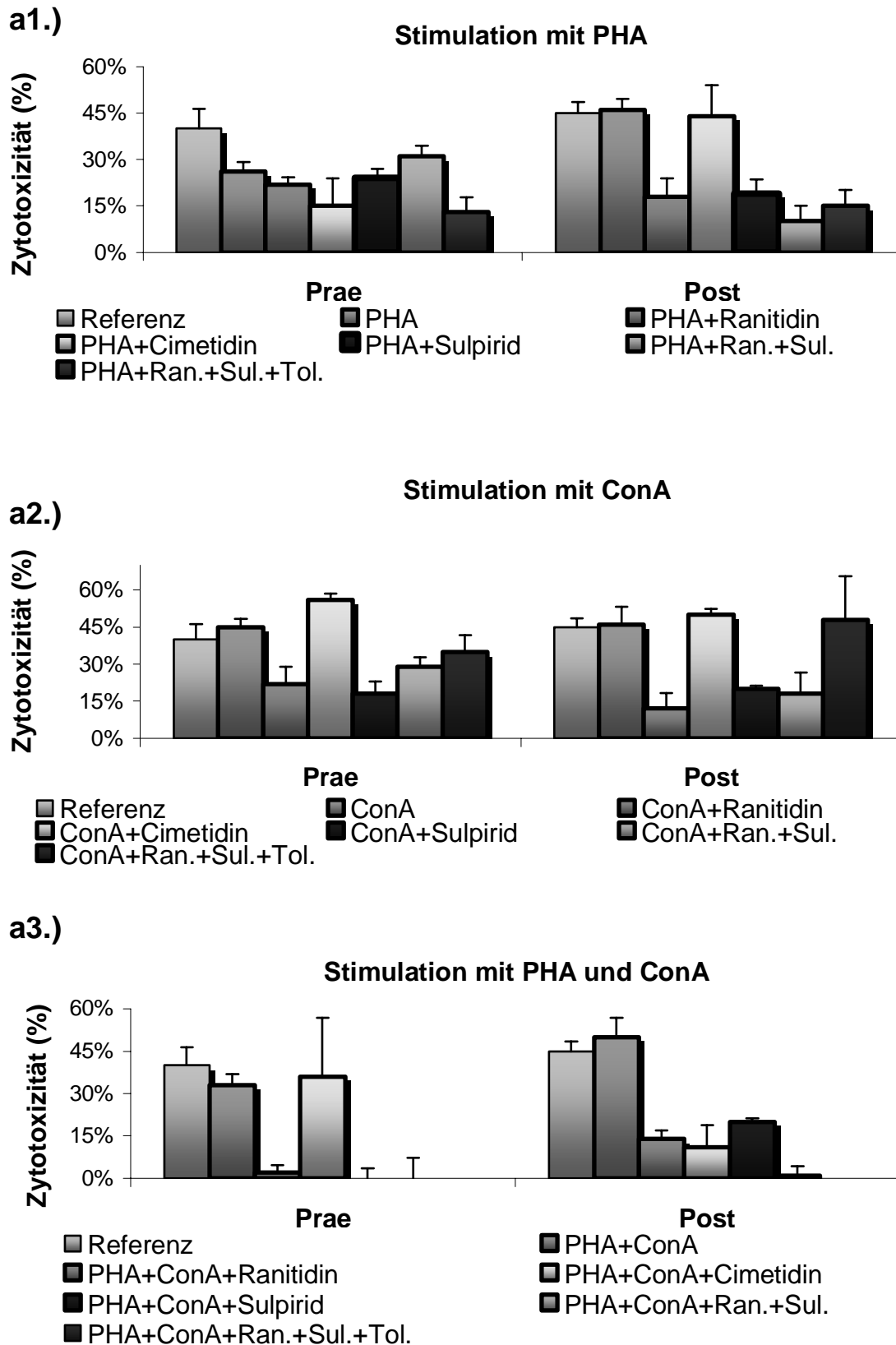
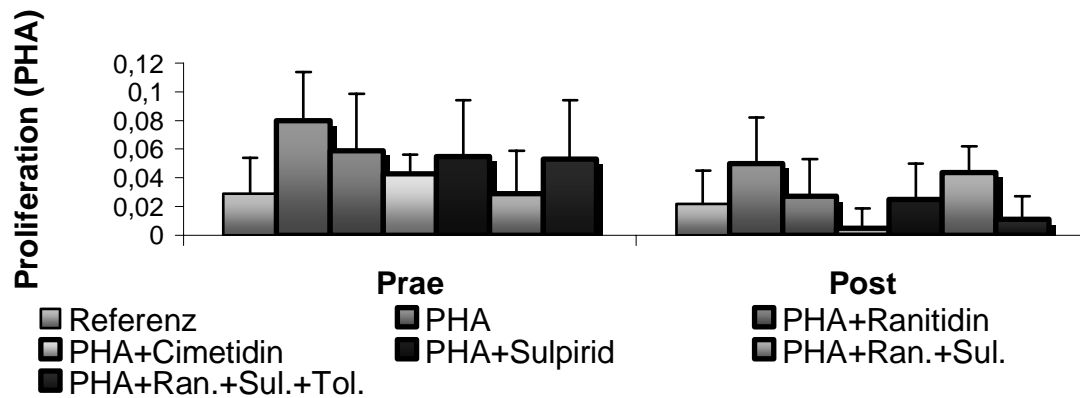


Abb.19.a. Immunmodulierende Wirkung von Ranitidin, Cimetidin, Sulpirid. Einfluss der Regulatorzellen auf die zellvermittelte Zytotoxizität. Versuchsaufbau wie in Abb.2 beschrieben. Grafisch dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 8 individuellen Proben. Die statistische Auswertung der Ergebnisse beschreibt die Tabelle 4 (Kruskal-Wallis-Test für unverbundene Stichproben).

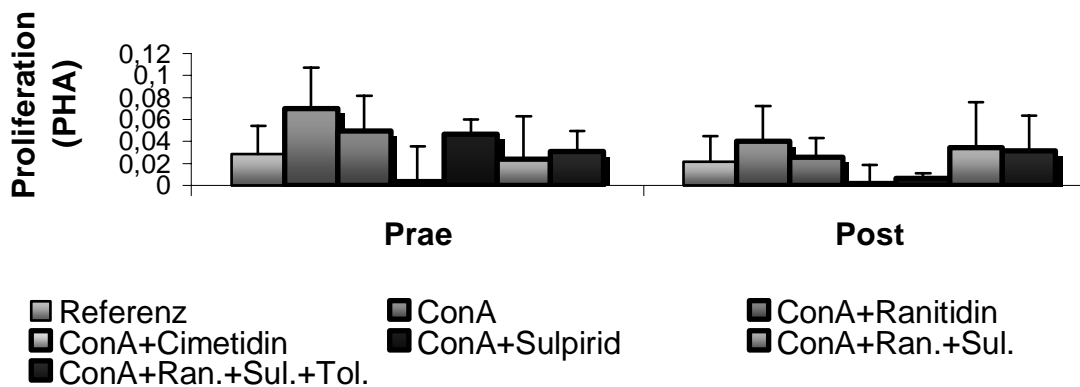
c1.)

Stimulation mit PHA



c2.)

Stimulation mit ConA



c3.)

Stimulation mit PHA und ConA

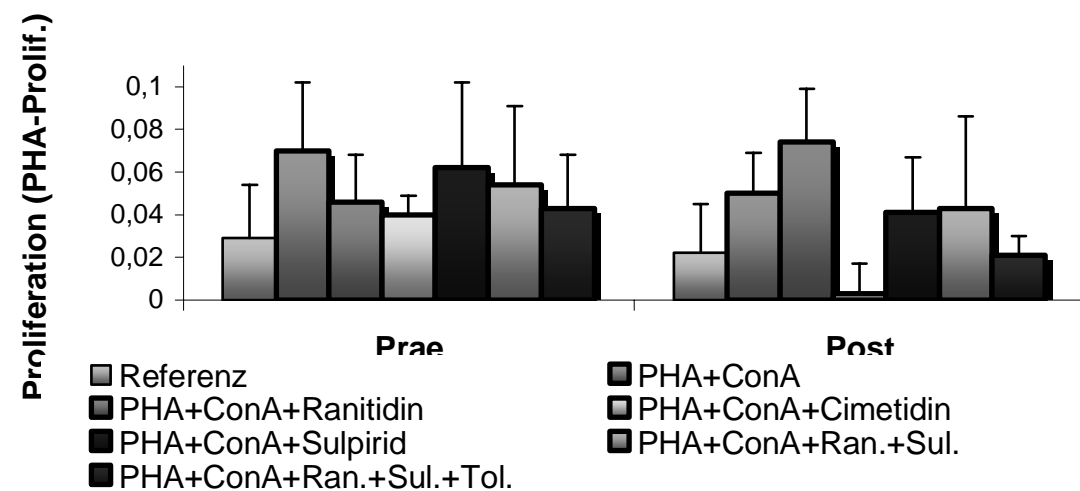
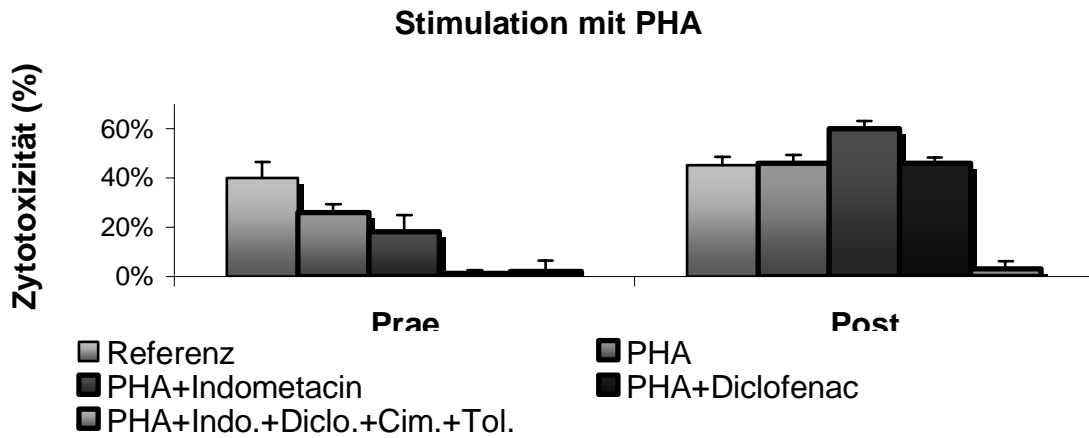
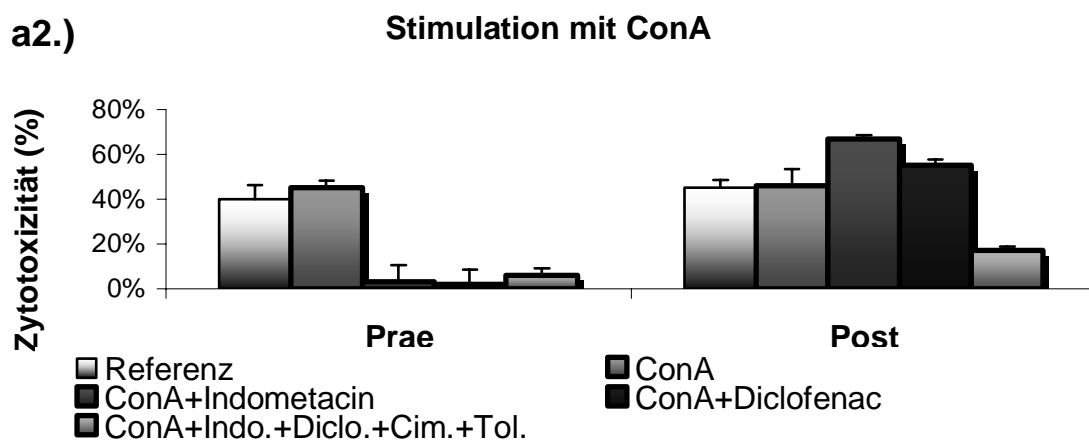


Abb.19.c. Immunmodulierende Wirkung von Ranitidin, Cimetidin, Sulpirid. Einfluß der Regulatorzellen auf die Proliferation im PHA-Proliferationstest. Versuchsaufbau wie in Abb.2 beschrieben. Grafisch dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 8 individuellen Proben. Die statistische Auswertung der Ergebnisse beschreibt die Tabelle 4 (Kruskal-Wallis-Test für unverbundene Stichproben).

a1.)



a2.)



a3.)

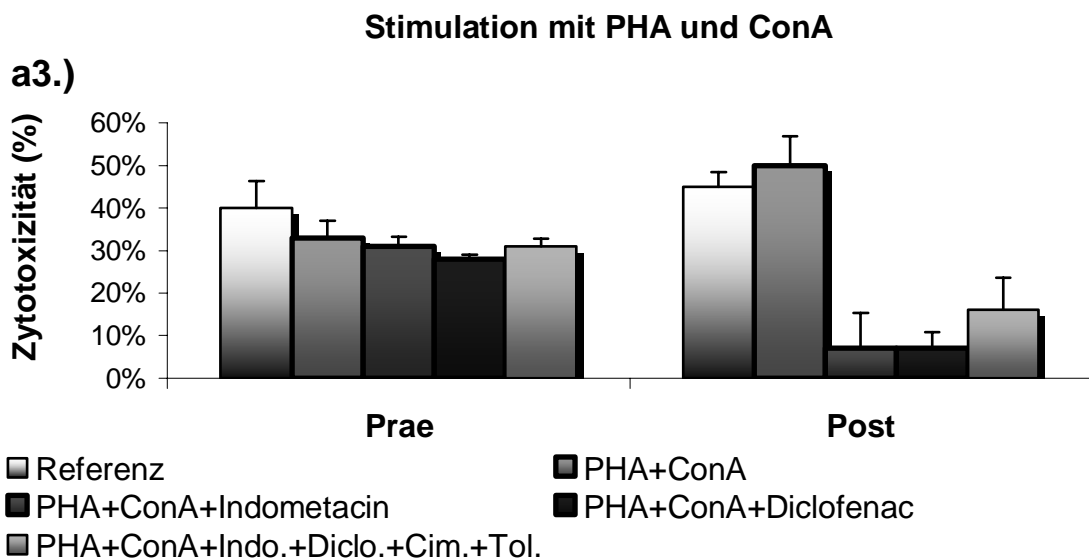


Abb.20.a. Immunmodulierende Wirkung von Diclofenac und Indomethacin. Einfluss der Regulatorzellen auf die zellvermittelte Zytotoxizität. Versuchsaufbau wie in Abb.2 beschrieben. Grafisch dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 8 individuellen Proben. Die statistische Auswertung der Ergebnisse beschreibt die Tabelle 4 (Kruskal-Wallis-Test für unverbundene Stichproben).

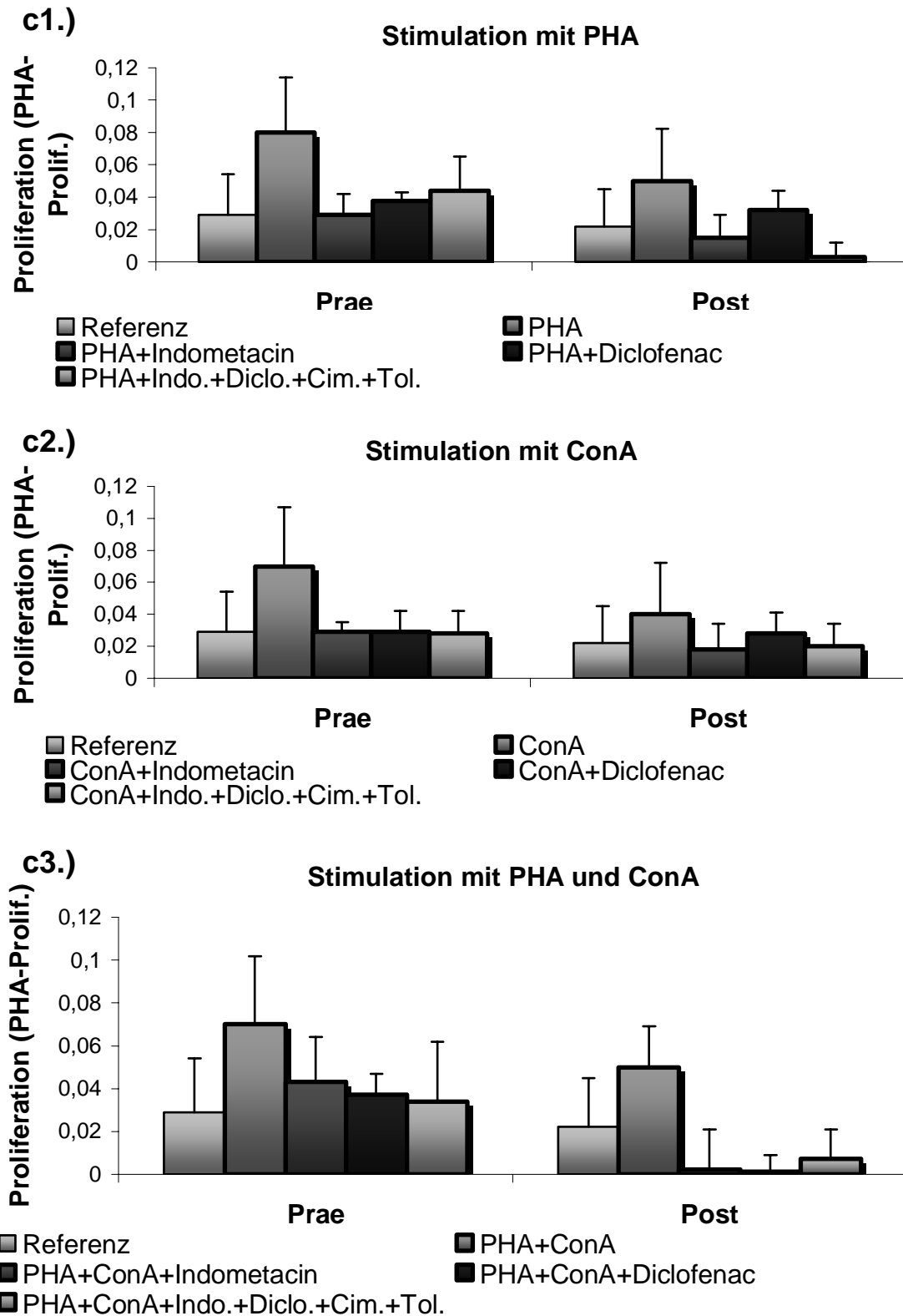


Abb.20.c. Immunmodulierende Wirkung von Diclofenac und Indomethacin. Einfluss der Regulatorzellen auf die Proliferation im PHA-Proliferationstest. Versuchsaufbau wie in Abb.2 beschrieben. Grafisch dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 8 individuellen Proben. Die statistische Auswertung der Ergebnisse beschreibt die Tabelle 4 (Kruskal-Wallis-Test für unverbundene Stichproben).

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Methoden

Die Auswahl der Methoden bestimmt das Ergebnis wesentlich mit.

Als relevante abhängige Variablen wurden die zellvermittelte Lympholyse und die Proliferation auf mitogene (Phytohämagglutinin und Concanavalin A) und allogene (MLR) Stimulation gewählt. Dabei wurden Tests angewandt, die keine radioaktive Belastung bzw. Gefährdung von Umgebung und beteiligten Personen darstellen, aber in ausreichender Korrelation zum Cr-Release-Assay für die zellvermittelte Zytotoxizität und dem Thymidin-Einbau zur Messung der Proliferation stehen (103, 164, 193, 207). Da Hintergrund bzw. Aussichten der Arbeit Vakzinestrategien sind, wurden als Beobachtungseinheit mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) gewählt (5), weil sie ausreichend das spezifische Immunsystem repräsentieren. Mittels Ficoll-Histopaque-Technik können 70% der Lymphozyten des Vollblutes isoliert werden bei weitgehendem Erhalt der relativen Leukozytenunterklassen und nur geringer Verunreinigung durch Granulozyten oder Erythrozyten (128). Bewusst wurde darauf verzichtet, nur mit einzelnen Subpopulationen von Leukozyten zu arbeiten, da nach der theoretischen Immunologie die enge Kooperation verschiedener Immunzellen zur Generierung einer effektiven Immunantwort notwendig ist (162, 170) und Versuche anderer Autoren diese Problematik im methodischen Alltag beschreiben (4). Zusätzlich zur funktionellen Charakterisierung wäre eine Phänotypisierung zu erwägen gewesen. Der zusätzliche Erkenntnisgewinn in Anbetracht der Schwierigkeiten bezüglich der phänotypischen Unterscheidung der einzelnen T-Lymphozytensubsets (Ts, Tc, Th1, Th2) und der Tatsache, dass andere Autoren bereits Schwierigkeiten bei der Charakterisierung der Lymphozytensubsets trotz signifikanter funktioneller Änderungen beschrieben haben (18, 137), wurde als zu gering eingeschätzt. Unabhängige, relevante Variablen des Testsystems waren die 48-stündige Koinkubation der Regulatorzellen mit immunmodulierenden Pharmaka mit oder ohne mitogene Stimulation der Zellen bei vorheriger (Prae) oder nachfolgender (Post) Inaktivierung der Regulatorzellen mit Mitomycin C (siehe Abb. 2, S.26). Wie die eigenen Ergebnisse zeigen, sind alle Regulatorzellen zum Zeitpunkt der funktionellen Auswertung abgestorben und nur die Wirkung der Effektorzellen der MLR gehen in die Auswertung ein. Dieses Vorgehen entspricht der Rationale der Einführung der Einweg-MLR (172). Die MLR, klassischerweise ein *in vitro* Modell der Transplantationsimmunologie (12), wird im beschriebenen Falle als Modell zur Beeinflussung des Rezipienten-Immunsystems durch Donor-Vakzinezellen verwendet. Gemessen wurde jeweils gegen eine unbehandelte Referenzgruppe. Für jeden Versuchsansatz wurden Werte von, wenn nicht abweichend angegeben, acht individuellen Proben erhoben und Mittelwert sowie Standardabweichung berechnet. Da auf Grund der kleinen Stichprobe keine zuverlässige Aussage möglich war, ob die Messwerte normal verteilt sind, wurde zum Vergleich von mehreren

unverbundenen Stichproben der Kruskal-Wallis-Test zur statistischen Auswertung auf Unterschiede verwandt. Anschließend wurden die Stichproben entweder alle paarweise mit Hilfe der Tukey-Methode oder gegen eine Referenz mit Hilfe der Dunnett-Methode getestet. Die Berechnung erfolgte computergestützt mit der Software SigmaStat (Jandel Scientific), die deskriptive statistische Auswertung mit Microsoft Excel. Die Variationskoeffizienten der eigenen Ergebnisse bewegen sich durchgehend in dem auch von anderen Autoren beschriebenen Bereich und können durch die im Vergleich hohe Zahl individueller Einzelmessungen aussagekräftig beurteilt werden (93). Da Leukozyten ohne HLA-Testung eingesetzt wurden, waren prinzipiell alle MHC-Kombinationen möglich. In den Vorversuchen zeigten sich keine statistisch signifikanten, interindividuellen Variabilitäten zufällig ausgesuchter Spender. Die Basis der MLR ist es nun eben, Unterschiede in der MHC-Inkompatibilität herauszuarbeiten, und daher ist generell mit statistisch signifikanten, interindividuellen Variabilitäten und auch non-Respondern zu rechnen (197). Deshalb wurden bei zu vergleichenden Versuchen Leukozyten der identischen Spender verwendet. Die technischen Variabilitäten sind ohnehin gegenüber den biologischen zu vernachlässigen (197). Die Validität der *in vitro* Testmethode muss durch Einsatz der verwendeten Substanzen in weiteren Tierexperimenten überprüft werden.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

4.2.1. Diskussion der methodischen Etablierung eines Testsystems zur Bestimmung immunmodulierender Eigenschaften von Pharmaka auf Regulatorzellen

Als optimale Zeitdauer für die primäre MLR wurden in den Vorversuchen 9 Tage ermittelt, was den Ergebnissen anderer Autoren entspricht (172). Als Konzentrationsoptimum für die MMC-Inaktivierung der Regulatorzellen wurde nach den Kriterien, dass 80% der Zellen den ersten Tag, aber keine den 9. Tag überleben sollten, 5 µg/ml, 10 µg/ml und 20 µg/ml bei 18-stündiger und 40 µg/ml bei 20-minütiger Inkubationszeit ermittelt. Zudem hat sich gezeigt, dass die Überlebensfähigkeit der PBMC nach MMC-Behandlung durch mitogene oder allogene Stimulation abnimmt. Das Monitoring von Anzahl und Vitalität der Zellen im verwendeten System bestätigte das Absterben der Regulator- und Stimulatorzellen innerhalb der geforderten 9 Tage und zeigte eine statistisch signifikante Proliferation der Responderzellen noch am Tag 9. Zudem konnte beobachtet werden, wie die Zugabe verschiedener Mitogene (PHA, ConA) und/oder einer Testsubstanz mit bekannter immunstimulierender Wirkung (Cimetidin) die Proliferation durch direkte Einwirkung auf die Responderzellen statistisch signifikant steigern kann.

Immunmodulierende Wirkung von Mitomycin C (MMC): MMC-Behandlung der Regulatorzellen fördert die zellvermittelte Zytotoxizität der Effektorzellen einer gemischten Leukozytenreaktion (MLR).

Durch Mitogene oder allogene Zellen können in der MLR T-Suppressorzellen mit unspezifischer und HLA-spezifischer Suppression von Proliferation und CTL-Aktivität generiert werden (143). Mechanismus der Suppression der CTL-Aktivität ist nicht die Zytolyse der Stimulatorzellen des neuen MLC und das Fehlen allogener Stimulation für die neuen Responderzellen (146). Die Ergebnisse der Versuche zur Charakterisierung der immunologischen Mitomycin-C-Wirkung zeigen einen in vielen Varianten reproduzierbaren, die zellvermittelte Zytotoxizität steigernden Effekt von Mitomycin C (MMC). Die MMC-behandelten PBMC wurden ausschließlich als Regulatorzellen eingesetzt und nur deren regulatorische Wirkung auf die Effektorzellen der primären MLR gemessen. Wie die eigenen Ergebnisse zeigen, sind die Regulatorzellen zum Zeitpunkt der Auswertung zur Gänze abgestorben und ohne direkten Einfluss auf die gemessenen Werte. Die Kombination aus Immunpotenzierung und Inaktivierung durch MMC ermöglicht den temporären Einsatz von Regulatorzellen zur Immunmodulation. Die zeitliche Begrenzung der Immunstimulation räumt unter anderem die Gefahr aus, dass durch Überaktivierung Suppressorzellen entstehen könnten, wie es in anderen Modellen zu beobachten war (199, 200). Eine immunpotenzierende Eigenschaft von Mitomycin C wurde unter Verwendung unterschiedlicher Methoden bereits von anderen Autoren beschrieben (101). Die direkte Behandlung der Effektorzellen einer MLR mit niedrig dosiertem MMC fördert die zellvermittelte Zytotoxizität durch direkte Effekte auf die adhärierenden Zellen, z.B. gesteigerte Produktion von IL-1 (4). Die MMC-Behandlung der nicht adhärierenden Zellen blieb ohne Einfluss, obwohl diese als Effektorzellen für die zellvermittelte Lympholyse angesehen werden müssen. Dieser indirekte immunmodulierende Effekt spiegelt sich in den eigenen Ergebnissen wieder. Die von der Gruppe beobachtete Suppression der zellvermittelten Zytotoxizität im hohen Konzentrationsbereich ($2,5 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$ versus $2,5 \times 10^{-2} \mu\text{g/m}$ und $2,5 \times 10^{-3} \mu\text{g/m}$) steht nicht im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen, da in den eigenen Versuchen die Regulatorzellen und nicht die Effektorzellen mit MMC behandelt wurden (4). Ein zu starker Zellschaden wirkt sich demnach nicht auf die Testvariable aus. Bei Krebspatienten kann mit einer einzigen intravenösen MMC-Applikation die Ausbeute und zytolytische Aktivität lymphokinaktivierter Killerzellen (LAK) gesteigert werden, wobei sich in vivo phänotypisch eine statistisch signifikante Abnahme der Suppressor-Inducer-Zellen (CD4+ Leu8+), aber keine Änderung der Zahl der Suppressor-Zellen (CD8+ CD11+) zeigt (137). Mitomycin C bietet sich deshalb zur Kombination mit anderen Immuntherapien, insbesondere in der Krebstherapie, an (9). Auch andere, ausgewählte Zytostatika, wie Adriamycin oder Cyclophosphamid, haben immunpotenzierende Eigenschaften, wohingegen z.B. Methotrexat

oder Vincristin diese Eigenschaft fehlt (182). Im Gegensatz zu Mitomycin C ist Cyclophosphamid bezüglich seiner immunstimulierenden Wirkung bereits besser untersucht. Cyclophosphamid kann eine ablaufende Immunreaktion, z.B. eine Kontaktallergie zwei Tage nach Antigenexposition, effektiv supprimieren (203) und findet in dieser Funktion breite klinische Anwendung. Appliziert man dagegen Cyclophosphamid drei Tage vor der Antigenexposition, kann man die verzögerte zelluläre Immunantwort (DTH: delayed type hypersensitivity) gegen 3 Tage später appliziertes (Tumor)Antigen, nicht jedoch gegen Recall-Antigene, potenzieren bis hin zur Abstoßung autologer Tumorzellen und Metastasen (19, 20). Die dabei verwandte Dosierung ist identisch mit der klinisch üblichen Dosis für therapeutische Immunsuppression bzw. für onkologische Indikationen (1000 mg/m^2), wobei bereits mit 300 mg/m^2 die volle immunpotenzierende Wirkung erreicht werden kann (20). Als Mechanismus konnte für Cyclophosphamid gezeigt werden, dass Suppressor-T-Zellen und vor allem Suppressor-Inducer-Zellen wesentlich empfindlicher sind als die Effektorzellen der DTH-Reaktion (21, 23, 31, 85, 95, 147), was die verminderte ConA-induzierbare Suppression nach Cyclophosphamidgabe (22) und die gesteigerte immunologische Anti-Tumor-Reaktion in vivo erklärt (62, 95, 165). Eine eindeutige und ausschließliche, phänotypische Definierung der betroffenen Suppressorzellen gelang nicht. Die höhere Empfindlichkeit von Leukozyten mit immunsuppressiver Regulatorfunktion gegenüber Zellgiften im Vergleich zu immunologischen Effektorzellen könnte auch die in den eigenen Experimenten gefundene Immunpotenzierung durch Mitomycin C erklären. Zum anderen betrachte man die außerordentlich effektive Hemmung durch $40 \mu\text{g/ml}$ MMC, die sogar eine Bestrahlung mit 50.000 rad übertrifft (197). Selbst unter maximaler Proliferationshemmung ist eine Umwandlung von ruhenden Lymphozyten in Effektorzellen mit spezifischer lytischer Aktivität möglich (121), die in den ersten 24 Stunden der CTL-Aktivität einer unbehandelten Referenz entspricht und erst in den folgenden Tagen durch Ausbleiben der Proliferation suboptimale Werte annimmt. Auch die Fähigkeit zur Antigenpräsentation und Zytokinsekretion bleibt unter Proliferationshemmung durch MMC erhalten (11).

Immunsuppression durch Crowding kann pharmakologisch beeinflusst werden.

Die Erhöhung der Zellkonzentration über 1 Mio / ml in der MLR führt zu einer Suppression von Proliferation und zellvermittelter Zytotoxizität. Einzig durch Tolbutamid lässt sich diese Suppression der Proliferation statistisch signifikant vermindern. Dieses Phänomen des Crowding, das nicht auf Erschöpfung des Nährmediums, Akkumulation toxischer Metabolite oder suppressiver Zytokine im Überstand beruht, sondern auf einer Kontaktinhibition und einer Induktion von Suppressorzellen, ist sehr vage schon äußerst früh beschrieben worden, ist jedoch bis heute pathophysiologisch wenig erklärt (1, 28, 52, 82, 100, 144). Viele Experimente zeigen, dass es sich um eine direkte Zell-Zell-Interaktion im Sinne einer Kontaktinhibition handelt, die unter anderem

von der Zusammensetzung der Lymphozytensubsets und von der Art der Immunreaktion (primär versus sekundär) abhängig ist (100). Durch Crowding werden spezifische und unspezifische Suppressorzellen induziert, maximal durch hohen Antigenload und/oder persistierende Antigenstimulation (83). Die Konzentration von 1 Mio Zellen / ml wurde von mehreren Autoren als kritisch beschrieben (56, 198). Startet man eine MLR (1 Mio Stimulatorzellen / ml) mit 1 Mio Responderzellen / ml vermindert sich die Zahl vitaler Zellen bis zum Tag 5 auf 40 % des Ausgangswertes, startet man mit 100.000 Responderzellen / ml verdreifacht sich die Zellzahl (56). Die zytotoxische Aktivität der Zellen ist identisch ! Startet man mit 10.000 Responderzellen / ml verzehnfacht sich die Zellzahl und die entsprechende zytotoxische Aktivität wird erst am Tag 8 erreicht. Wichtig ist zu bemerken, dass die scheinbare Blockade der Proliferation durch Verdünnung behoben werden kann. Eine Zellkonzentration von 1 Mio Lymphozyten pro ml führt zur Kontaktinhibition der Proliferation. Die zellvermittelte zytotoxische Aktivität steigt rapide am Tag 1 an, vor und unverhältnismäßig schneller als die Proliferation, was die Umwandlung ruhender Lymphozyten in aktive Effektorzellen nahelegt. Nach Erreichen des Maximums (etwa zum Zeitpunkt der maximalen Zellkonzentration) kommt es zu einem rapiden Abfall der zytotoxischen Aktivität, der nicht auf Reduktion der Zellzahl, sondern auf der Ausbildung von Suppressorzellen beruht (56). Die Rolle von MMC beim Anti-Crowding könnte generell durch das Absterben von Zellen mit Reduktion der Zellkonzentration erklärt werden (B213). Verhindert man die Proliferation bis zur kritischen Zellkonzentration, kann man auch die Kontaktinhibition der Zellen verhindern. Unterstützt wird die Tatsache durch die Beobachtung anderer Autoren, dass die immunpotenzierende Wirkung von MMC oder Cyclophosphamid nur vor Antigenexposition auftritt (19, 20). Ob durch MMC die zellkontaktvermittelte Induktion von Suppressorzellen verhindert wird, kann durch die eigenen Daten nicht ausreichend belegt werden. Diese Idee sollte jedoch in weiteren Arbeiten verfolgt werden.

Die eigenen Ergebnisse zeigen eine Immunpotenzierung durch Annäherung der Zellen mit leichter Zentrifugation (80g), wie sie an vielen Stellen bereits beschrieben wurde (204). Der Mechanismus beruht auf der Verbesserung der Zell-Zell-Interaktion, da die Zentrifugation keinen Einfluss auf lektinstimulierte Lymphozyten hat (204). Bei 400g und 1000g zeigte sich in den eigenen Experimenten eine Suppression von Proliferation und zellvermittelter Zytotoxizität. Diese Suppression der Proliferation ließ sich durch Zugabe von Tolbutamid oder Cimetidin, stärker noch durch DMPX und Propranolol, aufheben. Der entscheidende Unterschied zur Kontaktinhibition bei erhöhter Zellkonzentration ist, dass die Zellen, zumindest theoretisch und zum Teil, in den Überstand resuspendieren können. Pathophysiologisch sind jedoch dieselben Mechanismen der Kontaktinhibition anzunehmen.

Die Effektor-Target-Ratio in der MLR beeinflusst die immunologische Aktivität der PBMC.

Eine erhöhte Effektor-Target-Ratio erhöht die relative zellvermittelte Zytotoxizität (34) und bei einem Verhältnis von 1:1 bleibt die zytotoxische Aktivität vergleichsweise gering (186). Zwei Gruppen haben gezeigt, dass bei konstanter Konzentration von Responderzellen (1 Mio / ml) die Proliferation in der MLR immer weiter steigt bis zu einem Maximum bei etwa 1 Mio Targetzellen (Verhältnis 1:1) (11, 123). Auch darüber hinaus ist die Proliferation geringer. Dies widerspricht im ersten Augenschein den eigenen Ergebnissen. Da sich mit dem Zellverhältnis aber gleichzeitig die Zellkonzentration ändert, welche beim Verhältnis 1:1 ihr Optimum von 1 Mio Zellen / ml erreicht, sind die Daten nicht mit den eigenen vergleichbar. Die Effekte von zu großem Zell-Zell-Abstand bzw. Crowding könnten die Effekte der Zellverhältnissuppression verschleiern. Den eigenen Recherchen nach ist die Testung dieser Variablen im gegebenen Versuchsansatz nicht zuvor beschrieben worden. Die eigenen Ergebnisse zeigen eine maximale Suppression der Proliferation in der primären und sekundären MLR, bezüglich Proliferation und zellvermittelter Zytotoxizität. Zudem ist diese, während einer primären MLR generierte Suppression durch Transfer der Effektorzellen auf eine zweite MLR übertragbar. Daraus lässt sich auf die Existenz von Suppressorzellen schließen. Die verminderte, aber durchaus messbare und auch statistisch signifikante Suppression auch gegen Stimulatorzellen eines dritten Donors in der zweiten MLR belegt das Vorhandensein von sowohl spezifischen, als auch unspezifischen Suppressorzellen. Cimetidin und Tolbutamid können diese Suppression, zumindest teilweise, aufheben. Eine Fehlermöglichkeit des eigenen Testsystems könnte jedoch das gewählte Zeitfenster sein. In den ersten 5-7 Tagen einer Zweiweg-MLR verändern sich die Verhältnisse der einzelnen Individuen nicht. Nach 3 Wochen jedoch besteht die Kultur in 98% der Fälle nur noch aus Zellen eines Individuums (172). Das von uns gewählte Zeitfenster am Tag 9 sollte, könnte aber nicht ausreichend, diese Bewegung erfassen. Die Dominanz einer Population A über B kann man durch (a) erhöhtes Zellverhältnis (Bsp. A:B = 80:20), (b) durch Depletion der CD8-Zellen aus der Population B, oder (c) durch Depletion der CD4-Zellen aus der Population A erreichen. Zugabe von Il-2 beschleunigt, von Ciclosporin A verhindert die Einstellung der Dominanz einer Population. Leider geben die Autoren nicht Auskunft, ob bei ungleichem Ausgangsverhältnis die Dominanz auch schneller ausgebildet wird. Dies könnte die erhöhte zytolytische Aktivität an Tag 9 bei ungleichem Ausgangsverhältnis in den eigenen Versuchen erklären.

4.2.2 Diskussion der immunmodulatorischen Wirkung der getesteten Substanzen

Propranolol und Tolbutamid:

Propranolol wirkt auf Regulatorzellen immunstimulierend

Die Blockade der beta-adrenergen Rezeptoren der Lymphozyten bewirkt bei ruhenden Zellen die Potenzierung von zellvermittelter Zytotoxizität und Proliferation auf spezifische und unspezifische Stimulation. Stimuliert man die Zellen zur Proliferation während der Rezeptorblockade, kommt es zur Suppression der regulierten Zytotoxizität und zur Stimulation der regulierten Proliferation. Verhindert man die mitogen induzierte Proliferation durch MMC, dann potenziert sich die regulierte Zytotoxizität und die regulierte Proliferation wird supprimiert.

Die Antigenligation des TCR führt über PIP₂-Hydrolyse (Phosphatidylinositolbisphosphat) IP₃-vermittelt zum intrazellulären Anstieg von Kalzium und über den DAG-PKC-jun/fos-AP-1-Signaltransduktionsweg zur Ablesung von Interleukin 2 und zur Proliferation (188). Die Ligation der beta-adrenergen Rezeptoren auf Lymphozyten (212) bewirkt einen intrazellulären cAMP-Anstieg mit Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), die via CREB (cAMP responsive elements binding protein) die Interleukin-2-(Il-2)-Transkription durch Promotorinhibition (AP-1) hemmt (188). Zudem hemmt cAMP direkt den PIP₂-IP₃-DAG-Signalweg (205, 206) und der aktivierte PIP₂-IP₃-DAG-Signalweg hebt den cAMP-Spiegel in der Zelle an (188). In vitro führt Noradrenalin deshalb zur Hemmung der Leukozytenproliferation, in vivo auch zur Umverteilung der Lymphozytensubsets mit Lymphozytose (CD3) durch Anstieg der T8-Zellen und NK-Zellen mit rechnerischem Abfall der T4/T8-Ratio (13, 137, 173, 206). Die unterschiedliche Wirkung auf die verschiedenen Lymphozytensubsets ist unter anderem durch differente Expression beta-adrenerger Rezeptoren bedingt. NK-Zellen und CD8⁺ T-Lymphozyten haben die höchste Rezeptordichte, zwei- bis dreifach höher als auf CD4⁺ Th1-Lymphozyten (135, 170). Th2-Zellen haben (fast) keine beta-adrenergen Rezeptoren und auch die Ligation des TCR vermittelt nicht die PIP₂-Hydrolyse (188). Dennoch haben Th2-Lymphozyten einen konstitutiv hohen, intrazellulären cAMP-Spiegel (139) mit hoher Produktion von Il-4 und Il-5, verantwortlich zur Vermittlung der humoralen Immunität (158, 170). Noradrenalin führt zur Suppression von Th1-Zytokinen und Hemmung der Th1-Proliferation, wohingegen die Funktion der beta-rezeptorlosen Th2-Zellen unbeeinflusst bleibt (139, 188). Die B-Zellen hingegen differenzieren unter Adrenergika zu Plasmazellen. Die Freisetzung hydrolytischer Enzyme durch Granulozyten und die Interleukin-12-Sekretion durch Makrophagen, die die Th1-Differenzierung steuert, werden gehemmt (130). Die Sekretionsleistung der Makrophagen bezüglich anderer Zytokine bleibt unbeeinflusst (25). Propranolol kann die durch Noradrenalin bedingte Suppression von Il-2-Synthese und T-Zellproliferation aufheben (14, 192), und die über den cAMP-PKA-Signalweg vermittelte Il-10-Synthese, und damit die Entwicklung von Th2-Lymphozyten und zellulärer Immunsuppression, unterdrücken (213). Auch die

noradrenalinbedingte B-Zellstimulation wird gehemmt (14). Da Lymphozyten endogene Katecholamine synthetisieren und sezernieren (24), herrscht konstitutiv eine Homöostase zwischen zellulärer, spezifischer (Th1, IFN γ , Il-12, Il-2, IgG2a, Makrophagen, Komplement) und humoraler, unspezifischer (Th2, B-Zellen, Il-10, Il-4, Il-5, IgG4, IgE, Mastzellen, Basophile) Immunität in Abhängigkeit von systemischer und lokaler Katecholaminfreisetzung sowie unterschiedlicher Rezeptorexpression. Die eigenen Ergebnisse zeigen die Propranololwirkung auf Regulatorzellen, die in der gesichteten Literatur nur mittelbar beschrieben wird. Beta-Blockade ruhender Zellen fördert CTL-Aktivität und T-Zellproliferation, da vorwiegend CD8-CTLs und CD4⁺ Th1-Lymphozyten beta2-adrenerge Rezeptoren exprimieren. Wird der TCR-PIP2-jun/fos-AP-1-Signalweg durch polyklonale Mitogenligation aktiviert und die hemmende cAMP-Wirkung mit Propranolol blockiert, kommt es zur gesteigerten Il-2-Bildung. Die generierten Helfer- und Inducerzellen vermitteln gute T-Zellproliferation, aber gehemmte CTL-Aktivität. Unterdrückt man mit MMC die Proliferation, kann die CTL-Suppression verhindert werden. Die eigenen Ergebnisse zeigen den immunstimulierenden Einfluss von Propranolol auf ruhende und proliferationsgehemmte Zellen. Die Relevanz dieser Ergebnisse spiegelt sich in der Beobachtung wider, dass Propranolol im Mausmodell die melphalaninduzierte Tumorabstoßung durch Deblockierung der tumorspezifischen CTLs fördert (94). Auch die direkte immunstimulierende Wirkung konnte in den Versuchen zur Deblockierung der zentrifugationsinduzierten Suppression gezeigt werden. Immunpotenzierende Wirkungen von Tolbutamid zeigen sich auf lektinstimulierte, aber MMC-inaktivierte Regulatorzellen. Hier vermag Tolbutamid die induzierte Suppression aufzulösen und die zellvermittelte Zytotoxizität sogar noch weiter zu steigern. In den Vorversuchen war bereits aufgefallen, dass Tolbutamid die durch Zellverhältnis und Zentrifugation induzierte Suppression inhibieren kann. Der von Tolbutamid beeinflusste ATP-abhängige Kaliumkanal stoppt physiologisch bei Sauerstoff- und/oder Substratmangel den Kaliumfluss und bedingt indirekt durch die Depolarisation einen kompensatorischen Kalziueinstrom, der die Zelle in der kritischen Phase funktionell stabil erhält (191). Durch Tolbutamid kann bei überstimulierten Lymphozyten die zu Suppression führende Hyperpolarisation verhindert werden. Die immunmodulierende Wirkung von Tolbutamid oder anderen Sulfonylharnstoffen auf Lymphozyten ist in der Literatur noch nicht beschrieben worden.

H2- und D2-Rezeptorantagonisten

Antagonisten von H2-histaminergen und D2-dopaminergen Rezeptoren vermitteln eine Immunsuppression der Regulatorzellen im verwendeten Testsystem.

Histamin vermittelt über den H2-Rezeptor auf Lymphozyten suppressive immunologische Signale u.a. durch Hemmung der IFN γ - und Il-12-Synthese und Stimulation der Il-10-Sekretion

(54, 86). Dadurch spielt Histamin eine wichtige Rolle bei verschiedenen Erkrankungen wie Allergien, Malignomen oder speziellen Infektionen. H₂-Rezeptorblocker, wie Cimetidin und Ranitidin, verhindern die histaminvermittelte Suppression und stimulieren unbehandelte Zellen zur IFN γ - und IL-2-Synthese, zur Proliferation, und verstärken die zellvermittelte Zytotoxizität (60, 80, 86). H₁-Rezeptorblocker hemmen spezifisch die Funktion von Th₂-Zellen (134). Auch *in vivo* zeigen H₂-Antagonisten immunstimulierende Effekte bei gesunden Probanden (32), bei Tumorerkrankungen (96) und bei Immunsuppression nach schwerem Schädelhirntrauma (163). Cimetidin wirkt in erster Linie durch Hemmung der T-Suppressorfunktion in den kritischen ersten 24 Stunden nach Alloantigenexposition (61, 136, 161). Aktivierte T-Suppressorzellen (CD8⁺/CD25⁺) haben eine besonders hohe H₂-Rezeptordichte (181). Die direkte inhibierende Wirkung des H₂-Rezeptorantagonisten Cimetidin auf *in vitro* generierte T-Suppressorzellen konnte in den eigenen Versuchen zur zentrifugations- bzw. zellverhältnisinduzierten Suppression in Konkordanz mit der aktuellen Literatur reproduziert werden. Im verwendeten Testsystem zur Bestimmung des Einflusses auf die Funktion von Regulatorzellen zeigte sich für Cimetidin mit einer Ausnahme kein statistisch signifikanter Effekt auf die regulierte zellvermittelte Zytotoxizität. Ranitidin hingegen bewirkte eine statistisch signifikante Suppression der Zytotoxizität in allen Motiven. Gleiche Ergebnisse zeigen sich auch in allen durchgeführten Substanzkombinationen, bei denen Ranitidin beteiligt war. Beide Substanzen sind ohne statistisch signifikante Wirkung auf die Proliferation in der MLR, wenn die Zellen noch vor der Pharmakagabe mit MMC inaktiviert wurden, dagegen mit statistisch signifikanter, suppressiver Wirkung, wenn die Inaktivierung erst anschließend durchgeführt wurde. Demnach ist die Ausbildung der T-Suppressorzellen (Ts), die die T-Zellproliferation unterdrücken, von der Proliferation der Zellen abhängig, die derjenigen Ts, die die zellvermittelte Zytotoxizität supprimieren, dagegen nicht. Der extreme Unterschied zwischen direkter und indirekter H₂-Blocker-Wirkung könnte einerseits dadurch erklärt werden, dass durch die Vorinkubation die H₂-Rezeptorexpression zunimmt und es nach Entzug der Substanz zu einem Reboundphänomen kommt (194), ähnlich wie es bei den beta-adrenergen Rezeptoren zu beobachten ist. Andererseits ist der Einfluss von MMC zu bedenken. Legt man dem in den eigenen Experimenten beschriebenen, immunstimulierenden Effekt von MMC die Entfernung der in der Vorinkubation aktivierten Suppressorzellen als besonders empfindliche Targets zugrunde, dann ließe sich der Mechanismus auf die Histaminantagonisten übertragen. Wenn durch H₂-Blockade die T-Suppressorzellen funktionell supprimiert werden und T-Helferzellen, insbesondere Th₁-Zellen, aktiviert werden, dann würden besonders die aktivierten Th₁-Zellen aus der Population entfernt und die Ts bleiben verschont. Diese Hypothese würde auch die immunstimulierende Wirkung der oft als Ts-induzierend beschriebenen Lektine PHA und ConA erklären. Diese Erklärung erfordert noch

weitere wissenschaftliche Belege, doch zeigen die vorliegenden Daten die gegensätzliche Wirkung der H₂-Antagonisten auf Effektor- und Regulatorzellen.

Obwohl für Dopaminantagonisten wie Chlorpromazin in vivo und vitro ein immunsuppressiver Effekt nachgewiesen werden konnte, gelang dies für den relativ spezifischen D₂-dopaminergen Antagonisten Sulpirid nicht (167), obwohl ohne Zweifel B- und T-Lymphozyten D₂-Rezeptoren besitzen (171). Ligandierung durch Dopamin führt G_i-gekoppelt zur Hemmung der Adenylatzyklase (89, 171). Sulpirid inhibiert diese Hemmung und hebt dadurch den intrazellulären cAMP-Spiegel an. Genauere Untersuchungen zur Wirkung auf Immunzellen liegen in der Literatur nicht vor, doch in Analogie zu den bei adrenerger Aktivierung beschriebenen Mechanismen ist eine Induktion von Suppressorzellen durch Sulpirid naheliegend. In Anlehnung an die Diskussion zu den H₂-Antagonisten sind die ermittelten Ergebnisse demnach durchaus konsistent und für die fast mit Ranitidin identischen Ergebnisse auch ähnliche Mechanismen anzunehmen. Auch die Summation der Effekte bei Kombination der beiden Substanzen war anzunehmen und konnte gezeigt werden.

Metabolite des Arachidonsäurestoffwechsel:

Der Arachidonsäurestoffwechsel ist nicht von entscheidender Bedeutung bei der Steuerung der immunologischen Funktion von Regulatorzellen.

Indomethacin führt zu einer statistisch signifikanten Steigerung der Zytotoxizität bei Stimulation mit PHA oder ConA mit anschließender MMC-Inaktivierung, in den T-Zellproliferationstests dagegen zeigten sich keine immunpotenzierenden Wirkungen. Der Arachidonsäurestoffwechsel ist von großer immunologischer Bedeutung. Die Hemmung der Phospholipase A₂ (PLA₂), z.B. durch Glukokortikoide (GK), verhindert die Synthese von sowohl Prostaglandinen, als auch Leukotrienen (68). GK hemmen zudem AP-1, den stärksten Promotor für die Transkription proinflammatorischer Zytokine (15, 188). GK fördern die Immunglobulinbildung und Proliferation von B-Zellen (67) und hemmen T-Zellproliferation sowie CTL-Bildung (36, 84, 188). Überdies stimulieren sie die Bildung von T-Suppressor- und Th₂-Helferzellen. In vivo bewirken sie eine rasche und transiente Leukozytose durch Granulozytose mit Lympho- und Monozytopenie, hemmen die MLR der Lymphozyten, die Freisetzung lysosomaler Enzyme und stabilisieren lysosomale und Zellmembranen (36, 142). Die Cyclooxygenase (COX) ist Schlüsselenzym der Prostaglandinsynthese und wird durch nichtsteroidale antiinflammatorische Medikamente (NSAIDs), wie z.B. Indomethacin, gehemmt (70). Prostaglandin E₂ (PGE₂), eigentlich bekannt als Entzündungsmediator für Dolor, Rubor, Calor (B236), hemmt die T-Zellproliferation und fördert die Immunglobulinbildung durch B-Zellen (35, 65, 66, 69). Die COX-Hemmer dagegen stimulieren die T-Zellproliferation in vitro, hemmen die Induktion allospezifischer Suppressorzellen und die Immunglobulin- inklusive Rheumafaktorsynthese durch B-Zellen (35, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 84,

141). NSAIDs, ohne Einfluss auf die zelluläre Immunität bei Gesunden, provozieren bzw. verstärken die DTH-Reaktion (delayed type hypersensitivity) bei DTH-anergenen Patienten (69). Zudem stimulieren NSAIDs bei Antigenexposition den Titeranstieg gegen Recallantigene, nicht gegen Neoantigene (72). Beide Beobachtungen legen nahe, dass nach einer abgelaufenen, spezifischen Immunreaktion PGE₂ als negativer Feedbackinhibitor suppressiv auf die spezifischen Effektorzellen wirkt. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass T-Suppressorzellen eine wesentlich höhere PGE₂-Rezeptordichte besitzen als T-Helferzellen, und dass T8-Depletion den suppressiven Effekt von PGE₂ aufhebt. Physiologischer Hauptproduzent von PGE₂ sind Makrophagen (65, 69, 141), wobei diese durch Lymphokine von spezifischen T8-Suppressorzellen dazu stimuliert werden. PGE₂ hemmt einerseits die T-Zellfunktion (71) und andererseits MMC- und strahlensensible T8-Suppressorzellen (35, 70), die eigentlich Helferzellen (Th2) der Ig-Synthese durch B-Lymphozyten hemmen (69). Die doppelte Hemmung bewirkt die gesteigerte B-Zellfunktion. Indomethacin dagegen hemmt die Ig-Bildung und fördert die zelluläre Immunität. Die in der deskriptiven Statistik auffallende Suppression der T-Zellfunktion in den Ansätzen mit vorheriger MMC-Behandlung (Prä) ist durch die beschriebene MMC-Sensitivität der für den NSAID-Effekt entscheidenden Regulatorzellen zu erklären. Bei MMC-Inaktivierung der Zellen nach Immunmodulation (Post) wirkt Indomethacin bei lektinstimulierten Zellen (PHA, ConA) stimulierend auf die zellvermittelte Zytotoxizität. Das eigene Ergebnis, dass keine statistisch signifikanten Einflüsse auf die T-Zellproliferation durch Behandlung der Regulatorzellen zu erreichen war, legt nahe, dass die von anderen Autoren beschriebene, proliferationsfördernde Wirkung der NSAIDs durch unmittelbare Einwirkung auf die Effektorzellen zustande kommt. Dieser direkte Effekt konnte in den eigenen Versuchen mit Aspirin, wenn auch nicht statistisch signifikant, reproduziert werden.

5. Zusammenfassung

HINTERGRUND UND FRAGESTELLUNG DER ARBEIT: Zelluläre Immunvakzine, insbesondere gegen Tumorkrankheiten, sind heute zu einer anwendbaren und hoffnungsvollen Therapieoption geworden. Immer wieder trüben die mangelnde Immunkompetenz des Rezipienten mit fortgeschrittenem Tumorleiden und Suppressionsmechanismen der Vakzine selbst den Erfolg dieser Technologien. Die vorliegende Arbeit sollte mögliche Mechanismen der Immunsuppression bei Generierung zellulärer Vakzine beleuchten und ein *in vitro* Testsystem zur Charakterisierung gängiger Pharmaka bezüglich ihrer immunmodulierenden Wirkung auf Vakzinezellen entwickeln.

METHODEN: Grundelement des *in vitro* Modells ist eine gemischte Leukozytenreaktion (MLR), welcher vorbehandelte Regulatorzellen zugesetzt werden. Als relevante, abhängige Variable der Beobachtungseinheit mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden Proliferation auf allospezifische (MLR) und polyklonale Lektinstimulation (Concanavalin A und/oder Phytohämagglutinin) sowie zellvermittelte Lympholyse blastentransformierter Zielzellen definiert. Die unabhängige Variable war eine 48-stündige Vorinkubation von ruhenden bzw. lektinstimulierten Regulatorzellen mit immunmodulierenden Pharmaka. Die Inaktivierung der Regulatorzellen mit Mitomycin C erfolgte alternierend vor oder nach der Vorinkubation, um die Abhängigkeit der Reaktion von der Proliferationsfähigkeit der Regulatorzellen zu testen.

ERGEBNISSE: Kontaktinhibition der Lymphozyten durch hohe Zellkonzentrationen (>1 Mio Zellen / ml) oder Zentrifugation mit hoher Gravitation (> 400 g) sowie kritisches Responder-Stimulator-Verhältnis (R:S = 1) supprimieren Proliferation und zellvermittelte Zytotoxizität. Die Inaktivierung der Regulatorzellen mit Mitomycin C bewirkt eine Steigerung der zellvermittelten Zytotoxizität, die in der regulierten Immunreaktion generiert wurde. Propranolol und Tolbutamid potenzieren, Blocker der H₂-histaminergen und D₂-dopaminergen Rezeptoren supprimieren die Funktion der Regulatorzellen. Cyclooxygenasehemmer waren ohne statistisch signifikante Wirkung.

DISKUSSION: Die vorliegende Arbeit legt die wissenschaftliche Etablierung eines Testsystems zur Charakterisierung der immunmodulierenden Wirkung von Pharmaka auf Regulatorzellen einer MLR dar. Immunstimulierende Effekte konnten für Propranolol und Tolbutamid nachgewiesen werden. Als mögliche Mechanismen der Immunsuppression einer zellulären Vakzine wurden Zellkontaktinhibition sowie äquipotente Spender in der MLR aufgedeckt. Erstmals konnte die immunpotenzierende Wirkung von Mitomycin C auf Regulatorzellen *in vitro* gezeigt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. **Aarden, L., Corley, R.B., Söderberg, A., Lefkovits, I.**, Limiting dilution analysis of the suppressive effect mediated by alloantigen-primed cells., *Immunology* 41 (1980): 399-406.
2. **Abbas, K.A., Lichtman, A.H., Pober, J.S.**, Die Lymphozyten-Mischreaktion (MLR)., In: "*Immunologie*", Hans Huber Verlag, Bern-Göttingen-Toronto-Seattle, 1996, 409-413.
3. **Abbas, K.A., Lichtman, A.H., Pober, J.S.**, Suppressor-T-Lymphozyten., In: "*Immunologie*", Hans Huber Verlag, Bern-Göttingen-Toronto-Seattle, 1996, 261-264.
4. **Akiyoshi, T., Arinaga, S., Tsuji, H.**, Augmentation of the generation of cell-mediated cytotoxicity in culture by mitomycin C, *Cancer Immunol Immunother* 24 (1987): 259-262.
5. **Albrechtsen, D., Lied, M.**, Stimulating capacity of human lymphoid cell subpopulations in mixed lymphocyte cultures., *Scand J Immunol* 7 (1978): 427-434.
6. **Almand, B., Clark, J.I., Nikitina, E., van Beynen, J., English, N.R., Knight, S.C., Carbone, D.B., Gabrilovich, D.I.**, Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: A mechanism of immunosuppression in cancer., *J Immunol* 166 (2001): 678-689.
7. **Angevin, E., Farace, F., Genevee, C., Henry-Amar, M., Caignard, A., Dietrich, P.-Y., Escudier, B., Hercend, T., Triebel, F.**, Analysis of T cell receptor variable gene segment usage in peripher blood lymphocytes of advanced cancer patients., *Int J Cancer* 54 (1993): 60-67.
8. **Arala-Chaves, M.P., Hope, L., Korn, J.H., Fudenberg, H.**, Role of adherent cells in immune responses to phytohemagglutinin and concanavalin A., *Eur J Immunol* 8 (1978): 77-81.
9. **Arinaga, S., Karimine, N., Takamuku, K., Nanbara, S., Inoue, H., Abe, R., Watanabe, D., Asoh, T., Ueo, H., Akiyoshi, T.**, Laboratory correlates of chemoimmunotherapy with low dose recombinant interleukin-2 and mitomycin C in patients with advanced carcinoma., *Cancer Invest* 12 (1994): 588-96.
10. **Bach, F., Hirschhorn, K.**, Lymphocyte Interaction: A Potential Histocompatibility Test in vitro., *Science* 143 (1964): 813-4.
11. **Bach, F., Voynow, N.K.**, One-Way Stimulation in Mixed Leucocyte Cultures., *Science* 153 (1966): 545-7.
12. **Bach, F.H., Bach, M.L.**, Cell mediated immunity: separation of cells involved in recognitive and destructive phases., *Science* 180 (1973): 403-406.
13. **Bachen, E.A., Manuck, S.B., Cohen, S., Muldoon, M.F., Raible, R., Herbert, T.B., Rabin, B.S.**, Adrenergic blockade ameliorates cellular immune responses to mental stress in humans., *Psychosom Med* 57 (1995): 366-372.
14. **Baerwald, C.G.O., Wahle, M., Ulrichs, T., Jonas, D., von Bierbrauer, A., von Wichert, P., Burmeister, G.R., Krause, A.**, Reduced catecholamine response of lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis., *Immunobiol* 200 (1999): 77-91.
15. **Barnes, P.J.**, Anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids., *Biochemical Society Transactions* 23 (1995): 940-945.
16. **Barni, S., Lissoni, P., Crispino, S., Cattaneo, G., Rovelli, F., Fumagalli, G., Tancini, G.**, Neuroimmunomodulation in cancer patients: correlations between melatonin and beta-endorphin blood levels and T helper/suppressor ratio., *Int J Biol Markers* 3 (1988): 82-6.
17. **Benacerraf, B.**, The Immune System, In: "*Therapeutic Immunology*", Austen, K.F., Burakoff, S.J., Rosen, F.S. (editors), Blackwell Science, Oxford-London-Edinburgh-Melbourne, 1996, 3-11.
18. **Berd, D., Maguire, H.C., Mastrangelo, M.J.**, Impairment of Concanavalin A-inducible Suppressor Activity following Administration of Cyclophosphamide to Patients with Advanced Cancer, *Cancer Res* 44 (1984): 1275-1280.
19. **Berd, D., Maguire, H.C., Mastrangelo, M.J.**, Induction of cell-mediated immunity to autologous melanoma cells and regression of metastases after treatment with melanoma cell vaccine preceded by cyclophosphamide., *Cancer Res* 46 (1986): 2572-2577.

20. **Berd, D., Maguire, H.C., Mastrangelo, M.J.**, Potentiation of Human Cell-mediated and Humoral Immunity by Low-Dose Cyclophosphamide, *Cancer Res* 44 (1984): 5439-5443.
21. **Berd, D., Mastrangelo, M.J.**, Effect of Low Dose Cyclophosphamide on the Immune System of Cancer Patients: Depletion of the CD4+, 2H4+ Suppressor-inducer T-Cells, *Cancer Res* 48 (1988): 1671-1675.
22. **Berd, D., Mastrangelo, M.J.**, Effect of Low Dose Cyclophosphamide on the Immune System of Cancer Patients: Reduction of T-Suppressor Function without Depletion of the CD8+ Subset, *Cancer Res* 47 (1987): 3317-3321.
23. **Berendt, M.J., North, R.J.**, T-cell-mediated suppression of antitumor immunity. An explanation for progressive growth of an immunogenic tumor., *J Exp Med* 151 (1980): 69-80.
24. **Bergquist, J., Tarkowski, A., Ekman, R., Ewing, A.**, Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop., *Proc Natl Acad Sci* 91 (1994): 12912-12916.
25. Beta2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12 - and related articles
26. **Boehringer Mannheim**, *Produktinformation* zu Cell Proliferation Reagent WST-1, Cat. No. 1644 807, Boehringer Mannheim GmbH, 1994, S.1-4.
27. **Boehringer Mannheim**, *Produktinformation* zu Cytotoxicity Detection Kit (LDH), Cat. No. 1 644 793, Boehringer Mannheim GmbH, 1994, S 1-20.
28. **Bois, R.D., Meinesz, A., Bierhorst-Eijlander, A., Groenewoud, M., Schellekens, P.T.A., Eijssvoogel, V.P.**, The use of microtiter plates in mixed lymphocyte cultures., *Tissue Antigens* 4 (1974): 458-468.
29. **Bondevik, H., Helgesen, A., Thoresen, A.B., Thorsby, E.**, A mixed lymphocyte culture micro-technique and its application in different family and unrelated combinations., *Tissue Antigens* 4 (1974): 469-481.
30. **Borel, J.F.**, Immunosuppression, In: "*Encyclopedia of Immunology*", Delves, P.J., Roitt, I.M. (Editors), Academic Press, San Diego, London, 1998, 2nd edition, 1349-53.
31. **Braun, D.P., Harris, J.E.**, Effects of combination chemotherapy on immunoregulatory cells in peripheral blood of solid tumor cancer patients: correlation with rebound overshoot immune function recovery., *Clin Immunol Immunopathol* 20 (1981): 193-214.
32. **Brockmeyer, N.H., Kreuzfelder, E., Chalabi, N., Scheiermann, N., Keinecke, H.O., Goos, M., Ohnhaus, E.E.**, The immunological potency of cimetidine in healthy donors., *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 27 (1989): 458-62.
33. **Burnet, F.M.**, The concept of immunological surveillance., *Prog Exp Tumor Res* 13 (1970): 1-27.
34. **Caillat, S., Poisson, J., Campos, H., Debure, A., Kreis, H., Bach, J.F., Chatenoud, L.**, Donor-specific T cell lines grown from fine-needle aspirates of human renal allografts during acute rejection., *Transplantation* 44 (1987): 325-329.
35. **Ceuppens, J.L., Goodwin, J.S.**, Endogenous prostaglandin E2 enhances polyclonal immunoglobulin production by tonically inhibiting T suppressor cell activity., *Cell Immunol* 70 (1982): 41-54.
36. **Cheigh, J.S., Stenzel, K.H., Riggio, R.R., Katz, E.B., Rubin, A.L.**, Effects of intravenous methylprednisolone on mixed lymphocyte cultures in normal humans., *Transplant Proc* 7 (1975): 31-5.
37. **Chen, L., Ashe, S., Brady, W.A., Hellstrom, I., Hellstrom K.E., Ledbetter, J.A., McGowan, P., Lisley, P.S.**, Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4., *Cell* 71 (1992): 1093-1102.
38. **Childs, R., Chernoff, A., Contentin, N., Bahceci, E., Schrupp, D., Leitman, S., Read, E.J., Tisdale, J., Dunbar, C., Linehan, W.M., Young, N.S., Barrett, J.**, Regression Of Metastatic Renal Cell Carcinoma After Nonmyeloablative Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation, *N Engl J Med* 343 (2000): 750-758.

39. **Conrads, S., Zinkernagel, R.**, Major histocompatibility complex - Erkenne Dich selbst, *Via Medici* 5-97 (1997): 48-49
40. *Constitution of the World Health Organization*, Chapter I, July 22, 1946.
41. **Cruse, J.M., Lewis, R.E.**, "*Illustrated Dictionary of Immunology*", CRC Press, Boca Raton, 1995, S. 76 und 234.
42. **Cruse, J.M., Lewis, R.E.**, Immunoregulation, Tolerance, and Autoimmunity, "*Atlas of Immunology*", CRC Press, Boca Raton, 1999, S. 247-252.
43. **Cruse, J.M., Lewis, R.E.**, The Thymus and T Lymphocytes, "*Atlas of Immunology*", CRC Press, Boca Raton, 1999, S. 161-183.
44. **Cruse, J.M., Lewis, R.E.**, Tumor Immunology, "*Atlas of Immunology*", CRC Press, Boca Raton, 1999, S. 375-387.
45. **Davis, M.M., Bjorkman, P.J.**, T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition., *Nature* 334 (1988): 395-402.
46. **Degermann, S., Pria, E., Adorini, L.**, Soluble protein but non-peptide administration diverts the immune response of a clonal CD4+ T cell population to the T helper 2 cell pathway., *J Immunol* 157 (1996): 3260-3269.
47. **Delves, P.J., Roitt, I.M.**, The Immune System, First of Two Parts, *N Engl J Med* 343 (2000): 37-49.
48. **Delves, P.J., Roitt, I.M.**, The Immune System, Second of Two Parts, *N Engl J Med* 343 (2000): 108-117.
49. **Dillmann, R.O., Koziol, J.A., Zavanelli, M.I., Beauregard, J.C., Halliburton, B.L., Glassy, M.C., Royston, I.**, Immunoincompetence in cancer patients. Assessment by in vitro stimulation tests and quantification of lymphocyte subpopulations., *Cancer* 53 (1984): 1484-1491.
50. **Doyle, C., Strominger, J.L.**, Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion., *Nature* 330 (1987): 256-9.
51. **Drandoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D., Mulligan, R.C.**, Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting antitumor immunity., *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (1993): 3539-43.
52. **Du Bois, M.J.G., Huismans, D.R., Schellekens, P.T.A., Eijssvoogel, V.P.**, Investigation and standardization of the conditions for micro-lymphocyte cultures., *Tissue Antigens* 3 (1973): 402-409.
53. **Dwyer, J.M., Johnson, C.**, The regulation of T cell responses by spontaneously active suppressor cells., *Clin Exp Immunol* 50 (1982): 406-15
54. **Elenkov, I.J., Webster, E., Papanicolaou, D.A., Fleisher, T.A., Chrousos, G.P., Wilder, R.L.**, Histamine potently suppresses human IL-12 and stimulates IL-10 production via H2 receptors., *J Immunol* 161 (1998): 2586-93.
55. **Feldman M., Maini, R.N.**, Immunotherapy of Autoimmune Diseases, In: "*Encyclopedia of Immunology*", Delves, P.J., Roitt, I.M. (Editors), Academic Press, San Diego, London, 1998, 2nd edition, 1356-1359.
56. **Fitch, F.W., Engers, H.D., MacDonald, H.R., Cerottini, J.-C., Brunner, K.T.**, Generation of cytotoxic T lymphocytes in vitro. Effect of cell density on response in mixed leukocyte cultures., *J Immunol* 115 (1975): 1688-1694.
57. **Gammon, G., Sercarz, E.**, How some T cells escape tolerance induction., *Nature* 342 (1989): 183-185.
58. **Gatenby, P.**, Immunopotential, In: "*Encyclopedia of Immunology*", Delves, P.J., Roitt, I.M. (Editors), Academic Press, San Diego, London, 1998, 2nd edition, 1342-1348.
59. **Geppert, T.**, Phytohemagglutinin (PHA), In: "*Encyclopedia of Immunology*", Delves, P.J., Roitt, I.M. (Editors), Academic Press, San Diego, London, 1998, 2nd edition, 1952-53.
60. **Gifford, R.R., Tilberg, A.F.**, Histamine type-2 receptor antagonist immune modulation. II. Cimetidine and ranitidine increase interleukin-2 production., *Surgery* 102 (1987): 242-7.

61. **Gifford, R.R., Voss, B.V., Schmidtke, J.R., Ferguson, R.M.**, Histamine type-2 receptor antagonist immune modulation. I. Increased cell-mediated cytotoxicity in normal and in down-regulated systems., *Surgery* 103 (1988): 184-92.
62. **Glaser, M.**, Augmentation of specific immune response against a syngeneic SV-40-induced sarcoma in mice by depletion of suppressor T cells with cyclophosphamide. *Cell Immunol* 48 (1979): 339-345.
63. **Go, C., Lancki, D.W., Fitch, F.W., Miller, J.**, Anergized T Cell Clones Retain Their Cytolytic Ability, *J Immunol* 150 (1993): 367-376.
64. **Golumbek, P.T. Lazenby, A.J., Levitsky, H.I., Jaffee, L.M., Karasuyama, H., Baker, M., Pardoll, D.M.**, Treatment of established renal cancer by tumor cells engineered to secrete interleukin-4., *Science* 254 (1991): 713-716.
65. **Goodwin J.S., Bankhurst, A.D., Messner, R.P.**, Suppression of human T-cell mitogenesis by prostaglandin., *J Exp Med* 146 (1977): 1719-1734.
66. **Goodwin, J.S.**, Modulation of concanavalin-A-induced suppressor cell activation by prostaglandin E2., *Cell Immunol* 49 (1980): 421-425.
67. **Goodwin, J.S., Atluru, D.**, Mechanism of action of glucocorticoid-induced immunoglobulin production: role of lipoxygenase metabolites of arachidonic acid., *J Immunol* 136 (1986): 3455-3460.
68. **Goodwin, J.S., Atluru, D., Sierakowski, S., Lianos, E.A.**, Mechanism of action of glucocorticosteroids. Inhibition of T cell proliferation and interleukin 2 production by hydrocortisone is reversed by leukotriene B4., *J Clin Invest* 77 (1986): 1244-1250.
69. **Goodwin, J.S.**, Immunologic effects of nonsteroidal anti-inflammatory agents., *Am J Med* 77 (1984): 7-15.
70. **Goodwin, J.S.**, Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory agents., *Am J Med* 77 (1984): 57-64.
71. **Goodwin, J.S., Messner, R.P., Bankhurst, A.D., Peake, G.T., Saiki, J.H., Williams, R.C.**, Prostaglandin-producing suppressor cells in hodgkin's disease., *N Engl J Med* 295 (1976): 927-36.
72. **Goodwin, J.S., Selinger, D.S., Messner, R.P., Reed, W.P.**, Effect of indomethacin in vivo on humoral and cellular immunity in humans., *Infect Immun* 19 (1978): 430-433.
73. **Gordon, S.**, Macrophage Activation, In: "*Encyclopedia of Immunology*", Delves, P.J., Roitt, I.M. (Editors), Academic Press, San Diego, London, 1998, 2nd edition, 1648-9.
74. **Green, D.R., Flood, P.M.**, Contrasuppression, In: "*Encyclopedia of Immunology*", Delves, P.J., Roitt, I.M. (Editors), Academic Press, San Diego, London, 1998, 2nd edition, 648-651.
75. **Greenberg, P.D.**, Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells., *Adv Immunol* 49 (1991): 281-355.
76. **Greenberg, P.D., Cheever, M.A., Fefer, A.**, Detection of early and delayed antitumor effects following curative adoptive chemoimmunotherapy of established leukemia., *Cancer Res* 40 (1980): 4428-4432.
77. **Greenberg, P.D., Riddell, S.R.**, Adoptive Cellular Therapy Of Tumors, In: "*Therapeutic Immunology*", Austen, K.F., Burakoff, S.J., Rosen, F.S. (editors), Blackwell Science, Oxford-London-Edinburgh-Melbourne, 1996, 549-562.
78. **Greenberg, P.D.**, Therapy of murine leukemia with cyclophosphamide and immune Lyt-2+ cells: cytolytic T cells can mediate eradication of disseminated leukemia., *J Immunol* 136 (1986): 1917-1922.
79. **Guery, J.C., Galbiati, F., Smioldo, S., Adorini, L.**, Non-MHC-linked Th2 cell development induced by soluble protein administration predicts susceptibility to Leishmania major infection., *J Immunol* 159 (1997): 2147-2153.
80. **Hahm, K.B., Lee, S.I., Chung, J.P., Kim, J.H., Park, I.S.**, Comparison of immunomodulative effects of histamine-2 receptor antagonists in gastric cancer patients: focus on the lymphoblastogenesis and cytotoxicity of peripheral blood mononuclear cells., *Int J Immunopharmacol* 16 (1994): 985-93.

81. **Harding, F.A., McArthur, J.G., Gross, J.A., Raulat, D.H., Allison, J.P.**, CD28 mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T cell clones., *Nature* 356 (1992): 607-609.
82. **Herva, E.**, Comparison of microtitre plates with flat-bottomed and round-bottomed wells for mixed lymphocyte culture (MLC)., *Acta path microbiol scand Sect C* 85 (1977): 90-98.
83. **Hess, A.D., Tutschka, P.J., Santos, G.W.**, In vitro activation of human suppressor cells: relative quantification and specificity of suppressor cells generated in primary and secondary mixed lymphocyte culture., *Exp Hematol* 9 (1981): 415-430.
84. **Hirschberg, T., Randazzo, B., Hirschberg, H.**, Effects of methylprednisolone on the in vitro induction and function of suppressor cells in man., *Scand J Immunol* 12 (1980): 33-39.
85. **Hoon, D.B.S., Golub, S.H., Nizze, A., Morton, D.L.**, A prospective randomized trial of immunomodulation with low dose cyclophosphamide in patients receiving active specific immunotherapy with melanoma cell vaccine., *Proc Am Soc Clin Oncol* 6 (1987): 212-6.
86. **Horvath, B.V., Szalai, C., Mandi, Y., Laszlo, V., Radvany, Z., Darvas, Z., Falus, A.**, Histamine and histamine-receptor antagonists modify gene expression and biosynthesis of interferon gamma in peripheral human blood mononuclear cells and CD19-depleted cell subsets., *Immunol Lett* 70 (1999): 95-99.
87. **Ikemoto, S., Kishimoto, T., Nishio, S., Mori, K., Maekawa, M.**, Clinical studies on cell-mediated immunity in patients with urinary bladder carcinoma. Depression of cell-mediated immunity by adherent cells., *Eur Urol* 15 (1988): 252-255.
88. **Ishizaka, K., Ishih, Y., Nakano, T., Sugie, K.**, Biochemical Basis of Antigen-Specific Suppressor T Cell Factors: Controversies and Possible Answers., *Adv Immunol* 74 (2000): 1-60.
89. **Izenwasser, S., Cote, T.E.**, Inhibition of adenylyl cyclase activity by a homogeneous population of dopamine receptors: selective blockade by antisera directed against Gi1 and/or Gi2., *J Neurochem* 64 (1995): 1614-21.
90. **Jain, S.L., Barone, K.S., Michael, J.G.**, Activation patterns of murine T cells after oral administration of an enterocoated soluble antigen., *Cell Immunol* 167 (1996): 170-175.
91. **James, N.D., Sikora, K.**, Immunotherapy of Tumors, In: "*Encyclopedia of Immunology*", Delves, P.J., Roitt, I.M. (Editors), Academic Press, San Diego, London, 1998, 2nd edition, 1359-1364.
92. **Jenkins, M.K., Taylor, P.S., Norton, S.D., Urdahl, K.B.**, CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J Immunol* 147 (1991): 2461-2466.
93. **Jorgensen, F., Lamm, L.U.**, MLC - a micro-modification of the mixed leucocyte culture technique., *Tissue Antigens* 4 (1974): 482-494.
94. **Kalinichenko, V.V., Mokyr, M.B., Graf, L.H. jr., Cohen, R.L., Chambers, D.A.**, Norepinephrine-mediated inhibition of antitumor cytotoxic T lymphocyte generation involves a beta-adrenergic receptor mechanism and decreased TNFalpha gene expression., *J Immunol* 163 (1999):2492-9.
95. **Kaufmann, S.H.E., Hahn, H., Diamantstein, T.**, Relative susceptibilities of T cell subsets involved in delayed-type hypersensitivity to sheep red blood cells to the in vitro action of 4-hydroxycyclophosphamide., *J Immunol* 125 (1980): 1104-1108.
96. **Kelly, M.D., King, J., Cherian, M., Dwerryhouse, S.J., Finlay, I.G., Adams, W.J., King, D.W., Lubowski, D.Z., Morris, D.L.**, Randomized trial of preoperative cimetidine in patients with colorectal carcinoma with quantitative assessment of tumor-associated lymphocytes., *Cancer* 85 (1999): 1658-63.
97. **Kirkpatrick, C.H.**, Lymphocyte Transformation Test, In: "*Encyclopedia of Immunology*", Delves, P.J., Roitt, I.M. (Editors), Academic Press, San Diego, London, 1998, 2nd edition, 1621-24
98. **Klein, J., Sato, A.**, The HLA System, First of Two Parts, *N Engl J Med* 343 (2000): 702-708.

99. Klein, J., Sato, A., The HLA System, Second of Two Parts, *N Engl J Med* 343 (2000): 782-786.
100. Knight, S.C., Control of lymphocyte stimulation in vitro: help and suppression in the light of lymphoid population dynamics., *J Immunol Methods* 50 (1982): R51-R63.
101. Kohya, H., Ebina, T., Yamaguchi, T., Ishida, N., The "double grafted tumor system", proposed to find effector cells in the analyses of antitumor effect of BRMs., *Biotherapy* 1 (1989): 139-51.
102. Korzeniewski, C., Callewaert, D.M., An Enzyme-Release Assay for Natural Cytotoxicity, *J Immunol Methods*, 64 (1983): 313-320.
103. Korzeniewski, C., Callewaert, D.M., An enzyme-release assay for natural cytotoxicity., *J Immunol Methods* 64 (1983): 313-320.
104. Kronenberg, M., Siu, G., Hood, L.E., Shastri, N., The molecular genetics of the T-cell antigen receptor and T-cell antigen recognition., *Annu Rev Immunol* 4 (1986): 529-91.
105. Kugler, A., Stuhler, G., Walden, P., Zöller, G., Zobywalski, A., Brossart, P., Trefzer, U., Ullrich, S., Müller, C., Becker, V., Gross, A.J., Hemmerlein, B., Kanz, L., Müller, G.A., Ringert, R.-H., Regression Of Human Metastatic Renal Cell Carcinoma After Vaccination With Tumor Cell-Dendritic Cell Hybrids, *Nature Med* 6 (2000): 332-336.
106. Leskovar, P., Bielmeier, J., Treatment of solid tumors should obligatorily be combined with the in vivo codepletion of tumor-protecting, CD8+/HLA-DR+ suppressor T cells by alloreactive donor T cells whose preprogrammed cell death allows a high GvL-effect before GvHD can be established., *Eur J Physiol* 431 (1996): R229-230.
107. Leskovar, P., Down-Regulation of Immune Response by Overstimulated T Cells and/or Hyperactivated Monocytes/Macrophages and Its Reversal by "Filtering-Out" of the Non-Specific Signals., *Dtsch Zschr Onkol* 25 (1993): 137-8.
108. Leskovar, P., Downregulation of Overstimulated, Anergic Lymphocytes (T-cells, Monocytes/Macrophages) Resulted in Tumor Shrinkage and Disappearance of Metastases, *Dtsch Zschr Onkol* 27 (1995): 46-49.
109. Leskovar, P., Hyperaktivierter Zustand von immunkompetenten Zellen (Makrophagen, T-Zellen): molekularbiologischer und zellphysiologischer Hintergrund., *Dtsch Zschr Onkol* 26 (1994): 41-46.
110. Leskovar, P., Immuntherapie unter Einbeziehung von aktivierten Makrophagen: Richtiges Timing kann für den Therapieerfolg ausschlaggebend sein., *Dtsch Zschr Onkol* 24 (1992): 29-40.
111. Leskovar, P., Neue Modellvorstellungen zu einigen Kernfragen der Immunologie unter besonderer Berücksichtigung der Tumormunologie., *Dtsch Zschr Onkol* 22 (1990): 1-9.
112. Leskovar, P., Spielt die anhaltende immunsuppressive Lage nicht nur bei der Tumorentwicklung, sondern auch bei der Auslösung von autoimmunen und allergischen Erkrankungen eine kausalgenetische Rolle ? Teil 1, *Dtsch Zschr Onkol* 23 (1991): 125-131.
113. Leskovar, P., Spielt die anhaltende immunsuppressive Lage nicht nur bei der Tumorentwicklung, sondern auch bei der Auslösung von autoimmunen und allergischen Erkrankungen eine kausalgenetische Rolle ? Teil 2, *Dtsch Zschr Onkol* 23 (1991): 215-21.
114. Leskovar, P., Verbesserte Knochenmark-Transplantation eröffnet neue Möglichkeiten der Tumorthherapie., *Dtsch Zschr Onkol* 25 (1993): 77-82.
115. Levitzky, H.I., Lezenby, A., Hayashi, R.J., Pardoll, D.M., In vivo priming of two distinct antitumor effector populations: the role of MHC class I expression., *J Exp Med* (179): 1215-1224.
116. Lightbody, J.J., Bach, F.H., Specificity of destruction by lymphocytes activated in mixed leukocyte culture., *Transplant Proc* 4 (1972): 307-310.
117. Lis, H., Sharon, N., Lectins, In: "*Encyclopedia of Immunology*", Delves, P.J., Roitt, I.M. (Editors), Academic Press, San Diego, London, 1998, 2nd edition, 1335-1341.

118. **Lissoni, P., Rovelli, F., Tisi, E., Brivio, F., Ardizzioia, A., Barni, S., Tancini, G., Saudelli, M., Cesana, E., Vigano, M.G.,** Relation between macrophage and T helper-2 lymphocyte functions in human neoplasms: neopterin, interleukin-10 and interleukin-6 blood levels in early or advanced solid tumors., *Biol Regul Homeost Agents* 9 (1995): 146-149.
119. **Lissoni, P., Vigore, L., Ferranti, R., Bukovec, R., Meregalli, S., Mandala, M., Barni, S., Tancini, G., Fumagalli, L., Giani, L.J.,** Circulating dendritic cells in early and advanced cancer patients: diminished percent in the metastatic disease., *Biol Regul Homeost Agents* 13 (1999): 216-9.
120. **Luqman, M., Johnson, P., Trowbridge, I., Bottomly, K.,** Differential expression of the alternatively spliced exons of murine CD45 in Th1 and Th2 cell clones., *Eur J Immunol* 21 (1991): 17-22.
121. **MacDonald, H.R., Sordat, B., Cerottini, J.C., Brunner, K.T.,** Generation of cytotoxic T lymphocytes in vitro. IV. Funktional activation of memory cells in the absence of DNA synthesis., *J Exp Med* 142 (1975): 622-636.
122. **Mackensen, A., Carcelain, G., Viel, S., Raynal, M.-C., Michalaki, H., Triebel, F., Bosq, J., Hercend, T.,** Direct evidence to support the immunosurveillance concept in a human regressive melanoma., *J Clin Invest* 93 (1994): 1397-1402.
123. **Mangi, R.J., Kantor, F.S.,** The multiple mixed lymphocyte reaction: variables important in the test as a measure of lymphocyte competence in man., *Yale J Biol Med* 48 (1975): 217-228.
124. **Mantovani, G., Coiana, A., Massidda, A., Proto, E., Floris, C., Maccio, A., Pusceddu, G., Del Giacco, G.S.,** Role of interleukin-2 in cancer related immune deficiency: in vitro response to Il-2, production of Il-2, and Il-2 receptor expression in patients with advanced cancer, *Cancer Detect Prev* 12 (1988): 149-159.
125. **Mishell, B.B., Shiigi, M.,** "Selected Methods In Cellular Immunology", Freeman and Company, USA, 1980: S. 128-137.
126. **Mishell, B.B., Shiigi, M.,** "Selected Methods In Cellular Immunology", Freeman and Company, USA, 1980: S. 14-17.
127. **Mishell, B.B., Shiigi, M.,** "Selected Methods In Cellular Immunology", Freeman and Company, USA, 1980: S. 461-462.
128. **Mookerjee, B.K.,** Influence of separation techniques on the distribution and function of lymphocyte subpopulations., *Transplantation* 22 (1976): 101-107.
129. **Mosman, T.R., Coffman, R.L.,** Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties., *Annu Rev Immunol* 7 (1989): 145.
130. **Motulsky, H.J., Insel, P.A.,** Adrenergic receptors in man., *N Engl J Med* 307 (1982): 18-29.
131. **Mueller, D.L., Jenkins, M.K., Schwartz, R.H.,** Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy., *Annu Rev Immunol* 7 (1989): 445-480.
132. **Mule, J.J., Shu, S., Rosenberg, S.A.,** The antitumor efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 in vivo., *J Immunol* 135 (1985): 646-652.
133. **Muller, K.M., Jaunin, F., Masouye, I., Piguët, P.F., Saurat, J.H., Hauser, C.,** Involvement of granulocytes and adhesion receptors intracellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1 in tissue inflammation induced by Th2-type helper cells., *J Invest Dermatol* 104 (1995): 350-354.
134. **Munakata, Y., Umezawa, Y., Iwata, S., Dong, R.P., Yoshida, S., Ishii, T., Morimoto, C.,** Specific inhibition of TH2-type cytokine production from human peripheral T cells by terfenadine in vitro., *Clin Exp Allergy* 29 (1999): 1281-6.
135. **Murray, D.R., Irwin, M., Rearden, C.A., Ziegler, M., Motulsky, H., Maisel, A.S.,** Sympathetic and Immune Interactions During Dynamic Exercise. Mediation Via a beta-2-adrenergic-dependent Mechanism., *Circulation* 86 (1992): 205-213.
136. **Nakajima, I., Chu, T.M.,** Synergistic antitumor activity of interleukin-2 and cimetidine against syngeneic murine tumor., *Cancer Immunol Immunother* 33 (1991): 9-14.

137. **Nanbara, S., Arinaga, S., Akiyoshi, T.**, Augmentation of the generation of lymphokine-activated killer cells after a single dose of mitomycin C in cancer patients., *Cancer Immunol Immunother* 29 (1989): 237-241.
138. **Norment, A.M., Salter, R.D., Parham, P., Angelhard, V.H., Littman, D.R.**, Cell-cell-adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules., *Nature* 336 (1988): 79-81.
139. **Novak, T.J., Rothenberg, E.V.**, cAMP inhibits induction of interleukin 2 but not of interleukin 4 in T cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (1990) 9353-9357
140. **Nowell, P.C.**, Phytohemagglutinin: An Initiator of Mitosis in Cultures of Normal Human Leucocytes., *Cancer Res* 20 (1960): 462-466
141. **Onsrud, M.**, Depressed in vitro lymphoproliferation after radiation therapy., *Acta Radiol Oncol* 22 (1983): 61-64.
142. **Onsrud, M.**, Influence of in vivo hydrocortisone on some human blood leucocyte sub-populations. II. Effects on T cell - monocyte cooperation., *Acta path microbiol scand Sect C* 89 (1981): 321-327.
143. **Onsrud, M.**, Reduced generation of suppressor cells in human mixed lymphocyte culture after radiotherapy., *Acta path microbiol scand Sect C* 90 (1982): 39-45.
144. **Onsrud, M., Thorsby, E.**, Radiosensitivity of non-primed and primed human T-cells in vitro., *Int Archs Allergy appl Immun* 62 (1980): 370-381.
145. **Orditura, M., De Vita, F., Roscigno, A., Auriemma, A., Infusino, S., Catalano, G.**, Soluble interleukin-2 receptor and soluble CD8 antigen levels in serum from patients with solid tumors, *Int J Mol Med* 2 (1998): 75-79.
146. **Orosz, C., Bach, F.H.**, Alloantigen-activated CML suppression independent of cytotoxic activity., *J Immunol* 123 (1979): 1419-1421.
147. **Ozer, H., Cowens, J.W., Colvin, M., Nussbaum-Blumenson, A., Sheedy, D.**, In vitro effects of 4-hydroxycyclophosphamide on human immunoregulatory T subset function. I. Selective effects on lymphocyte function in T-B-collaboration. *J Exp Med* 155 (1982): 276-290.
148. **Paciucci, P.A., Holland, J.F., Glidewell, O., Odchimar, R.**, Recombinant interleukin-2 by continuous infusion and adoptive transfer of recombinant interleukin-2 activated calls in patients with advanced cancer., *J Clin Oncol* 7 (1989): 860-878.
149. **Paul, J.**, "Zell- und Gewebekulturen", Übers. und bearb. Von Sigrid Maurer und Rainer Maurerde Gruyter, Berlin, New York, 1979: S. 311-314 und 347-348.
150. **Paul, J.**, "Zell- und Gewebekulturen", Übers. Und bearb. Von Sigrid Maurer und Rainer Maurerde Gruyter, Berlin, New York, 1979: S. 347-348.
151. **Paul, J.**, "Zell- und Gewebekulturen", Übers. Und bearb. Von Sigrid Maurer und Rainer Maurerde Gruyter, Berlin, New York, 1979: S. 350-352.
152. **Penn, I.**, Post transplant malignancy: the role of immunosuppression., *Drug Saf* 23 (2000): 101-113.
153. **Penn, I.**, Principles in tumor immunity: immunocompetence and cancer., In "Biologic therapy of cancer", DeVita, N.K. Jr. (editor), J.E. Lippincott, New York, 1991, 53-66.
154. **Perez, V.L., Trinchieri, G., Abbas, A.K.**, Cytokines That Regulate Immune Inflammation: Interleukin-4, -10, and -12, In: "Therapeutic Immunology", Austen, K.F., Burakoff, S.J., Rosen, F.S. (editors), Blackwell Science, Oxford-London-Edinburgh-Melbourne, 1996, 238-248.
155. **Piguet, P.F., Dewey, H.K., Vassalli, P.**, Induction or suppression of B cell proliferation and differentiation by PHA or ConA in mouse spleen cell cultures., *J Immunol* 117 (1976): 1817-23.
156. **Pillai, M.R., Balaram, P., Padmanabhan, T.K., Abraham, T., Hareendran, N.K., Nair, K.**, Immunocompetence in lung cancer. Relationship to extent of tumor burden and histologic type., *Cancer* 64 (1989): 1853-1858.
157. **Ramarathinam, L., Castle, M., Wu, Y., Liu, Y.**, T cell costimulation by B7/BB1 induces CD8 T-cell dependent tumor rejection: an important rpole of B7/BB1 in the induction, recruitment, and effector function of antitumor T cells., *J Exp Med* 179 (1994): 1205-1214.

158. **Ramer-Quinn, D.S., Baker, R.A., Sanders, V.M.**, Activated T helper 1 and T helper 2 cells differentially express the beta-2-adrenergic receptor., *J Immunol* 159 (1997): 4857-4867.
159. **Raulet, D.H.**, Immunology. Antigen for gamma/delta T cells., *Nature* 339 (1989): 342-3.
160. **Raulet, D.H.**, The structure, function, and molecular genetics of gamma/delta T cell receptor., *Annu Rev Immunol* 7 (1989): 175-207.
161. **Rezai, A.R., Salazar-Gonzalez, J.F., Martinez-Maza, O., Bramhall, J., Afrasiabi, R., Karmani-Arab, V.**, Histamine blocks interleukin-2 (Il-2) gene expression and regulates Il-2 receptor expression., *Immunopharmacol Immunotoxicol* 12 (1990): 345-62.
162. **Ridge, J.P., Di Rosa, F., Matzinger, P.**, A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell, *Nature* 393 (1998): 474-477.
163. **Rixen, D., Livingston, D.H., Loder, P., Denny, T.N.**, Ranitidine improves lymphocyte function after severe head injury: results of a randomized, double-blind study., *Crit Care Med* 24 (1996): 1787-92.
164. **Roehm, N.W., Rodgers, G.H., Hatfield, S.M., Glasebrook, A.L.**, An improved calorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT., *J Immunol Methods* 142 (1991): 257-265.
165. **Rollinghoff, M., Starzinski-Powitz, A., Pfizenmaier, K., Wagner, H.**, Cyclophosphamide-sensitive T lymphocytes suppress the in vivo generation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes., *J Exp Med* 145 (1977): 455-459.
166. **Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Muul, L.M., Chang, A.E., Avis, F.P., Leitman, S., Linehan, W.M., Robertson, C.N., Lee, R.E., Rubing, J.T.**, A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high dose interleukin-2 alone., *N Engl J Med* 316 (1987): 889-897.
167. **Roudebush, R.E., Berry, P.L., Layman, N.K., Butler, L.D., Bryant, H.U.**, Dissociation of immunosuppression by chlorpromazine and trifluoperazine from pharmacologic activities as dopamine antagonists., *Int J Immunopharmacol* 13 (1991): 961-8.
168. **Rovelli, F., Lissoni, P., Crispino, S., Barni, S., Fumagalli, G., Paolorossi, F., Tancini, G.**, Increased level of soluble interleukin-2 receptor in advanced solid tumors: a preliminary study., *Tumori* 31 (1988): 633-637.
169. **Samelson, L.E., Lindsten, T., Fowlkes, B.J., van den Elsen, P., Terhorst, C., Davis, M.M., Germain, R.N., Schwartz, R.H.**, Expression of genes of the T cell antigen receptor complex in precursor thymocytes., *Nature* 315 (1985): 765-8.
170. **Sanders, V.M.**, The role of norepinephrine and beta-2-adrenergic receptor stimulation in the modulation of Th1, Th2, and B lymphocyte function., *Adv Exp Med Biol* 437 (1998): 269-78.
171. **Santamrogio, L., Lipartiti, M., Bruni, A., Dal Toso, R.**, Dopamine receptors on human T- and B-lymphocytes., *J Neuroimmunol* 45 (1993): 113-9.
172. **Sato, T., Deiwick, A., Raddatz, G., Koyama, K., Schlitt, H.J.**, Interactions of allogeneic human mononuclear cells in two-way mixed leucocyte culture (MLC): influence of cell numbers, subpopulations and cyclosporin., *Clin Exp Immunol* 115 (1999): 301-8.
173. **Schedlowski, M., Falk, A., Rhone, A., Wagner, T.O., Jacobs, R., Tewes, U., Schmidt, R.E.**, Catecholamines induce alterations of distribution and activity of human natural killer (NK) cells., *J Clin Immunol* 13 (1993): 344-51.
174. **Schirmacher, V., Muerkoster, S., Bucur, M., Umansky, V., Rocha, M.**, Breaking tolerance to a tumor-associated viral superantigen as a basis for graft-versus-leukemia reactivity., *Int J Cancer* 87 (2000): 695-706.
175. **Schonrich, G., Alferink, J., Klevenz, A., Kublbeck, G., Auphan, N., Schmitt-Verhulst, A.M., Hammerling, G.J., Arnold, B.**, Tolerance induction as a multistep process., *Eur J Immunol* 24 (1994): 285-93.
176. **Schwartz, R.H.**, A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248 (1990): 1349-1356.
177. **Sedlacek, H.-H., Möröy, T.**, Antigen Presentation, In: "*Immune Reactions.*", Springer, Berlin-Heidelberg, 1995, 67-84.

178. **Sedlacek, H.-H., Möröy, T.**, Cell-Mediated Cytotoxicity., In: "*Immune Reactions.*", Springer, Berlin-Heidelberg, 1995, 179-186.
179. **Sedlacek, H.-H., Möröy, T.**, Differentiation of T-cells, In: "*Immune Reactions.*", Springer, Berlin-Heidelberg, 1995, 85-121.
180. **Sharon, N.**, Lectin Receptors as Lymphocyte Surface Markers., *Adv Immunol* 34 (1983): 213-298.
181. **Shibata, M., Hoon, D., Okun, E., Morton, D.**, Modulation of histamine type II receptors on the CD8+ T cells by interleukin-2 and cimetidine., *Int Arch Allergy Immunol* 97 (1992): 8-16.
182. **Shindo, H., Ogura, T., Masuno, T., Hayashi, S., Kishimoto, S.**, Induction of activated macrophages by intraperitoneal injection of mitomycin C in mice., *Cancer Immunol Immunother* 20 (1985): 145-50.
183. **Sigma-Diagnostics Technical Services**, *Produktinformation zu Accuspin-System-Hisopaque-1077*, Procedure No. A 6929 / A 7054 / A 0561, Sigma, St. Louis, USA, 1994, S. 1E-2E.
184. **Siu, G., Kronenberg, M., Strauss, E., Haars, R., Mak, T.W., Hood, L.**, The structure, rearrangement and expression of D beta gene segments of the murine T cell antigen receptor., *Nature* 311 (1984): 344-50.
185. **Sleasman, J.W., Henderson, M., Barrett, D.J.**, Con A-induced suppressor cell function depends on the activation of the CD4+CD45RA inducer T cell subpopulation., *Cell Immunol* 133 (1991): 367-78.
186. **Solliday, S., Bach, F.H.**, Lymphocyte reactivity in vitro: VI. Specificity of target cell destruction following in vitro sensitization in mixed leukocyte cultures., *Eur J Immunol* (2): 68-72.
187. **Sprent, J.**, Mixed Lymphocyte Reaction, In: "*Encyclopedia of Immunology*", Delves, P.J., Roitt, I.M. (Editors), Academic Press, San Diego, London, 1998, 2nd edition, 1733-36.
188. **Stam, W.B., Van Oosterhout, A.J.M., Nijkamp**, Pharmacologic Modulation Of TH1- And TH2-Associated Lymphokine Production, *Life Sciences* 53 (1993): 1921-1934.
189. **Stein-Werblowsky, R.**, Anergy in pregnancy and malignant disease: the role of the immunosuppressive alpha-globulin., *Oncology* 32 (1975): 196-200.
190. **Stuhler, G., Walden, P.**, Collaboration of helper and cytotoxic T lymphocytes., *Eur J Immunol* 23 (1993): 2279-2286.
191. **Surgess, N.C., Ashford, M.L.J., Cook, D.L., Hales, C.N.**, The sulphonylurea receptor may be an ATP-sensitive potassium channel., *Lancet* 2 (1985): 474-475.
192. **Swanson, M.A., Lee, W.T., Sanders, V.M.**, IFN-gamma production by Th1 cells generated from naive CD4+ T cells exposed to Norepinephrine., *J Immunol* 166 (2001): 232-240.
193. **Szekeres, J., Pasca, A.S., Pejtsik, B.**, Measurement of lymphocyte cytotoxicity by assessing endogenous alkaline phosphatase activity of the target cells., *J Immunol Methods* 40 (1981): 151-154.
194. **Takeuchi, K., Kajimura, M., Kodaira, M., Lin, S., Hanai, H., Kaneko, E.**, Up-regulation of H2 receptor and adylate cyclase in rabbit parietal cells during prolonged treatment with H2-receptor antagonists., *Dig Dis Sci* 44 (1999): 1703-9.
195. **Taub, D.D.**, Effector Lymphocytes, In: "*Encyclopedia of Immunology*", Delves, P.J., Roitt, I.M. (Editors), Academic Press, San Diego, London, 1998, 2nd edition, 789.
196. **Thompson, J.A., Shulman, K.L., Benyunes, M.C., Lindgren, C.G., Collins, C., Lang, P.H., Bush, W.H., Benz, L.A., Fefer, A.**, Prolonged continuous intravenous infusion interleukin-2 and lymphokine-activated killer cell therapy for metastatic renal cell carcinoma., *J Clin Oncol* 10 (1992): 960-968.
197. **Thomsen, M., Hansen, G.S., Svejgaard, A., Jersild, C., Hansen, J.A., Good, R.A., Dupont, B.**, Mixed lymphocyte culture technique., *Tissue Antigens* 4 (1974): 495-506.
198. **Thorsby, E., Bois, R.D., Bondevik, H., Dupont, B., Eijsvoogel, V., Hansen, J.A., Jersild, C., Jorgensen, F., Kissmeyer-Nielsen, F., Lamm, L.U., Schellekens, P.T.A., Svejgaard, A., Thomsen, M.**, Joint report from a mixed lymphocyte culture workshop., *Tissue Antigens* 4 (1974): 507-525.

199. **Ting, C.C., Yang, S.S., Hargrove, M.E.**, Induction of suppressor T cells by interleukin 2., *J Immunol* 133 (1984): 261-6.
200. **Ting, C.C., Yang, S.S., Hargrove, M.E.**, Lymphokine-induced cytotoxicity: characterization of effectors, precursors, and regulatory ancillary cells., *Cancer Res* 46 (1986): 513-8.
201. **Townsend, S.E., Allison, J.P.**, Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ cells by B7-transfected melanoma cells., *Science* 259 (1993): 368-370.
202. **Trefzer, U., Weingart, G., Chen, Y., Herberth, G., Adrian, K., Winter, H., Audring, H., Guo, Y., Sterry, W., Walden, P.**, Hybrid Cell Vaccination For Cancer Immune Therapy: First Clinical Trial With Metastatic Melanoma, *Int J Cancer* 85 (2000): 618-626
203. **Turk, J.L., Parker, D.**, Effect of cyclophosphamide on immunological control mechanisms., *Immunol Rev* 65 (1982): 99-113.
204. **Unsgaard, G.**, Immuno-inductive and immuno-suppressive influence of human mononuclear phagocytes cultured in vitro., *Acta path microbiol scand Sect C* 85 (1977): 381-388.
205. **van Tits, L.J., Daul, A., Grosse-Wilde, H., Brodde, O.E.**, Cyclic AMP antagonizes mitogen-induced accumulation of inositol phosphates in human peripheral leucocytes in vitro., *Br J Clin Pharmacol* 30 (1990): 148S-149S (Suppl 1).
206. **van Tits, L.J.H., Daul, A., Bauch, H.J., Grosse-Wilde, H., Happel, M., Michel, M.C., Brodde, O.E.**, Effects of insuline-induced hypoglycemia on beta-2-adrenoreceptor density and proliferative responses of human lymphocytes., *J Clin Endocrinol Metab* 71 (1990): 187-192.
207. **Vistica, D.T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A., Boyd, M.R.**, Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production., *Cancer Research* 51 (1991): 2515-2520.
208. **von Boehmer, H., Kisielow, P.**, Self-nonsel self discrimination by T-cells., *Science* 248 (1990): 1369-73.
209. **Webb, D.R., Devens, B.H.**, Suppressor T Lymphocytes, In: "*Encyclopedia of Immunology*", Delves, P.J., Roitt, I.M. (Editors), Academic Press, San Diego, London, 1998, 2nd edition, 2243-7.
210. **Weiss, S., Bogen, B.**, MHC class II-restricted presentation of intracellular antigen. *Cell* 64 (1991): 767-776.
211. **Wile, S.**, Plasma ultrafiltration as cancer therapy., *Arch Surg* 124 (1989): 222-4.
212. **Williams, L.T., Snyderman, R., Lefkowitz, R.J.**, Identification of beta-adrenergic receptors in human lymphocytes by (-)[3H]alprenolol binding., *J Clin Invest* 57 (1976): 149-152.
213. **Woiciechowsky, C., Asadullah, K., Nestler, D., Eberhardt, B., Platzer, C., Schoning, B., Glockner, F., Lanksch, W.R., Volk, H.D., Docke, W.D.**, Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury., *Nat Med* 4 (1998): 768-9.
214. **Woiciechowsky, C., Asadullah, K., Nestler, D., Schoning, B., Glockner, F., W.R., Volk, H.D., Docke, W.D.**, Diminished monocytic HLA-Dr expression and ex vivo cytokine secretion capacity in patients with glioblastoma: effect of tumor extirpation, *J Neuroimmunol* 84 (1998): 164-171.
215. **Yanagisawa, K., Naito, Y., Kuroiwa, K., Arai, T., Furukawa, Y., Tomizuka, H., Miura, Y., Kasahara, T., Tetsuka, T., Tominaga, S.**, The expression of ST2 gene in helper T cells and the binding of ST2 protein to myeloma-derived RPMI8226 cells., *J Biochem* 121 (1997): 95-103.
216. **Zinkernagel, R.M., Doherty, P.C.**, Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system., *Nature* 248 (1974): 701-2.
217. **Zinkernagel, R.M.**, Vom MHC zur Diabetes-Maus, *Via Medici* 5 (1997): 50.

7. Abbildungs- und Tabellenübersicht

7.1. Abbildungsübersicht

Abbildung	Titel	Seite
Abb. 1.a:	Phenolrot und fetales Kälberserum absorbieren im Wellenlängenbereich des Formazan (WST-1-Test).	23
Abb. 1.b:	Fetales Kälberserum besitzt eine nicht definierte Laktatdehydrogenaseaktivität.	23
Abb. 2:	Übersicht über das Testsystem zur Bestimmung des Einflusses auf die Regulatorzellfunktion.	26
Abb. 3.a:	Interindividuelle Variabilität der Proliferation.	29
Abb. 3.b:	Interindividuelle Variabilität der zellvermittelten Zytotoxizität.	29
Abb. 4:	Einfluss der Dauer der 1. MLR auf Proliferation und zellvermittelte Zytotoxizität in der sekundären MLR.	30
Abb. 5:	Zeitlicher Verlauf der Zellzahl in der sekundären MLR.	32-3
Abb. 6:	Dosisfindung Mitomycin C (MMC).	34-6
Abb. 7:	Einfluss der Inaktivierung der Regulatorzellen auf Proliferation und zellvermittelte Zytotoxizität in der sekundären MLR.	37
Abb. 8:	Mitomycin C-Behandlung der Regulatorzellen verstärkt die zellvermittelte Zytotoxizität in der gemischten Leukozytenreaktion (MLR).	39
Abb. 9:	Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit des MMC-Effektes auf Regulatorzellen und der Abhängigkeit von der Dauer der sekundären MLR.	40
Abb. 10:	Untersuchung der Antigenspezifität der Mitomycin-C-Wirkung auf Regulatorzellen.	41
Abb. 11:	Einfluss des Zell-Zell-Abstandes in einer gemischten Leukozytenkultur auf Proliferation und zellvermittelte Zytotoxizität.	43
Abb. 12:	Einfluss der Zellannäherung durch Zentrifugation in einer gemischten Leukozytenkultur auf Proliferation und zellvermittelte Zytotoxizität.	43
Abb. 13:	Einfluss der Responder-Stimulator-Zellratio auf Proliferation und Zellvermittelte Zytotoxizität in einer MLR.	44
Abb. 14.a:	Einfluss immunmodulierender Substanzen auf die durch Zentrifugation bedingte Zellannäherung induzierte Suppression.	45
Abb. 14.b:	Einfluss immunmodulierender Substanzen auf die durch äquales Zellverhältnis induzierte Suppression.	46

Abb. 14.c:	Einfluss immunmodulierender Substanzen auf die durch hohe Zellkonzentration induzierte Suppression.	46
Abb. 15:	Abhängigkeit der Regulatorzellfunktion von Proliferationsfähigkeit und Lektinstimulation während der Vorinkubation.	48
Abb. 16:	Abhängigkeit des deblockierenden Effektes von Mitomycin C (MMC) auf Regulatorzellen von der lektinstimulierten Proliferation.	50
Abb. 17:	Immunmodulierende Wirkung von Propranolol und Tolbutamid. Abhängigkeit von PHA-Stimulation der Regulatorzellen.	51
Abb. 18:	Immunmodulierende Wirkung von Propranolol und Tolbutamid. Abhängigkeit von PHA- und/oder ConA-Stimulation der Regulatorzellen.	52
Abb. 19.a:	Immunmodulierende Wirkung von Ranitidin, Cimetidin, Sulpirid. Einfluss der Regulatorzellen auf die zellvermittelte Zytotoxizität.	53
Abb. 19.b:	Immunmodulierende Wirkung von Ranitidin, Cimetidin, Sulpirid. Einfluss der Regulatorzellen auf die Proliferation in der sekundären MLR.	54
Abb. 19.c:	Immunmodulierende Wirkung von Ranitidin, Cimetidin, Sulpirid. Einfluss der Regulatorzellen auf die Proliferation im PHA-Proliferationstest.	55
Abb. 20.a:	Immunmodulierende Wirkung von Diclofenac und Indomethacin. Einfluss der Regulatorzellen auf die zellvermittelte Zytotoxizität.	56
Abb. 20.b:	Immunmodulierende Wirkung von Diclofenac und Indomethacin. Einfluss der Regulatorzellen auf die Proliferation in der sekundären MLR.	57
Abb. 20.c:	Immunmodulierende Wirkung von Diclofenac und Indomethacin. Einfluss der Regulatorzellen auf die Proliferation im PHA-Proliferationstest.	58

7.2. Tabellenübersicht

Tabelle	Titel	Seite
Tabelle 1:	Pipettierschema zur Herstellung der verwendeten Kulturmedien.	22
Tabelle 2:	Pipettierschema und Inkubationszeiten für die Proliferationstests MLR und PHA.	25
Tabelle 3:	Pipettierschema zur Quantifizierung der CTL-Antwort.	27
Tabelle 4.a:	Übersicht über die Ergebnisse der im Testsystem getesteten Substanzen im Vergleich zur unbehandelten Referenz.	A2
Tabelle 4.b:	Übersicht über die Ergebnisse der im Testsystem getesteten Substanzen im Vergleich zur nur mit Lektin behandelten Referenz.	A3

8. Anhang

8.1. Bezugsquellenverzeichnis

Produkt	Produktname	Hersteller	Bezugsquelle
Absauggerät	Atmolit 16N	Atmos Medizintechnik	http://www.atmosmed.de
Antibiotikrobielle Kombinationslösung	Antibiotic Antimycotic Solution	Sigma	http://www.sigma-aldrich.com
Autoclav	Atoclav 2540 EL	Tuttnauer	http://www.tuttnauer.com
Brutschrank	CO ₂ -Auto-Zero	Heracus Instruments	http://www.heraeus-instruments.de
Bunsenbrenner	Fireboy eco	Integra Biosciences (IBS)	http://www.integra-biosciences.com
Cimetidin	Cimetidine SKF-92334	RBI (Sigma-Aldrich)	http://www.callrbi.com
Combitips	Combitips plus 2,5 ml	Eppendorf	http://www.eppendorf.de
ConA	Concanavalin A Type IV	Sigma	http://www.sigma-aldrich.com
Diclofenac	Diclofenac sodium	RBI (Sigma-Aldrich)	http://www.callrbi.com
DMPK	3,7-Dimethyl-1-propargylxanthine	RBI (Sigma-Aldrich)	http://www.callrbi.com
DMSO	Dimethylsulfoxid	Merck	http://www.merck.de
Einfrier-Röhrchen	Nunc CryoTubes	Nunc Brand	http://nunc.nalgenunc.com
Filteraufsatz	Mirisart, single use syringe filter	Sartorius	http://www.sartorius.de
Gentamicin	Gentamicin (250 mg)	Sigma	http://www.sigma-aldrich.com
Indomethacin	Indomethacin	RBI (Sigma-Aldrich)	http://www.callrbi.com
Kulturmedium RPMI 1640	RPMI 1640	Sigma	http://www.sigma-aldrich.com
Kulturmedium RPMI 1640 ohne Phenolrot	RPMI 1640 without L-Glutamine and phenol red	Sigma	http://www.sigma-aldrich.com
L-Glutamin	L-Glutamine (200 mM, 50 ml)	Biochrom	http://www.biochrom.de
Mehrkanalpipette	Transfepette-8, 10-100 µl	Brand GmbH	http://www.brand.de
Mehrkanalpipette	Transfepette-8, 20-200 µl	Brand GmbH	http://www.brand.de
Mikroliterpipette	Transfepette, 10-100 µl	Brand GmbH	http://www.brand.de
Mikroliterpipette	Transfepette, 20-200 µl	Brand GmbH	http://www.brand.de
Mikroliterpipette	Transfepette, 100-1000 µl	Brand GmbH	http://www.brand.de
Mikroskop	Axiolvert 135	Zeiss	http://www.zeiss.de
Mikrotiterplatten, 12 Löcher	12-well plate, suspension culture quality, with lid, sterile	Brand GmbH	http://www.brand.de
Mikrotiterplatten, 24 Löcher	24-well plate, suspension culture quality, with lid, sterile	Brand GmbH	http://www.brand.de
Mikrotiterplatten, 96 Löcher	96-well plate, PS, U-bottom, clear, sterile, lid	Brand GmbH	http://www.brand.de
Molsidomin	Molsidomine	Sigma	http://www.sigma-aldrich.com
Neubauer-Zählkammer	Cell-Counting-Chamber Hemacytometer	Sigma	http://www.sigma-aldrich.com
Nichtessentielle Aminosäuren	Non Essential Amino Acids (100 ml)	Biochrom	http://www.biochrom.de
PHA	PHYTOHÄMAGGLUTININ PHA-P	Sigma	http://www.sigma-aldrich.com
Photometer für Mikrotiterplatten	THERMOmax	Molecular Devices	http://www.moldev.com
Photometer-Steuerungssoftware	SOFTmax PRO (Hardware: PowerMacintosh 7300/200)	Molecular Devices	http://www.moldev.com
Pipettenspitzen	Pipettenspitzen (blau) 50-1000 µl, unsteril	Sarstedt Medizintechnik	Tel.: +49.2293-305-0
Pipettenspitzen	Pipettenspitzen (gelb) 2-200 µl, unsteril	Sarstedt Medizintechnik	Tel.: +49.2293-305-0
Pipettiergerät	Pipeboy acu classic	Integra Biosciences (IBS)	http://www.integra-biosciences.com
Plastikpipetten, steril	Pipette with tip, 1 ml	Greiner Labortechnik	http://www.greiner-lab.com
Plastikpipetten, steril	Pipette with tip, 2 ml	Greiner Labortechnik	http://www.greiner-lab.com
Plastikpipetten, steril	Pipette with tip, 5 ml	Greiner Labortechnik	http://www.greiner-lab.com
Plastikpipetten, steril	Pipette with tip, 10 ml	Greiner Labortechnik	http://www.greiner-lab.com
Plastikpipetten, steril	Pipette with tip, 25 ml	Greiner Labortechnik	http://www.greiner-lab.com
Propranolol	S(-)-Propranolol hydrochloride	RBI (Sigma-Aldrich)	http://www.callrbi.com
Pyruvat	Sodium Pyruvate (100 mM, 100 ml)	Biochrom	http://www.biochrom.de
Ranitidin	Ranitidine hydrochloride	RBI (Sigma-Aldrich)	http://www.callrbi.com
Reagenz für Zellproliferationsstest	Cell-Proliferation Reagent WST-1	Boehringer	neu: http://www.roche.com
Reagenz für Zytotoxizitätstest	Cell-toxicity Detection Kit (LDH)	Boehringer	neu: http://www.roche.com
Reinluft-Sicherheitswerkbank	LaminAir HB 2448	Heraeus Instruments	http://www.heraeus-instruments.de
Stabiles Glutamin	N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamine (200 mM, 50 ml)	Biochrom	http://www.biochrom.de
Sulpirid	(+/-)-Sulpiride	RBI (Sigma-Aldrich)	http://www.callrbi.com
Tolbutamid	Tolbutamide	RBI (Sigma-Aldrich)	http://www.callrbi.com
Transfepipetten	BD-Falcon, 6-inch plastic transfer pipet, sterile	Becton Dickinson Labware	http://www.bd.com
Trennmedium zur Dichtezentrifugation	Accuspin System-Histopaque-1077	Sigma Diagnostics	http://www.sigma-aldrich.com
Triton X-100	Octylphenolpolyethylenglycolether	Boehringer	neu: http://www.roche.com
Trypanblau	Trypan Blue	Sigma	http://www.sigma-aldrich.com
Waage	Mettler AT 250	Mettler and Toledo	http://www.mt.com
Wägebepapier	Wägebepapier	neoLab	http://www.neolab.de
Zentrifuge	Rotina 48 und Rotana/RP	Hettich-Zentrifugen	http://www.hettich-zentrifugen.de
Zentrifugenröhrchen	PP-tube, 50 ml	Greiner Labortechnik	http://www.greiner-lab.com
Zentrifugenröhrchen	PP-tube, 12 ml	Greiner Labortechnik	http://www.greiner-lab.com

8.2. Ergebnistabelle der Testsubstanzen

Tabelle 4.a. Übersicht über die Ergebnisse der im Testsystem getesteten Substanzen im Vergleich zur unbehandelten Referenz. Im in Abb.2 beschriebenen Testsystem wurde der immunmodulierende Effekt der Substanzen Propranolol, Tolbutamid, Ranitidin, Cimetidin, Sulpirid, Diclofenac und Indometacin, sowie Kombinationen dieser Substanzen auf ruhende versus proliferierende (Lektinstimulation: Concanavalin A, Phytohämagglutinin) Regulatorzellen bestimmt. Als abhängige, relevante Variablen wurden zellvermittelte Lyse von Zielzellen (CML), Proliferation in einer gemischten Leukozytenreaktion (MLR) und Proliferation auf lektine Stimulation (PHA-Proliferationstest) bestimmt. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte von jeweils 8 individuellen Proben. I bezeichnet das Increment und SR die Stimulation Ratio gegenüber der Referenz, wie international zur Auswertung der MLR empfohlen (198). Weiter ist die statistische Signifikanz gegenüber der unbehandelten bzw. der lektinstimulierten Referenz dargestellt (Kruskal-Wallis-Test für unverbundene Stichproben): +: statistisch signifikante Stimulierung; o: kein statistisch signifikanter Unterschied; statistisch signifikante Suppression.

Referenz	Prae	Medium	40%			0,085				0,029				
Referenz	Post	Medium	45%			0,073				0,022				
Substanz	MMC	Mitogen	CML	I	SR	Stat	MLC	I	SR	Stat	PHA	I	SR	Stat
Propranolol	Prae	Medium	47%	7%	118%	+	0,095	0,01	112%	o	0,063	0,03	217%	+
Propranolol	Post	Medium	50%	5%	111%	+	0,125	0,05	171%	o	0,067	0,05	305%	+
Propranolol	Prae	PHA	48%	8%	120%	+	0,046	-0,04	54%	o	0,044	0,02	152%	o
Propranolol	Post	PHA	43%	-2%	96%	-	0,143	0,07	196%	+	0,089	0,07	405%	+
Propranolol	Prae	ConA	42%	2%	105%	o	0,044	-0,04	52%	o	0,063	0,03	217%	+
Propranolol	Post	ConA	41%	-4%	91%	o	0,134	0,06	184%	o	0,075	0,05	341%	+
Propranolol	Prae	PHA+ConA	43%	3%	108%	o	0,053	-0,03	62%	o	0,050	0,02	172%	+
Propranolol	Post	PHA+ConA					0,101	0,03	138%	o	0,059	0,04	268%	+
Tolbutamid	Prae	Medium	35%	-5%	88%	o	0,070	-0,02	82%	o	0,057	0,03	197%	+
Tolbutamid	Post	Medium	46%	1%	102%	o	0,122	0,05	167%	o	0,070	0,05	318%	+
Tolbutamid	Prae	PHA	48%	8%	120%	+	0,022	-0,06	26%	o	0,067	0,04	231%	+
Tolbutamid	Post	PHA	36%	-9%	80%	-	0,113	0,04	155%	o	0,051	0,03	232%	+
Tolbutamid	Prae	ConA	37%	-3%	93%	o	0,020	-0,07	24%	o	0,055	0,03	190%	o
Tolbutamid	Post	ConA	45%	0%	100%	o	0,083	0,01	114%	o	0,047	0,03	214%	o
Tolbutamid	Prae	PHA+ConA	53%	13%	133%	+	0,043	-0,04	51%	o	0,032	0,00	110%	o
Tolbutamid	Post	PHA+ConA	42%	-3%	93%	o	0,051	-0,02	70%	o	0,027	0,01	123%	o
Prop. +Tolb.	Prae	Medium	45%	5%	113%	+	0,081	0,00	95%	o	0,068	0,04	234%	+
Prop. +Tolb.	Post	Medium	48%	3%	107%	o	0,145	0,07	199%	+	0,079	0,06	359%	+
Ranitidin	Prae	PHA	22%	-18%	55%	-	0,055	-0,03	65%	o	0,059	0,03	203%	+
Ranitidin	Post	PHA	18%	-27%	40%	-	0,022	-0,05	30%	o	0,027	0,01	123%	o
Ranitidin	Prae	ConA	22%	-18%	55%	-	0,057	-0,03	67%	o	0,050	0,02	172%	o
Ranitidin	Post	ConA	12%	-33%	27%	-	0,020	-0,05	27%	o	0,026	0,00	118%	o
Ranitidin	Prae	PHA+ConA	2%	-38%	5%	-	0,035	-0,05	41%	-	0,046	0,02	159%	+
Ranitidin	Post	PHA+ConA	14%	-31%	31%	-	0,022	-0,05	30%	o	0,074	0,05	336%	+
Cimetidin	Prae	PHA	15%	-25%	38%	o	0,062	-0,02	73%	o	0,043	0,01	148%	o
Cimetidin	Post	PHA	44%	-1%	98%	o	0,040	-0,03	55%	o	0,005	-0,02	23%	o
Cimetidin	Prae	ConA	56%	16%	140%	o	0,066	-0,02	78%	o	0,004	-0,03	14%	o
Cimetidin	Post	ConA	50%	5%	111%	o	0,029	-0,04	40%	o	0,002	-0,02	9%	o
Cimetidin	Prae	PHA+ConA	36%	-4%	90%	-	0,064	-0,02	75%	o	0,040	0,01	138%	o
Cimetidin	Post	PHA+ConA	11%	-34%	24%	-	0,025	-0,05	34%	o	0,003	-0,02	14%	o
Sulpirid	Prae	PHA	24%	-16%	60%	-	0,059	-0,03	69%	o	0,055	0,03	190%	+
Sulpirid	Post	PHA	19%	-26%	42%	-	0,010	-0,06	14%	o	0,025	0,00	114%	o
Sulpirid	Prae	ConA	18%	-22%	45%	-	0,045	-0,04	53%	o	0,047	0,02	162%	o
Sulpirid	Post	ConA	20%	-25%	44%	-	0,002	-0,07	3%	-	0,007	-0,02	32%	-
Sulpirid	Prae	PHA+ConA	0%	-40%	0%	-	0,054	-0,03	64%	o	0,062	0,03	214%	o
Sulpirid	Post	PHA+ConA	20%	-25%	44%	-	0,036	-0,04	49%	o	0,041	0,02	186%	o
Ran.+Sulp.	Prae	PHA	31%	-9%	78%	-	0,063	-0,02	74%	o	0,029	0,00	100%	o
Ran.+Sulp.	Post	PHA	10%	-35%	22%	-	0,018	-0,06	25%	-	0,044	0,02	200%	o
Ran.+Sulp.	Prae	ConA	29%	-11%	73%	-	0,041	-0,04	48%	o	0,024	-0,01	83%	o
Ran.+Sulp.	Post	ConA	18%	-27%	40%	-	0,010	-0,06	14%	-	0,035	0,01	159%	o
Ran.+Sulp.	Prae	PHA+ConA	0%	-40%	0%	-	0,060	-0,03	71%	o	0,054	0,03	186%	o
Ran.+Sulp.	Post	PHA+ConA	1%	-44%	2%	-	0,003	-0,07	4%	-	0,043	0,02	195%	o
Ran.+Sul.+Tol.	Prae	PHA	13%	-27%	33%	-	0,060	-0,03	71%	o	0,053	0,02	183%	+
Ran.+Sul.+Tol.	Post	PHA	15%	-30%	33%	-	0,014	-0,06	19%	-	0,011	-0,01	50%	-
Ran.+Sul.+Tol.	Prae	ConA	35%	-5%	88%	-	0,038	-0,05	45%	o	0,031	0,00	107%	o
Ran.+Sul.+Tol.	Post	ConA	48%	3%	107%	-	0,005	-0,07	7%	-	0,032	0,01	145%	o
Ran.+Sul.+Tol.	Prae	PHA+ConA	0%	-40%	0%	-	0,057	-0,03	67%	o	0,043	0,01	148%	+
Ran.+Sul.+Tol.	Post	PHA+ConA	0%	-45%	0%	-	0,038	-0,04	52%	o	0,021	0,00	95%	o
Indometacin	Prae	PHA	18%	-22%	45%	o	0,064	-0,02	75%	o	0,029	0,00	100%	o
Indometacin	Post	PHA	6%	-39%	13%	-	0,051	-0,02	70%	o	0,015	-0,01	68%	o
Indometacin	Prae	ConA	3%	-37%	8%	o	0,065	-0,02	76%	o	0,029	0,00	100%	o
Indometacin	Post	ConA	67%	22%	149%	+	0,046	-0,03	63%	o	0,018	0,00	82%	o
Indometacin	Prae	PHA+ConA	31%	-9%	78%	o	0,061	-0,02	72%	o	0,043	0,01	148%	o
Indometacin	Post	PHA+ConA	7%	-38%	16%	o	0,032	-0,04	44%	o	0,002	-0,02	9%	o
Diclofenac	Prae	PHA	1%	-39%	3%	-	0,052	-0,03	61%	o	0,038	0,01	131%	o
Diclofenac	Post	PHA	46%	1%	102%	-	0,054	-0,02	74%	o	0,032	0,01	145%	o
Diclofenac	Prae	ConA	2%	-38%	5%	o	0,061	-0,02	72%	o	0,029	0,00	100%	o
Diclofenac	Post	ConA	55%	10%	122%	o	0,060	-0,01	82%	o	0,028	0,01	127%	o
Diclofenac	Prae	PHA+ConA	28%	-12%	70%	o	0,055	-0,03	65%	o	0,037	0,01	128%	o
Diclofenac	Post	PHA+ConA	7%	-38%	16%	-	0,029	-0,04	40%	o	0,001	-0,02	5%	o
DICT	Prae	PHA	2%	-38%	5%	-	0,053	-0,03	62%	o	0,044	0,02	152%	o
DICT	Post	PHA	3%	-42%	7%	-	0,051	-0,02	70%	o	0,003	-0,02	14%	o
DICT	Prae	ConA	6%	-34%	15%	-	0,058	-0,03	68%	o	0,028	0,00	97%	o
DICT	Post	ConA	17%	-28%	38%	-	0,047	-0,03	64%	o	0,020	0,00	91%	o
DICT	Prae	PHA+ConA	31%	-9%	78%	o	0,061	-0,02	72%	o	0,034	0,01	117%	o
DICT	Post	PHA+ConA	16%	-29%	36%	o	0,031	-0,04	42%	o	0,007	-0,02	32%	o

Tabelle 4.b. Übersicht über die Ergebnisse der im Testsystem getesteten Substanzen im Vergleich zur nur mit Lektin behandelten Referenz. Im in Abb.2 beschriebenen Testsystem wurde der immunmodulierende Effekt der Substanzen Propranolol, Tolbutamid, Ranitidin, Cimetidin, Sulpirid, Diclofenac und Indomethacin, sowie Kombinationen dieser Substanzen auf ruhende versus proliferierende (Lektinstimulation: Concanavalin A, Phytohämagglutinin) Regulatorzellen bestimmt. Als abhängige, relevante Variablen wurden zellvermittelte Lyse von Zielzellen (CML), Proliferation in einer gemischten Leukozytenreaktion (MLR) und Proliferation auf lektine Stimulation (PHA-Proliferationstest) bestimmt. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte von jeweils 8 individuellen Proben. I bezeichnet das Increment und SR die Stimulation Ratio gegenüber der Referenz, wie international zur Auswertung der MLR empfohlen (198). Weiter ist die statistische Signifikanz gegenüber der unbehandelten bzw. der lektinstimulierten Referenz dargestellt (Kruskal-Wallis-Test für unverbundene Stichproben): +: statistisch signifikante Stimulierung; o: kein statistisch signifikanter Unterschied; statistisch signifikante Suppression.

Referenz	Prae	PHA	26%	0,065	0,082
Referenz	Post	PHA			
Referenz	Prae	ConA	45%	0,066	0,065
Referenz	Post	ConA			
Referenz	Prae	PHA+ConA	33%	0,062	0,065
Referenz	Post	PHA+ConA			

Substanz	MMC	Mitogen	CML	I	SR	Stat.	MLC	I	SR	Stat.	PHA	I	SR	Stat.
Propranolol	Prae	Medium												
Propranolol	Post	Medium												
Propranolol	Prae	PHA	48%	22%	185%	+	0,046	-0,02	71%	o	0,044	-0,04	54%	-
Propranolol	Post	PHA	43%	-3%	93%	-	0,143	0,04	143%	o	0,089	0,04	193%	+
Propranolol	Prae	ConA	42%	-3%	93%	o	0,044	-0,02	67%	o	0,063	0,00	97%	o
Propranolol	Post	ConA	41%	-3%	93%	o	0,134	0,05	156%	o	0,075	0,04	208%	+
Propranolol	Prae	PHA+ConA	43%	10%	130%	+	0,053	-0,01	85%	o	0,050	-0,02	77%	o
Propranolol	Post	PHA+ConA					0,101	0,02	119%	o	0,059	0,01	120%	o
Tolbutamid	Prae	Medium												
Tolbutamid	Post	Medium												
Tolbutamid	Prae	PHA	48%	22%	185%	+	0,022	-0,04	34%	o	0,067	-0,02	82%	o
Tolbutamid	Post	PHA	36%	-10%	78%	-	0,113	0,01	113%	o	0,051	0,01	111%	o
Tolbutamid	Prae	ConA	37%	-8%	82%	o	0,020	-0,05	30%	o	0,055	-0,01	85%	o
Tolbutamid	Post	ConA	45%	1%	102%	o	0,083	0,00	97%	o	0,047	0,01	131%	o
Tolbutamid	Prae	PHA+ConA	53%	20%	161%	+	0,043	-0,02	69%	o	0,032	-0,03	49%	o
Tolbutamid	Post	PHA+ConA	42%	-8%	84%	-	0,051	-0,03	60%	o	0,027	-0,02	55%	o
Propr.+Tolb.	Prae	Medium												
Propr.+Tolb.	Post	Medium												
Ranitidin	Prae	PHA	22%	-4%	85%	-	0,055	-0,01	85%	o	0,059	-0,02	72%	o
Ranitidin	Post	PHA	18%	-28%	39%	-	0,022	-0,08	22%	-	0,027	-0,02	59%	-
Ranitidin	Prae	ConA	22%	-23%	49%	-	0,057	-0,01	86%	o	0,050	-0,02	77%	o
Ranitidin	Post	ConA	12%	-32%	27%	-	0,020	-0,07	23%	-	0,026	-0,01	72%	o
Ranitidin	Prae	PHA+ConA	2%	-31%	6%	-	0,035	-0,03	56%	o	0,046	-0,02	71%	o
Ranitidin	Post	PHA+ConA	14%	-36%	28%	-	0,022	-0,06	26%	-	0,074	0,03	151%	+
Cimetidin	Prae	PHA	15%	-11%	58%	o	0,062	0,00	95%	o	0,043	-0,04	52%	o
Cimetidin	Post	PHA	44%	-2%	96%	o	0,040	-0,06	40%	-	0,005	-0,04	11%	-
Cimetidin	Prae	ConA	56%	11%	124%	o	0,066	0,00	100%	o	0,004	-0,06	6%	-
Cimetidin	Post	ConA	50%	6%	114%	o	0,029	-0,06	34%	o	0,002	-0,03	6%	-
Cimetidin	Prae	PHA+ConA	36%	3%	109%	o	0,064	0,00	103%	o	0,040	-0,03	62%	o
Cimetidin	Post	PHA+ConA	11%	-39%	22%	-	0,025	-0,06	29%	-	0,003	-0,05	6%	-
Sulpirid	Prae	PHA	24%	-2%	92%	o	0,059	-0,01	91%	o	0,055	-0,03	67%	o
Sulpirid	Post	PHA	19%	-27%	41%	-	0,010	-0,09	10%	-	0,025	-0,02	54%	-
Sulpirid	Prae	ConA	18%	-27%	40%	-	0,045	-0,02	68%	o	0,047	-0,02	72%	o
Sulpirid	Post	ConA	20%	-24%	45%	-	0,002	-0,08	2%	-	0,007	-0,03	19%	-
Sulpirid	Prae	PHA+ConA	0%	-33%	0%	-	0,054	-0,01	87%	o	0,062	0,00	95%	o
Sulpirid	Post	PHA+ConA	20%	-30%	40%	-	0,036	-0,05	42%	-	0,041	-0,01	84%	o
Ran.+Sulp.	Prae	PHA	31%	5%	119%	o	0,063	0,00	97%	o	0,029	-0,05	35%	-
Ran.+Sulp.	Post	PHA	10%	-36%	22%	-	0,018	-0,08	18%	-	0,044	0,00	96%	o
Ran.+Sulp.	Prae	ConA	29%	-16%	64%	-	0,041	-0,03	62%	o	0,024	-0,04	37%	o
Ran.+Sulp.	Post	ConA	18%	-26%	41%	-	0,010	-0,08	12%	-	0,035	0,00	97%	o
Ran.+Sulp.	Prae	PHA+ConA	0%	-33%	0%	-	0,060	0,00	97%	o	0,054	-0,01	83%	o
Ran.+Sulp.	Post	PHA+ConA	1%	-49%	2%	-	0,003	-0,08	4%	-	0,043	-0,01	88%	o
Ran.+Sul.+Tol.	Prae	PHA	13%	-13%	50%	-	0,060	-0,01	92%	o	0,053	-0,03	65%	-
Ran.+Sul.+Tol.	Post	PHA	15%	-31%	33%	-	0,014	-0,09	14%	-	0,011	-0,04	24%	-
Ran.+Sul.+Tol.	Prae	ConA	35%	-10%	78%	-	0,038	-0,03	58%	o	0,031	-0,03	48%	o
Ran.+Sul.+Tol.	Post	ConA	48%	4%	109%	-	0,005	-0,08	6%	-	0,032	0,00	89%	o
Ran.+Sul.+Tol.	Prae	PHA+ConA	0%	-33%	0%	-	0,057	-0,01	92%	o	0,043	-0,02	66%	o
Ran.+Sul.+Tol.	Post	PHA+ConA	0%	-50%	0%	-	0,038	-0,05	45%	-	0,021	-0,03	43%	-
Indomethacin	Prae	PHA	18%	-8%	69%	-	0,064	0,00	98%	o	0,029	-0,05	35%	o
Indomethacin	Post	PHA	6%	-40%	13%	-	0,051	-0,05	51%	-	0,015	-0,03	33%	o
Indomethacin	Prae	ConA	3%	-42%	7%	o	0,065	0,00	98%	o	0,029	-0,04	45%	o
Indomethacin	Post	ConA	67%	23%	152%	+	0,046	-0,04	53%	-	0,018	-0,02	50%	o
Indomethacin	Prae	PHA+ConA	31%	-2%	94%	o	0,061	0,00	98%	o	0,043	-0,02	66%	o
Indomethacin	Post	PHA+ConA	7%	-43%	14%	-	0,032	-0,05	38%	-	0,002	-0,05	4%	-
Diclofenac	Prae	PHA	1%	-25%	4%	o	0,052	-0,01	80%	o	0,038	-0,04	46%	o
Diclofenac	Post	PHA	46%	0%	100%	o	0,054	-0,05	54%	-	0,032	-0,01	70%	o
Diclofenac	Prae	ConA	2%	-43%	4%	o	0,061	-0,01	92%	o	0,029	-0,04	45%	o
Diclofenac	Post	ConA	55%	11%	125%	o	0,060	-0,03	70%	o	0,028	-0,01	78%	o
Diclofenac	Prae	PHA+ConA	28%	-5%	85%	o	0,055	-0,01	89%	o	0,037	-0,03	57%	o
Diclofenac	Post	PHA+ConA	7%	-43%	14%	-	0,029	-0,06	34%	-	0,001	-0,05	2%	-
DICT	Prae	PHA	2%	-24%	8%	-	0,053	-0,01	82%	o	0,044	-0,04	54%	o
DICT	Post	PHA	3%	-43%	7%	-	0,051	-0,05	51%	-	0,003	-0,04	7%	-
DICT	Prae	ConA	6%	-39%	13%	-	0,058	-0,01	88%	x	0,028	-0,04	43%	o
DICT	Post	ConA	17%	-27%	39%	-	0,047	-0,04	55%	-	0,020	-0,02	56%	o
DICT	Prae	PHA+ConA	31%	-2%	94%	o	0,061	0,00	98%	o	0,034	-0,03	52%	-
DICT	Post	PHA+ConA	16%	-34%	32%	o	0,031	-0,05	36%	-	0,007	-0,04	14%	o

Danksagung

*Der schönste Dank für Gottes Gaben besteht darin,
daß man sie weitergibt.
(Kardinal Michael von Faulhuber)*

Mein Dank

richtet sich deshalb

in erster Linie an Herrn Professor Dr. med. Hartung, der mir durch sein Vertrauen und sein Vorbild als Hochschullehrer die Erstellung dieser Arbeit überhaupt ermöglicht hat,

an Herrn Dr. Leskovar, dessen Faszination an wissenschaftlichen Details und Freude an der Forschung mich tief beeindruckt und meinen Weg als Arzt wesentlich beeinflusst haben,

und an meine Lieben, die bedingungslos an meiner Seite standen und altruistisch meinen Weg durch Berge und Täler begleitet haben.